

UNIVERSITE DES ANTILLES

Année 2018

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES ANTILLES

Spécialité : biologie et santé

Présentée et soutenue publiquement le par

Laurence BERAL

Née le 23 Juin 1981 aux Abymes, Guadeloupe

**CARACTERISTIQUES DE LA MACULOPATHIE DREPANOCYTAIRE ET
ROLE DES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET
HEMORHEOLOGIQUES**

Soutenue le 13 Novembre 2018

Directeurs de thèse :

Professeur Philippe CONNES, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon

Professeur Thierry DAVID, Université des Antilles, Pointe-à-Pitre

Jury

Pr Marie-Noëlle DELYFER (Université Victor Segalen, Bordeaux)	rapporteur
Dr Bérangère FROMY (Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon)	rapporteur
Pr Annie LANNUZEL (Université des Antilles, Pointe-à-Pitre)	examineur
Dr Marc ROMANA (Université des Antilles, Pointe-à-Pitre)	examineur

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse, le Professeur Philippe CONNES

Je te remercie de la confiance que tu m'as accordée en acceptant de m'encadrer dans ce travail. Je suis tout à fait consciente et extrêmement reconnaissante de toutes les heures que tu as dû passer à diriger et corriger mes travaux. J'ai beaucoup appris de ton travail et de ta rigueur scientifique. J'ai eu énormément de chance de t'avoir comme directeur de thèse et ton travail restera pour moi un modèle.

Au Professeur Thierry DAVID.

Vous avez été mon premier maître en ophtalmologie. Toujours disponible, pédagogue, votre grande technique chirurgicale reste pour moi un objectif à atteindre.

Au Professeur Marie-Noëlle DELYFER.

Je te suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger mon travail. Ton intelligence et ta gentillesse restent pour moi un exemple à suivre.

Au Professeur Annie LANNUZEL, au Docteur Bérangère FROMY.

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ma thèse et d'être présentes en ce jour si important pour moi.

Au Docteur Marc ROMANA.

Je te suis extrêmement reconnaissante de tous les conseils et surtout du soutien que tu as su m'apporter dans ces moments qui n'ont pas toujours été faciles. Merci pour tes encouragements et ta grande disponibilité.

Au Docteur Marie-Dominique HARDY-DESSOURCES

Je vous remercie d'avoir accepté de m'accueillir au sein de votre équipe au cours de ces années.

A Yohan, Elie et Keyne

Je vous remercie de m'avoir apporté votre aide dans la réalisation de cette thèse, de votre grande gentillesse et de votre disponibilité.

A l'équipe d'ophtalmologie du CHU de Pointe-à-Pitre et en particulier à Malik et Coralie de m'avoir apporté de l'aide dans la réalisation de ces travaux. Sans vous, tout ce travail n'aurait pas été possible.

Je remercie tous les membres de l'équipe que j'ai été amenée à rencontrer au cours de ces années de thèse : Régine, Kizzy, Marie-Laure, Yann.

Je tenais à remercier tous les patients drépanocytaires qui nous font confiance et acceptent de participer à nos études.

Merci aux docteurs; Nathalie Lemonne, Maryse Etienne-Julan et Marie-Billaud de l'Unité Transversale de la Drépanocytose. Je mesure bien la charge de travail

supplémentaire qu'a représenté cette thèse pour vous et je vous en remercie énormément.

Merci aux docteurs Magnaval, Parrat et Bouchard et à toute l'équipe de Karukéra ophtalmologie de m'avoir apporté leur soutien cette dernière année.

A mes filles Lou et Ava, amours de ma vie. Vous êtes ma raison de vivre. Je vous aime.

A Thibaud, je t'aime. Merci de m'avoir soutenu dans mes choix au cours de ces années.

A mes parents, Gislhaine et Henri BERAL, ma sœur, Sarah BERAL. Vous êtes mon soutien le plus grand et êtes à l'origine de toutes mes réussites. Je vous aime.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

AVANT-PROPOS

1. REVUE DE LA LITTERATURE

1.1. DREPANOCYTOSE

1.1.1. Généralités

1.1.2. Historique

1.1.3. Epidémiologie et répartition géographique

1.1.3.1. Dans le monde

1.1.3.1.1. Répartition mondiale

1.1.3.1.2. Drépanocytose et paludisme

1.1.3.1.3. Haplotypes

1.1.3.2. En Guadeloupe

1.1.4. Les syndromes drépanocytaires

1.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE

1.2.1. Polymérisation de l'hémoglobine

1.2.1.1. L'hémoglobine humaine

1.2.1.1.1. Propriétés de l'hémoglobine humaine

1.2.1.1.2. Expression des gènes de globine au cours du développement

1.2.1.1.2.1. Formes embryonnaires et fœtales

1.2.1.1.2.2. Après la naissance et au stade adulte

1.2.1.1.3. Localisation des gènes de globine

1.2.1.2. L'hémoglobine S et sa polymérisation

1.2.1.2.1. Structure du polymère

1.2.1.2.2. Cinétique de la polymérisation

1.2.1.2.3. Effets de l'hémoglobine F sur la polymérisation

1.2.1.2.4. Les propriétés de l'hémoglobine C

1.2.1.3. Conséquences de la polymérisation.

1.2.1.3.1. Les anomalies structurales du globule rouge

1.2.1.3.1.1. Anomalies des lipides

1.2.1.3.1.2. Anomalies des protéines

1.2.1.3.2. Anomalies fonctionnelles du globule rouge

1.2.1.3.2.1. Déshydratation du globule rouge

1.2.1.3.2.2. Anomalies hémorhéologiques

1.2.1.3.2.2.1. Viscosité sanguine

1.2.1.3.2.2.2. Déformabilité érythrocytaire

1.2.1.3.2.2.3. Agrégation érythrocytaire

1.2.2 Après la polymérisation de l'hémoglobine

1.2.2.1. Falciformation

1.2.2.1.1. Causes déclenchant la falciformation

1.2.2.1.2. Pérennisation de la falciformation : le cercle

vicieux

1.2.2.1.3. Facteurs favorisant la falciformation

1.2.2.2. L'adhérence vasculaire

1.2.2.2.1. Notion de « delay time » - « temps de latence

1.2.2.2.2. Interactions entre globules rouges et cellules endothéliales

1.2.2.2.2.1. Hétérogénéité des globules rouges dans la drépanocytose

1.2.2.2.2.2. Les marqueurs des réticulocytes

1.2.2.2.2.3. Marqueurs des globules rouges matures

1.2.2.2.3. Interactions entre leucocytes et cellules endothéliales

1.2.2.2.4. Les plaquettes

1.2.2.2.5. Interactions entre globules rouges et monocytes et polynucléaires neutrophiles.

1.2.2.3. Activation cellulaire

1.2.2.3.1. Phénotype pro-inflammatoire

1.2.2.3.2. Phénotype pro-coagulant

1.2.3. Monoxyde d'azote et tonus vasculaire

1.2.3.1. Monoxyde d'azote

1.2.3.2. Endothéline-1

1.2.3.3. Monoxyde d'azote et endothéline-1 dans la drépanocytose

1.2.4. Hémolyse intravasculaire

1.2.5. Drépanocytose et stress oxydant

1.2.5.1. Les dérivés réactifs de l'oxygène

1.2.5.2. Le stress oxydant

1.2.5.3. Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose

1.2.5.3.1. Auto-oxydation de l'hémoglobine

1.2.5.3.2. L'hémoglobine libre

1.2.5.3.3. L'ischémie-reperfusion

1.2.5.3.4. Réponse inflammatoire et stress oxydant

1.2.5.4. Le système anti-oxydant

1.2.5.4.1. Système anti-oxydant enzymatique

1.2.5.4.1.1 Superoxyde dismutase (SOD)

1.2.5.4.1.2. Glutathion peroxydase

1.2.5.4.1.3. Catalase

1.2.5.4.1.4. Hème-oxygénase-1 (HO-1)

1.2.5.4.2. Système anti-oxydant non enzymatique

1.2.5.5. Stress oxydant et α -thalassémie

1.3. MANIFESTATIONS DE LA DREPANOCYTOSE

1.3.1. Phénotype hémolytique avec dysfonction endothéliale

1.3.1.1. L'hypertension pulmonaire

1.3.1.2. Vasculopathie cérébrale

1.3.1.3. Ulcères de jambes

1.3.1.4. Priapisme

1.3.1.5. Glomérulopathie

1.3.2. Phénotype hypervisqueux et crises vaso-occlusives

1.3.2.1. La crise vaso-occlusive aiguë (CVO)

1.3.2.2. Syndrome thoracique aigu

1.3.2.3. La nécrose avasculaire

1.3.3. Autres complications non prises en compte par le modèle de Gladwin

1.3.3.1 Douleurs intercurrentes

1.3.3.2. Neuropathie et douleurs neuropathiques

1.3.3.3. Infections

1.3.3.4. Complications cardiaques

1.3.3.5. Complications génito-urinaires

1.3.3.6. Complications hépato-biliaires

1.3.3.7. Complications musculo-squelettiques et dermatologiques

1.3.3.8. Syndrome de défaillance multiviscérale aiguë

1.4. MANIFESTATIONS OCULAIRES DE LA DREPANOCYTOSE

1.4.1. Rappels anatomiques

1.4.1.1. Anatomie de l'œil

1.4.1.2. La rétine

1.4.1.2.1. La rétine : deux zones

1.4.1.2.1.1. La rétine centrale

1.4.1.2.1.1.1. La fovéola

1.4.1.2.1.1.2. La fovéa

1.4.1.2.1.1.3. La région maculaire

1.4.1.2.1.2. La rétine périphérique

1.4.1.2.2. La vascularisation rétinienne

1.4.1.2.2.1. Vascularisation artérielle

1.4.1.2.2.1.1. Vascularisation des couches externes

1.4.1.2.2.1.2. Vascularisation des couches internes

1.4.1.2.2.2. Vascularisation veineuse

1.4.2. Manifestations ophtalmologiques de la drépanocytose

1.4.2.1. Segment antérieur

1.4.2.1.1. Paupières

1.4.2.1.2. Atteinte conjonctivale

1.4.2.1.3. Hyphéma

1.4.2.1.4. Atteinte irienne

1.4.2.2. Segment postérieur

1.4.2.2.1. Altérations de la papille

1.4.2.2.2. Pathologie rétinienne : rétinopathie

drépanocytaire

1.4.2.2.2.1. Rétinopathie drépanocytaire non proliférante

1.4.2.2.2.1.1. Blancs sans pression

1.4.2.2.2.1.2. Hémorragies saumonées

1.4.2.2.2.1.3. Black sunburst spots (BSS)

1.4.2.2.2.2. Rétinopathie drépanocytaire proliférante

1.4.2.2.3. Maculopathie drépanocytaire

1.4.2.2.4. Autres atteintes rétinienne

1.4.2.2.4.1. Stries angioïdes

1.4.2.2.4.2. Trous maculaires et membranes épimaculaires

1.4.2.2.4.3. Occlusions choroïdiennes

1.4.2.2.5. Evolution naturelle de la rétinopathie et de la maculopathie drépanocytaire

1.4.2.2.5.1. Rétinopathie drépanocytaire.

1.4.2.2.5.2. Evolution de la maculopathie drépanocytaire

1.5. TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE

1.5.1. Traitements systémiques

1.5.1.1. Dépistage précoce et éducation thérapeutique

1.5.1.2. Prévention des infections

1.5.1.3. Traitements antalgiques

1.5.1.4. Les échanges transfusionnels

1.5.1.5. Hydroxyurée

1.5.1.6. Saignées

1.5.1.7. Greffe de moelle osseuse

1.5.1.8. Perspectives thérapeutiques

1.5.1.8.1. Antioxydants

1.5.1.8.2. Thérapie génique

1.5.2. Traitement ophtalmologique des atteintes rétinienne

1.5.2.1. Photo-coagulation du vaisseau nourricier

1.5.2.2. Photo-coagulation pan-rétinienne

1.5.2.3. Chirurgie vitréo-rétinienne

1.5.2.4. Injections intravitréennes d'agents anti-angiogéniques
(anti-VEGF)

2. TRAVAUX DE RECHERCHE

2.1. Objectifs et mise en place des études

2.2. Matériel et méthode

2.2.1. Type d'étude

2.2.2. Recrutement des patients et critères d'inclusion

2.2.2.1. Critères d'inclusion (études 1 et 2)

2.2.2.2. Critères d'exclusion (études 1 et 2)

2.2.3. Paramètres étudiés

2.2.3.1. Critères sociodémographiques, cliniques (études 1 et 2)

2.2.3.2. Antécédents médicaux

2.2.4. Données cliniques et biomicroscopiques de la drépanocytose.

2.2.4.1. Etude 1

2.2.4.2. Etude 2

2.2.5. Examen de la rétine en Ocular Coherence Tomography (OCT) (études 1 et 2)

2.2.6. Electrorétinogramme multicocal (mfERG) : étude 2

2.2.7. Matériels et méthodes hématologiques et hémorhéologiques

2.2.7.1. Prélèvements sanguins (études 1 et 2)

2.2.7.2. Mesures hématologiques, biochimie et biologie moléculaire

2.2.7.3. Mesures hémorhéologiques (étude 1)

2.2.7.3.1. Viscosité sanguine

2.2.7.3.2. Déformabilité érythrocytaire

2.2.7.3.2.1. Préparation de l'échantillon étudié

2.2.7.3.2.2. L'ektacytomètre

2.2.7.3.3. Agrégation érythrocytaire

2.3. Analyses statistiques

2.4. Résultats

2.4.1 Etude 1

2.4.2. Etude 2

3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

4. BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AI: indice d'agrégation

AIT : Accident ischémique transitoire

ASAT : Aspartate aminotransférase

AVC : Accident vasculaire cérébral

BCAM-Lu : Basal Cell Adhesion Molecule - Lutheran blood group

CHU : Centre hospitalier universitaire

CIDG : Centre Intégré de la Drépanocytose de Guadeloupe

CNRSC : Centre National de la Recherche Scientifique

CO : monoxyde de carbone

CRP : Protéine C-réactive

C_t : concentration totale en HbS avant précipitation

C_s : solubilité d'HbS achevée

DI : Drépanocytes irréversibles

DRO : dérivés réactifs de l'oxygène

e-DAMP : Erythrocyte Danger-associated Molecular pattern molecules

EDTA: Ethylènediaminetétraacétique

EI: Elongation index ou index d'élongation

ET-1: Endothéline 1

FT : Facteur tissulaire

GB : Globule rouge

G6PD : Glucose 6 phosphate deshydrogénase

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

Hb : Hémoglobine

Hb A : Hémoglobine A

HbC : Hémoglobine C

HbF : Hémoglobine fœtale

HbS : Hémoglobine S (S : sickle)

HIF : hypoxia inducible factor

HLA : Human leucocyte antigen

HO-1 : Hème-oxygénase-1

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

HTVP : Hypertension veineuse pulmonaire

IAP : Integrin-Associated Protein

ICAM : Inter-Cellular Adhesion Molecule

ICAM-4 : Intracellular Adhesion Molecule-4

LDH : Lactate déshydrogénase

LORCA : Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyser

MLCP: Myosin-Light-Chain Phosphatase

NO: Monoxyde d'azote

OCT : Ocular coherence tomography ou tomographie en cohérence optique

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAMM : Paracentral acute middle maculopathy

PC : Phosphatidylcholine

PE : Phosphatidyléthanolamine

PS : Phosphatidylsérine

ROS : Reactive oxygen species

SD- OCT : Spectral domain-ocular coherence tomography

SOD : Superoxyde dysmutase

SM : Sphingomyéline

STA : Syndrome thoracique aigu

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TSP-1 : Thrombospondine-1

VCAM-1 : vascular cell adhesion protein -1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VGM : Volume globulaire moyen

CVO : Crise vaso-occlusive

AVANT-PROPOS

La drépanocytose ou anémie falciforme est la maladie génétique la plus répandue dans le monde. Elle affecte plus particulièrement les populations des régions africaines subsahariennes, du sous-continent Indien et celles issues de ces populations.

La Guadeloupe, archipel des Antilles françaises est une zone à forte prévalence drépanocytaire. Cette hémoglobinopathie y représente un véritable problème de santé publique. En effet, cette maladie systémique présente une mortalité et une morbidité majeures secondaires au développement de complications multi systémiques.

De nombreuses études sont menées afin de mieux comprendre et à terme, de mieux traiter ces affections. Ainsi, les chercheurs étudient les facteurs systémiques pouvant influencer sur leurs survenues et leurs évolutions et notamment les paramètres hématologiques et hémorhéologiques.

Par ailleurs, la drépanocytose est aussi à l'origine de complications ophtalmologiques pouvant mettre en jeu le pronostic anatomique et fonctionnel de l'œil au premier rang desquelles se trouve la rétinopathie drépanocytaire proliférante. Plus récemment, plusieurs auteurs ont rapporté une prévalence importante de la maculopathie dans la drépanocytose.

Mais la physiopathologie de ces deux complications reste très mal comprise.

Notre étude avait donc plusieurs objectifs :

- mieux comprendre la physiopathologie de la rétinopathie et de la maculopathie drépanocytaires afin de déterminer s'il existe une origine commune à ces deux complications ou si elles constituent deux affections complètement indépendantes.

- mieux caractériser la maculopathie drépanocytaire.

- rechercher des facteurs de risque génétiques (concernant le gène codant pour la globine), épidémiologiques, hématologiques et hémorhéologiques de la rétinopathie et de la maculopathie drépanocytaires.

La finalité de ces travaux ayant pour but une meilleure compréhension des manifestations ophtalmologiques de la drépanocytose est de proposer à terme une meilleure prise en charge aux patients atteints.

1. REVUE DE LA LITTERATURE

1.1. DREPANOCYTOSE

1.1.1. Généralités

La drépanocytose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive affectant les globules rouges (GR). Elle résulte de la synthèse d'une hémoglobine (Hb) anormale due à une mutation du gène β -globine situé sur le chromosome 11. Il s'agit d'une transversion adénine $\rightarrow$ thymine au niveau du 17^{ème} nucléotide de l'ADNc affectant le 6^{ème} codon de la chaîne β -globine. Ceci engendre le remplacement de l'acide glutamique en position 6 par la valine et la synthèse d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S (HbS) (215, 283).

En cas de baisse de pression en oxygène, la valine hydrophobe permet la polymérisation de l'HbS et la formation de structures fibreuses tubulaires (195).

Ces fibres tubulaires induisent une déformation des globules rouges en faucille caractéristique de la drépanocytose (134)

De plus, les hématies falciformées perdent leur élasticité et ne peuvent plus se déformer afin de traverser les micro-vaisseaux sanguins présentant un diamètre inférieur au leur. Rigides, ils restent bloqués dans les capillaires sanguins et les obstruent, entraînant ainsi des ischémies locales et des crises vaso-occlusives douloureuses mettant en jeu le pronostic fonctionnel de nombreux organes (233, 376).

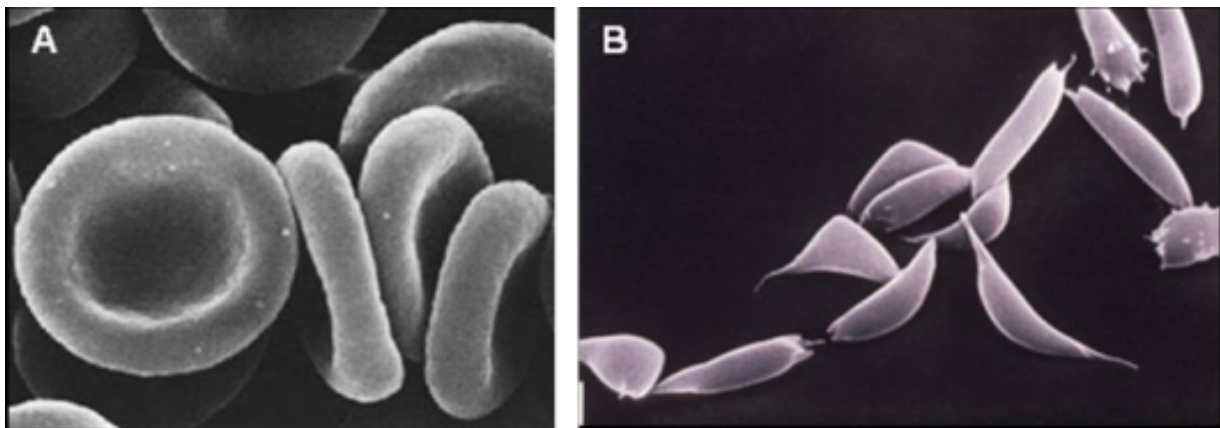


Figure 1: *Hématies normales et hématies falciformées* (<http://unisciel.fr>)

1.1.2. Historique

La drépanocytose fut décrite pour la première fois en 1910 par James B Herrick, professeur en médecine à Chicago chez un étudiant caribéen âgé de 20 ans, Walter C Noel. Une anémie et des globules rouges en forme de faucille avaient été détectés sur son frottis sanguin (205). Il souffrait, en plus d'une anémie chronique, de myalgies et de douleurs biliaires et mourut d'une pneumonie.

Plus tard, la transmission héréditaire est mise en évidence grâce à une patiente et à son père présentant tous les deux les mêmes déformations érythrocytaires en faucille. C'est en 1922 que Vernon Mason nomma la pathologie « Drépanocytose » dans les archives africaines de médecine (288).

En 1927, Hahn et Gillespie suggèrent que l'anoxie cause un changement de forme du globule rouge, qui, plongé dans une solution saturée en monoxyde de carbone, subit une falciformation (187).

L'hypothèse d'une anomalie de l'hémoglobine fut pour la première fois évoquée en 1945, attestée ensuite par la comparaison de la migration de l'Hb par électrophorèse entre patient drépanocytaire et témoin (358) . La même année, Neel précisa l'origine

génétique de la drépanocytose en mettant en évidence un mode de transmission autosomal récessif (335). Watson et Shields insistèrent sur le rôle atténuateur de l'hémoglobine F (HbF) dans la falciformation du globule rouge (416). L'HbF a en effet la propriété d'inhiber la polymérisation de l'HbS en s'intercalant dans le polymère de désoxy-hémoglobine S (341, 405).

C'est en 1957 qu'Ingram mis en évidence l'anomalie génétique à l'origine de la drépanocytose : substitution **GAG**→**GTG** au niveau du codon 6 du gène β -globine à l'origine du changement d'un acide aminé ($\beta 6$ GluVal), d'où la formation de l'hémoglobine HbS.

Dans les années 60, il est montré que le gène de la β -globine est situé sur le chromosome 11.

En 1978, le gène de la β -globine est isolé par Tom Maniatis (258). Deux ans plus tard, Yuet Wai Kan met au point un test génétique prénatal de la drépanocytose (227).

1.1.3. Epidémiologie et répartition géographique

1.1.3.1. Dans le monde

1.1.3.1.1. Répartition mondiale

La drépanocytose est la maladie génétique la plus répandue dans le monde affectant 300000 à 400000 nouveau-nés chaque année (233). Initialement, la drépanocytose était retrouvée dans les régions endémiques pour le paludisme : Afrique subsaharienne (où près de 2% des nouveau-nés sont affectés), bassin méditerranéen (notamment en Grèce et en Italie), Moyen-Orient et certaines parties du sous-continent indien et dans la péninsule Arabique (188, 253, 361). Suite à d'importants mouvements

de populations, la drépanocytose s'est étendue, principalement le long des côtes orientales des Amériques, dans les Caraïbes et en Europe de l'Ouest (359, 360). Les flux migratoires récents ont également fait de la drépanocytose la première maladie génétique en France hexagonale (387).

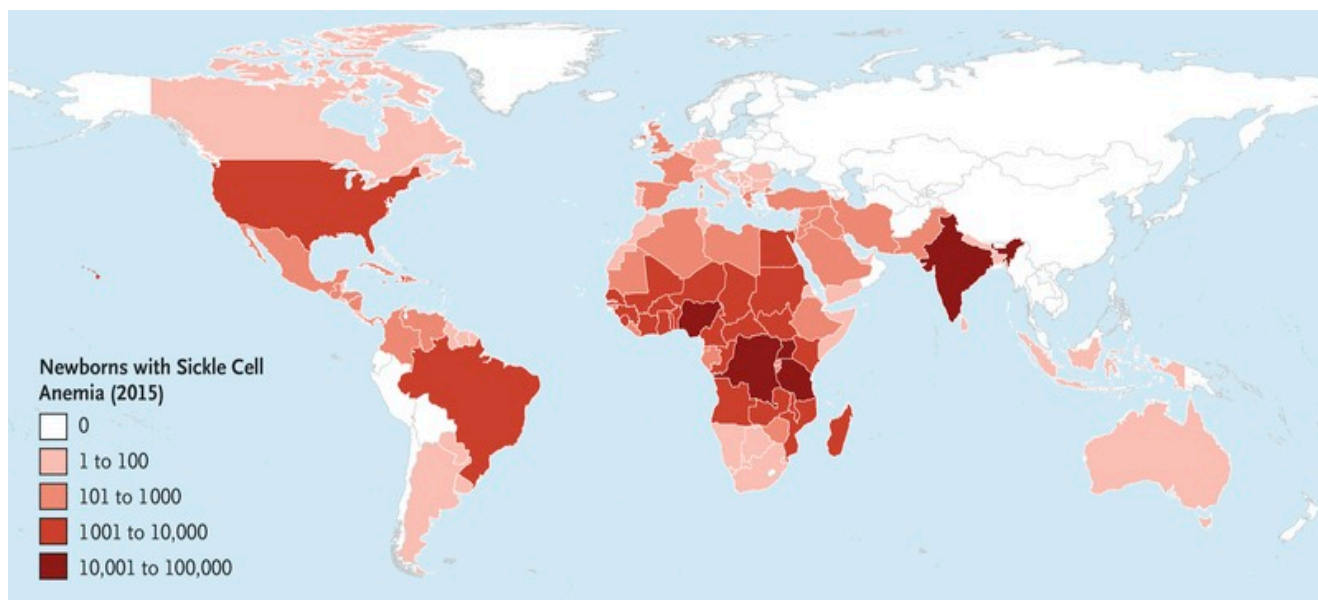


Figure 2: nombre de nouveau-nés atteints de drépanocytose en 2015 dans le monde (362).

1.1.3.1.2. Drépanocytose et paludisme

Le paludisme, ou malaria, est une maladie infectieuse due au parasite du genre *Plasmodium*. Ce parasite est transmis à l'homme via la piqûre de moustiques infectés du genre *Anophèle*. Le paludisme est une affection mettant en jeu le pronostic vital. Elle se manifeste par une anémie hémolytique secondaire à la pénétration des parasites dans les globules rouges. Les répartitions mondiales du paludisme et de la drépanocytose sont superposables (figure 3).

Malgré le caractère potentiellement létal conféré par l'HbS, il est actuellement largement accepté que la persistance de cette mutation de l'hémoglobine au cours des générations serait due à la protection qu'elle procure aux hétérozygotes AS (hétérozygote porteur du gène codant pour l'HbA et l'HbS) contre la malaria. En 1949, Haldane fut le premier à évoquer cet avantage sélectif des hétérozygotes vis-à-vis du paludisme (189, 259). De nombreuses études ont été publiées corroborant cette hypothèse d'un avantage sélectif. (3, 7, 42, 43, 207, 361, 464). L'HbS aurait un effet protecteur contre les formes les plus sévères de paludisme (207, 290) .

Si le caractère protecteur de l'HbS est aujourd'hui largement admis, les mécanismes par lesquels l'expliquer restent mal compris.

Certains auteurs ont d'abord évoqué que l'augmentation de la polymérisation de l'HbS au sein des hématies infectées favoriserait leur falciformation. De ce fait, la falciformation des hématies infestées favoriserait leur phagocytose, réduisant ainsi la parasitémie des AS par rapport à celle des sujets AA (homozygote pour le gène de l'HbA) (389). Dans les années 70, il a été montré qu'en cas de baisse de la pression en oxygène, on observait une diminution de la croissance intra-érythrocytaire du parasite chez les AS (159, 357, 389).

Par ailleurs, les érythrocytes infestés exprimeraient à leur surface une protéine membranaire (plasmodium falciparum erythrocyte membrane-1 PfEMP-1) favorisant l'adhésion endothéliale des globules rouges, et diminuerait ainsi leur élimination par la rate (347). Les propriétés auto-oxydantes de l'HbS conduisant à une libération accrue d'hème pourraient également entraîner une altération de PfEMP-1 synthétisée par les hématies infestées et induire ainsi une diminution de l'adhérence cellulaire (97). La diminution de l'adhérence cellulaire conduirait alors à une activation moindre de

l'endothélium et de l'inflammation impliquée dans la physiopathologie des formes sévères de paludisme (182).

Enfin, le système immunitaire avec notamment une destruction accrue des hématies AS infestées par les monocytes par rapport aux globules rouges AA infectés semble également participer à cet effet protecteur (22). De plus, des taux élevés d'anticorps dirigés contre PfEMP-1, et probablement d'autres protéines de surface pourraient augmenter l'opsonisation et la phagocytose des hématies infectées et perturber leurs propriétés d'adhérence cellulaires. Un taux plus élevé de ces anticorps a été retrouvé chez des individus AS par rapport à des AA (284)

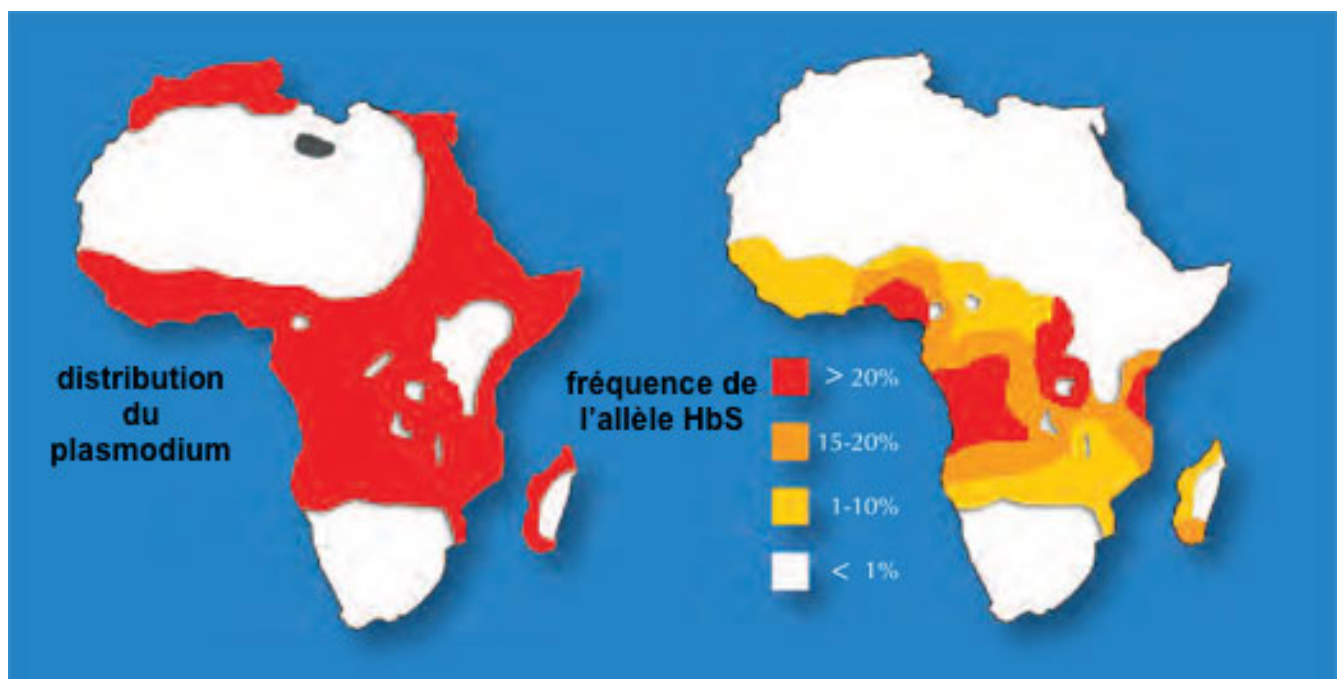


Figure 3. Comparaison de la répartition géographique de la Drépanocytose et du Paludisme sur le continent Africain. (Science in School. The European Journal for Science Teachers)

1.1.3.1.3. Haplotypes

Un haplotype est un groupe d'allèles de différents loci situés sur un même chromosome et habituellement transmis ensemble à la génération suivante (84).

Le locus des gènes de la famille β -globine est situé sur le chromosome 11. Les variations de séquences nucléotidiques ou polymorphismes sont fréquentes.

Ces modifications peuvent être mises en évidence grâce aux enzymes de restriction utilisées en cartographie génique. L'association non aléatoire de plusieurs polymorphismes définit un haplotype.(228)

Dans la drépanocytose, cinq haplotypes majeurs liés au gène β^S à forte spécificité géographique dans l'ancien monde, ont été décrits (323) :

- Bénin, dans la région centrale de l'Afrique de l'Ouest
- Sénégal, dans la région atlantique de l'Afrique de l'Ouest
- Bantou, dans l'Afrique Centrale ou Équatoriale
- Cameroun, dans le groupe ethnique Eton du Cameroun
- Arabo-indien, dans le sous-continent indien et dans la péninsule Arabique

La distribution géographique de ces différents haplotypes indique une apparition de la mutation S en cinq endroits différents.

Des travaux suggèrent que l'haplotype peut être un marqueur de l'hétérogénéité phénotypique des patients drépanocytaires (146, 186, 324, 325, 371, 430, 446). En effet, les haplotypes du gène β^S sont associés à des degrés différents de sévérité de la pathologie. Ainsi, l'haplotype sénégalais est associé à une meilleure qualité de vie, tandis que l'haplotype bantou est associé à la forme la plus sévère de la pathologie.

L'haplotype bénin étant une forme intermédiaire (366).

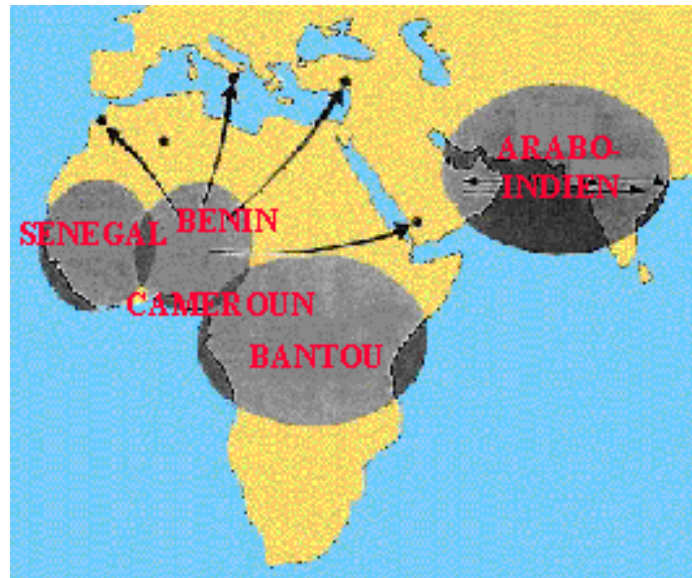


Figure 4. Les 5 haplotypes de la drépanocytose (www.im3inserm.fr)

1.1.3.2. En Guadeloupe

La Guadeloupe est un département français d'Outre-Mer dont la population résulte d'un métissage d'origine africaine, indienne, européenne et syro-libanaise.

Ce métissage est la conséquence de multiples migrations, ce qui explique le polymorphisme génétique de la drépanocytose sur l'île : de la forme homozygote SS aux formes hétérozygotes composites (SC, S β -thalassémique, SD Punjab) et aux autres formes rares (HbS^{Antilles}) (308, 393). Selon l'étude de Saint-Martin et collaborateurs, environ 1 enfant sur 304 de l'archipel est atteint d'un syndrome drépanocytaire majeur (393). C'est la première maladie génétique de ce département français d'Outre-Mer.

En 1984, un test de dépistage néonatal systématique est mis en place (393). Il s'agit de la première expérience de ce genre au niveau national.

En 1990, le Conseil Général de la Guadeloupe reconnaît officiellement la drépanocytose comme une priorité de santé publique et permet la création du Centre Intégré de la Drépanocytose de Guadeloupe (CIDG), devenu Centre Caribéen Guy Mérault en 1996 puis Unité Transversale de la Drépanocytose du Centre hospitalier universitaire (CHU) de Pointe-à-Pitre en 2007. Il est le premier en France à instaurer un programme de prise en charge globale (médicale et sociale) couplé à la seule unité Inserm (institut national de la santé et de la recherche médicale) d'Outre-Mer dont les travaux de recherche sont axés sur la drépanocytose. D'autres centres de référence ont ensuite été créés en France hexagonale et en Outre-Mer sur le modèle de celui de la Guadeloupe, formant un réseau de Centres de Référence et de Compétence régionale par le ministère de la santé français. On estime le nombre de patients drépanocytaires en Guadeloupe à 1200 dont 3 sur 4 sont suivis par l'Unité Transversale de la Drépanocytose.

1.1.4. Les syndromes drépanocytaires

La Drépanocytose s'exprime sous différentes formes associant la présence de l'allèle S à un deuxième allèle muté du gène β -globine (160). Nous retrouvons plusieurs syndromes drépanocytaires :

- S/S : drépanocytose homozygote ; la plus répandue avec la symptomatologie la plus sévère
- S/C : hétérozygotie composite la plus fréquente. Il associe un allèle S et un

allèle C. L'allèle C résulte d'une mutation ponctuelle du codon 6 se traduisant par le remplacement d'un acide glutamique par une lysine au niveau du gène β -globine (β^C).

- S/ β -thalassémie : Il associe un allèle S et un gène β -thalassémique. Le gène β -thalassémique conduit à une expression variable de chaîne β -globine et la sévérité des symptômes dépend en partie du taux d'HbA résiduel. La b β -thalassémie est caractérisée par la diminution de la synthèse de l'hémoglobine conduisant à une anémie microcytaire hypochrome (353).

Plus rarement, on peut également retrouver les hétérozygoties composites suivant :

-SD^{Punjab} : symptomatique, l'hémoglobine D^{Punjab} résulte d'une mutation sur le codon 121. Un acide glutamique est remplacé par une glutamine (122).

- SE ou SLe^{pore} qui correspondent à une hémoglobine anormale S associée à une hémoglobine thalassémique.

Enfin, d'autres variants plus rares associent une deuxième mutation en cis de la mutation β^S :

-S^{Oman} : il présente une deuxième mutation ponctuelle sur le codon 121 entraînant le remplacement d'un acide glutamique par une lysine (457).

-S^{Antilles} : résulte d'une deuxième mutation ponctuelle sur le codon 23. Une valine étant remplacée par une isoleucine (308).

Les hétérozygotes AS sont porteurs et transmetteurs du gène drépanocytaire mais sont asymptomatiques. Ils ne présentent pas les complications de la maladie sauf quand ils sont placés dans des cas extrêmes (407).

Classification des syndromes drépanocytaires	
1. Drépanocytose homozygote (SS)	
2. HbS associée à un autre mutant de la chaîne β globine :	SC SD Punjab SO Arab
3. HbS associée à une β thalassémie :	S β^0 thalassémie S β^+ thalassémie S $\delta\beta$ thalassémie
4. HbS associée à une Hb thalassémique :	SE S Lepore
5. HbS associée à une persistance héréditaire de l'Hb F :	mutations délétionnelles mutations non délétionnelles
6. Cas des mutants « S like » avec double mutation β :	AS Antilles, SS Antilles, CS Antilles SC Harlem

Tableau 1: Classification des syndromes drépanocytaires (171).

1.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE

1.2.1. Polymérisation de l'hémoglobine.

1.2.1.1. L'hémoglobine humaine

1.2.1.1.1. Propriétés de l'hémoglobine humaine

Les globines sont une famille de protéines assurant le transport et le stockage de l'O₂.

L'hémoglobine humaine transporte l'O₂ des poumons aux autres organes et tissus de l'organisme.

Un globule rouge humain de 7 à 8 μ m, contient environ 280 millions de molécules d'hémoglobine.

La molécule d'hémoglobine est un tétramère formé par quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes alpha composées chacune de 141 acides aminés et deux chaînes bêta de 146 acides aminés. Chacune des chaînes adopte une conformation spatiale lui conférant une forme globuleuse et ménageant une « poche » superficielle dans laquelle se trouve logée l'hème. L'hème est constitué d'une porphyrine complexée à un atome de fer qui permet la fixation réversible de l'oxygène.

La cohérence du tétramère d'hémoglobine résulte de liaisons entre les chaînes latérales hydrophobes via des acides aminés situés à la périphérie de chaque globine.

1.2.1.1.2. Expression des chaînes globine au cours du développement

Il existe différentes formes d'hémoglobine en fonction du stade de développement. On distingue ainsi des formes, embryonnaires, fœtales et adultes (430).

1.2.1.1.2.1. Formes embryonnaires et fœtales

Les hémoglobines embryonnaires sont synthétisées dès le stade sac vitellin. Ainsi, les chaînes ζ et ε se combinent pour former l'hémoglobine Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), les chaînes α et ε s'associent pour former l'hémoglobine Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) et les chaînes ζ et γ forment l'hémoglobine Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Puis, entre la 6^{ème} et la 8^{ème} semaine de développement, elles sont progressivement remplacées par l'hémoglobine fœtale ($\alpha_2\gamma_2$) (229, 430, 459).

1.2.1.1.2.2. Après la naissance et au stade adulte

L'HbF reste majoritaire durant les deux premiers mois (430). Cette hémoglobine est progressivement remplacée par les formes adultes et à 1 an de vie, les hématies contiennent de l'hémoglobine adulte A ($\alpha_2\beta_2$) très majoritaire (97%), de l'hémoglobine A2 ($\alpha_2\gamma_2$) (2%) et de l'HbF (moins de 1%).

Les hémoglobines F, A et A2 assurent le transport de l'O₂, de la surface respiratoire (placenta pour le fœtus, alvéoles pulmonaires après la naissance) jusqu'aux cellules (430).

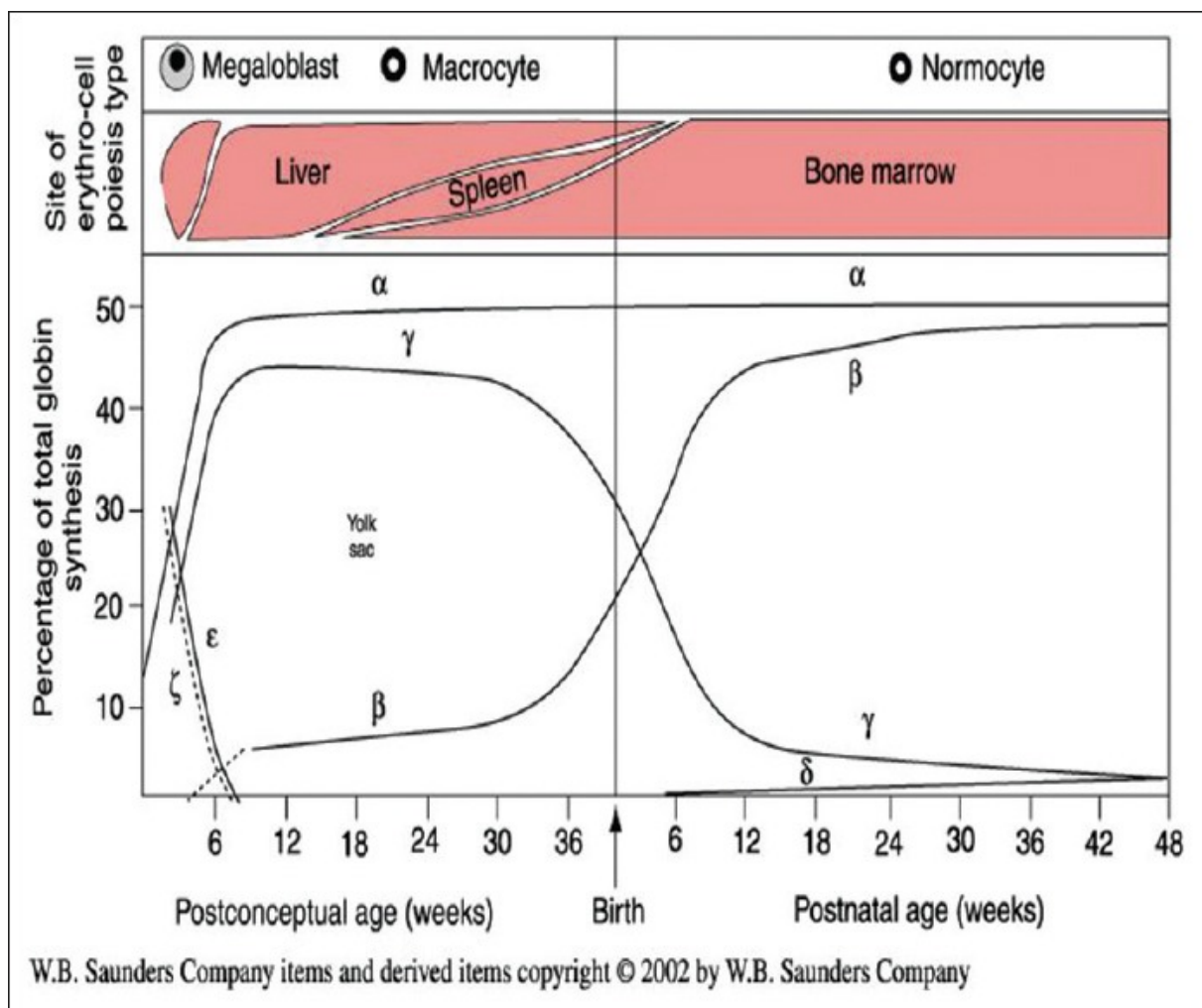


Figure 5. Expression des chaînes de globine au cours du développement (168)

1.2.1.1.3. Localisation des gènes de globine.

Les gènes alpha-globine sont localisés sur le chromosome 16 et les gènes beta-globine sur le chromosome 11 chez l'homme.

Dans le groupe alpha-globine, le gène qui code pour la chaîne ζ précède dans le sens 5' vers 3' les gènes codant pour les chaînes α constitutives des hémoglobines fœtale et adulte.

Dans le groupe beta-globine, la chaîne embryonnaire ϵ est suivie dans le sens 5' vers 3' par les deux gènes des chaînes fœtales γ puis par les deux gènes des chaînes adultes δ et β .

En fait, l'organisation des gènes de globine humains le long des chromosomes, correspond, dans le sens 5' 3', à l'ordre dans lequel ils sont exprimés au cours du développement.

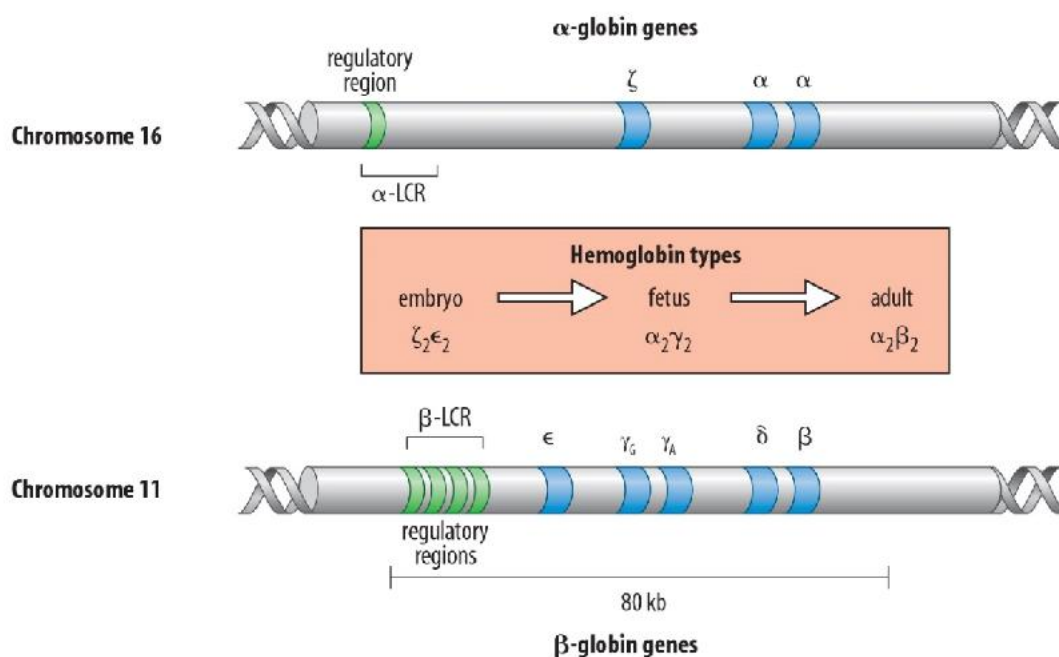


Figure 5. Localisation sur les chromosomes 16 et 11 des gènes de globine (168) .

1.2.1.2. L'hémoglobine S et sa polymérisation

1.2.1.2.1. Structure du polymère

On explique la polymérisation de l'HbS par le fait que l'acide glutamique normalement hydrophile est remplacé par une valine hydrophobe en position 6 de la β -globine. En condition désoxygénée, des interactions hydrophobes ont lieu entre la leucine 88 et la phénylalanine 85 d'une chaîne beta d'une molécule d'hémoglobine et la valine 6 de la chaîne beta de la molécule d'hémoglobine voisine, d'où la création d'une structure cristalline en fibres (317).

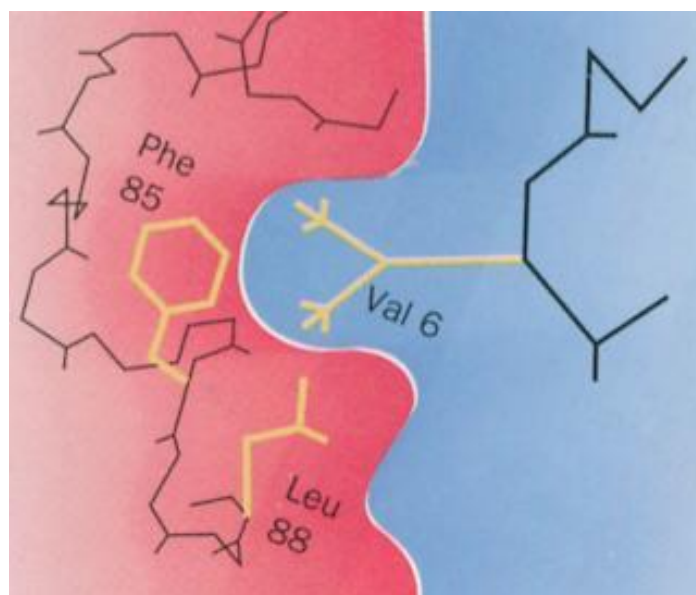


Figure 6. Polymérisation de l'hémoglobine (www.lucieberger.org.svt)

Au niveau des hématies, cela se traduit par une falciformation marquée par une diminution de leur déformabilité, propriété essentielle pour cette cellule devant circuler dans les vaisseaux sanguins de diamètre inférieur au sien (317).

Trois conditions sont nécessaires à la polymérisation de l'hémoglobine :

- Une basse pression en dioxygène qui favorise une prédominance de déoxy-HbS, la seule forme d'HbS présentant le site complémentaire à la chaîne hydrophobe de la valine, et donc qui favorise le phénomène de polymérisation (8, 187, 195, 256).
- Une forte concentration en HbS qui favorise bien évidemment les contacts entre molécules ainsi que leurs interactions.
- Une température élevée, témoignant d'une forte agitation thermique, qui favorise également la polymérisation (8, 54, 441).

1.2.1.2.2. Cinétique de la polymérisation.

Le mécanisme de polymérisation fut élucidé par Eaton comme une réaction nécessitant la formation d'un noyau critique d'agrégats d'Hb pour que la polymérisation soit initiée (135). La formation de ce noyau requiert une période de latence (notion de « delay-time », t_d des anglo-saxons) (135). C'est le temps nécessaire pour qu'un certain nombre de molécules s'assemblent pour amorcer le processus.

Ce temps de latence, t_d , dépend des trois conditions, selon la formule suivante :

$$\frac{1}{t_d} = k \left(\frac{C_t}{C_s} \right)^n$$

avec :

C_t : concentration totale en HbS avant précipitation

C_s : solubilité d'HbS achevée

k : constante $\cong 10^{-7}$

n : constante variant entre 30 et 50

Le processus de polymérisation dépend donc énormément de la concentration en HbS.

La polymérisation se déroulerait selon deux mécanismes :

- **la germination homogène**

Si la concentration en HbS est suffisamment élevée, les molécules s'agrègent petit à petit pour former enfin un germe composé de m molécules. Ces agrégats ne sont vraiment stables que lorsque le germe s'est enfin formé. Ce germe croît ensuite pour former une fibre de polymères d'HbS.

Le temps de latence t_d est le temps nécessaire à la formation de ce germe.

- **la germination hétérogène**

Dès qu'une fibre est formée, elle peut faciliter la germination d'autres molécules d'HbS, jusqu'à la formation d'une autre fibre. Ce processus de polymérisation est donc auto-catalytique.

Ainsi les conditions de début de polymérisation constituent un facteur limitant mais une fois lancé, c'est un processus extrêmement rapide.

La polymérisation de l'HbS demande un certain délai d'initiation. Il y a donc une course de vitesse entre le temps de passage du globule rouge dans les capillaires et le temps de polymérisation qui transforme le globule rouge flexible en une cellule rigide susceptible de rester bloquée dans les vaisseaux. Cet aspect de la cinétique de la réaction peut expliquer partiellement pourquoi l'anémie falciforme se caractérise par des crises épisodiques, causées par des troubles de la circulation sanguine dus aux blocages de certains vaisseaux sanguins par les hématies falciformées par les amas de fibres d'HbS. Cependant, ces fibres se dissolvent automatiquement par oxygénation. De plus, une légère augmentation de la concentration C_t ou une légère baisse de la solubilité C_s (pouvant être dues à une déshydratation, à une hypoxie ou à de la fièvre) peuvent aboutir à une baisse significative du temps de précipitation t_d et ainsi causer une crise vaso-occlusive (CVO), qui ne fait qu'empirer la situation en réduisant le débit sanguin et le taux d'oxygène du sang (135, 451).

1.2.1.2.3. Effets de l'hémoglobine F sur la polymérisation

L'HbF a un effet bénéfique et protecteur dans la drépanocytose (363, 471).

Tout d'abord, L'HbF a la propriété d'inhiber la polymérisation de l'HbS en s'intercalant dans le polymère de désoxy-hémoglobine S, inhibant ainsi la progression de la

formation des fibres d'HbS et diminuant de ce fait la rigidité cellulaire (341, 405).

Cet effet bénéfique sur la polymérisation expliquerait les associations entre les taux d'HbF et l'inflammation, la peroxydation lipidique, le stress oxydatif et la dysfonction endothéliale(4, 55, 421). En effet, le taux d'HF était inversement proportionnel au taux de protéine C-reactive (CRP) et de biomarqueurs du stress oxydant (55). Kaul et al ont montré en 2004 que l'HbF était associée à une diminution du stress oxydant chez les souris drépanocytaires (239).

1.2.1.2.4. Les propriétés de l'hémoglobine C

L'Hémoglobine C (HbC) est l'une des trois formes les plus importantes d'hémoglobines anormales chez l'homme. Cette protéine se distingue par sa capacité à participer activement à la déshydratation du globule rouge et par ses propriétés à se cristalliser dans le cytoplasme (209, 322). La formation des cristaux tétraonaux en conditions d'oxygénation qui caractérisent l'oxyhémoglobine C'est un processus bien décrit, mais les voies de signalisation conduisant à ce phénomène ne sont pas encore élucidées (322). Il a été montré que les cristaux d'HbC ont tendance à s'estomper proportionnellement à la concentration d'HbF intracellulaire (322).

Les globules rouges (GR) contenant exclusivement de l'HbC sont microcytaires et hyperchromiques (322). Les GR des patients SC contiennent autant d'HbC que d'HbS et ont un rapport de surface/volume élevé (322). La forte densité de ces cellules est une caractéristique que l'on attribue à leur faible teneur en eau. Cette perte en eau s'explique par une activité élevée des co-transporteurs KCl qui catalyse la fuite d'ions K⁺. Ces phénomènes favorisent alors, la polymérisation d'HbS présente du fait de la

diminution du temps prérequis (delay-time), pour initier la polymérisation (72, 102, 318).

1.2.1.3. Conséquences de la polymérisation.

1.2.1.3.1. Les anomalies structurales du globule rouge

1.2.1.3.1.1. Anomalies des lipides

Les altérations lipidiques du globule rouge jouent un rôle dans la drépanocytose.

Les principaux lipides membranaires du globule rouge sont les phospholipides. Ils sont organisés en bicouche et jouent un rôle majeur dans sa structure mais aussi dans ses interactions avec les cellules circulantes et les facteurs de coagulation plasmatiques.

Ces phospholipides ont une localisation hétérogène au sein de cette bicouche membranaire :

- dans le feuillet externe, on retrouve la sphingomyéline (SM) et la phosphatidylcholine (PC)
- dans le feuillet interne, se trouvent la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS)

Un complexe enzymatique transmembranaire assure cette organisation (274) :

- la Translocase ou Flippase : assure le transport de la PS et de la PE de la couche externe vers la couche interne. Son action est inhibée par l'augmentation des ions Ca^{2+} .
- la Floppase : transporte les phospholipides de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane de façon non spécifique.
- la Scramblase : permet le mouvement bidirectionnel des phospholipides dans la

bicouche lipidique.

La PS qui appartient au feuillet interne, est externalisée lors de la sénescence des globules rouges et lors des phénomènes d'éryptose (148, 149) .

Dans la drépanocytose, les cycles de falciformation/défalciformation induisent une externalisation de la PS. Cette exposition de la PS à la surface du globule rouge a plusieurs conséquences.

Tout d'abord, La PS externalisée est un site de reconnaissance des globules rouges par les macrophages, qui les phagocytent. Une anémie d'origine extravasculaire en résulte (148).

Par ailleurs, la PS externalisée favorise la survenue de thromboses par l'activation de facteurs de la coagulation (facteurs V, X) (96).

Enfin, la PS externalisée favorise l'adhérence des GR à l'endothélium vasculaire d'une part, via la thrombospondine-1 (TSP-1), et d'autre part, via un récepteur spécifique à la PS exprimé sur la membrane des cellules endothéliales (280, 408).

1.2.1.3.1.2. Anomalie des protéines

Dans les globules rouges, on distingue deux types de protéines :

- les protéines de la membrane du globule rouge

Elles assurent différentes fonctions.

- On retrouve des protéines de transport : aquaporine, la protéine Glut-1, la

rhAG, la $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{++} \text{ATPase}$, les co-transporteurs $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, $\text{K}^+ - \text{Cl}^-$, et la protéine bande 3.

La protéine bande 3 est échangeuse d'anions transmembranaires. Elle doit son nom à sa position sur un gel d'électrophorèse et est présente sous la forme d'un dimère composé de deux sous-unités identiques qui traversent chacune la membrane au moins une douzaine de fois. La protéine bande 3 sert de canal pour le passage passif des ions bicarbonate et des ions chlorure de part et d'autre de la membrane érythrocytaire (213). Il s'agit d'un rôle clé dans le mécanisme général de transport du CO_2 (191). Elle présente des interactions avec l'hémoglobine dépendante de l'oxygène. Elle aurait une plus grande affinité pour la désoxy-hémoglobine que pour l'oxy-hémoglobine (75). Le domaine N-terminal de la protéine bande 3 s'insérerait à travers la cavité de fixation du 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) au milieu du tétramère de désoxy-hémoglobine, où les résidus 12-23 de la protéine bande 3 établiraient un contact majeur le long des parois de la désoxy-hémoglobine (75, 78, 98, 272, 346, 384, 456, 460).

- D'autres protéines sont impliquées dans l'adhérence cellulaire : VLA4, CD36, ICAM-4 et Lu.

- les protéines du cytosquelette du globule rouge

Ce sont : l'actine, la spectrine, la protéine 4.1, l'adducine, la tropomoduline, la tropomyosine, dématine et l'ankyrine.

-la spectrine et l'actine forment le réseau filamenteux principal du cytosquelette érythrocytaire.

-la protéine 4.1 stabilise les liaisons actine-spectrine.

-l'ankyrine permet la fixation du squelette membranaire à la face interne de la bicouche lipidique grâce à sa fixation sur la chaîne de spectrine et au fragment cytoplasmique de la bande 3.

Toutes ces protéines s'organisent en deux complexes membranaires : band 3-based macromolecular complex et le 4.1R-based macromolecular complex.

La protéine bande 3 participe à l'adhérence des globules rouges à l'endothélium vasculaire. Lors de la sénescence des globules rouges, l'hémoglobine se dénature engendrant la libération d'hémichromes qui participent à la formation d'agrégats de protéines bande 3. Les hémichromes entraînent aussi un démasquage du site de liaisons de ces agrégats à leurs anticorps IgG, permettant ainsi leur phagocytose par les macrophages (273, 400).

Le complexe macromoléculaire de la protéine bande 3 est attaché aux tétramères de spectrine via l'ankyrine. La partie restante de la protéine bande 3 se lie à la protéine 4.1 et à l'adducine pour former le complexe macromoléculaire de la protéine 4.1.

Le complexe macromoléculaire de la protéine 4.1 comprend de plus : la protéine p55, et les protéines transmembranaires : GPC, Rh, duffy, Kell et X.

Le rôle de la protéine 4.1 est multiple au sein de la membrane du globule rouge. Elle forme un complexe ternaire avec l'actine et la spectrine, formant les jonctions nodales du cytosquelette du globule rouge. De plus, sa liaison avec la protéine transmembranaire glycophorine C crée un pont entre le réseau protéique et la bicouche lipidique (394).

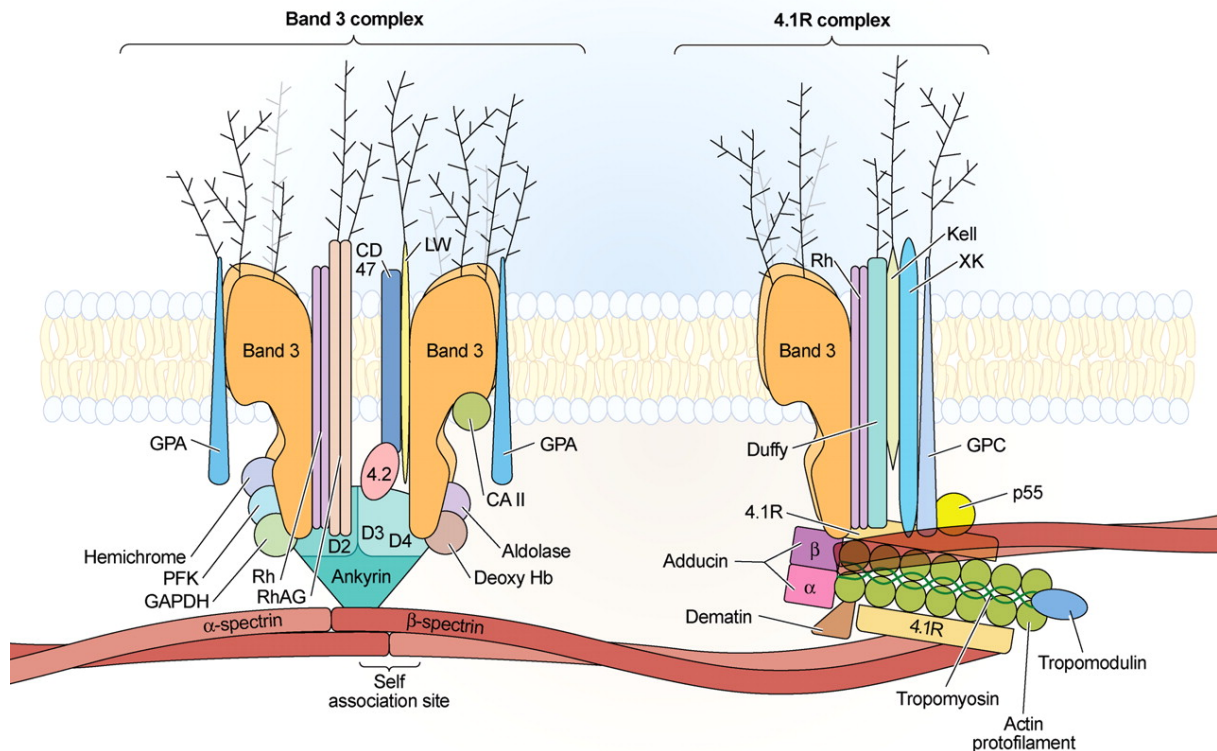


Figure 7. Les complexes protéiques membranaires (394).

1.2.1.3.2. Anomalies fonctionnelles du globule rouge

Les globules rouges drépanocytaires sont déshydratés, rigides et peu déformables.

1.2.2.1.3.2.1. Déshydratation du globule rouge

Dans la drépanocytose, la déshydratation du globule rouge résulte d'interactions complexes entre la polymérisation de l'hémoglobine S et plusieurs transporteurs de cations présents dans ces cellules. Il existe en fait une perte en potassium. Cette fuite du potassium est la conséquence de plusieurs processus :

- L'activation excessive du co-transporteur K-Cl.

Ce co-transporteur est activé en cas de diminution de la concentration intra-érythrocytaire en Mg^{2+} . Or, la perméabilité membranaire au magnésium est accrue dans le globule rouge drépanocytaire (157). Le co-transporteur, K-Cl Mg^{2+} dépendant, ainsi activé de façon excessive, outrepassa sa fonction première de régulation de la concentration en hémoglobine ; ce qui conduit à la falciformation (224).

- L'activation du canal Gardos.

En situation de désoxygénation, la polymérisation de l'hémoglobine S engendre une fuite non sélective de cations dans une partie des cellules drépanocytaires. Ainsi, dans ces cellules falciformées, l'entrée du calcium, active les canaux Gardos canaux potassique-calcium dépendants par lesquels se produit une fuite d'eau et de potassium (15, 163, 224).

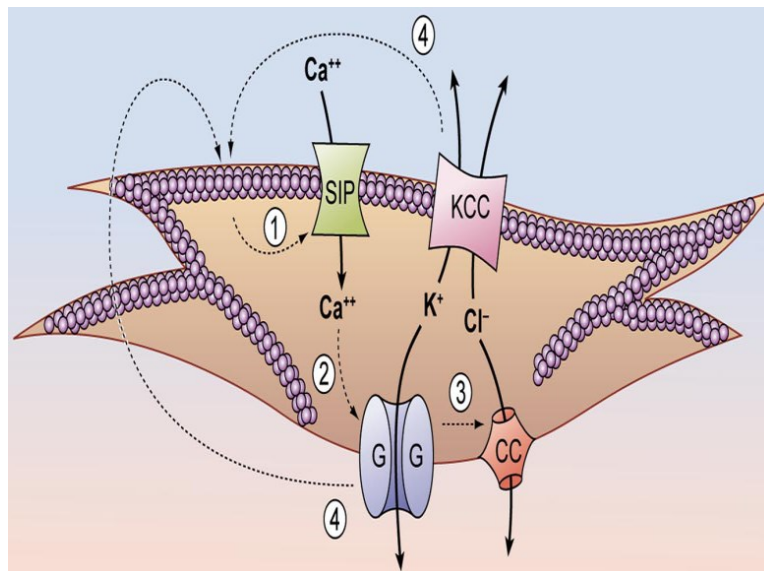


Figure 8. Les co-transporteurs impliqués dans la déshydratation du globule rouge.

(SIP: Sickle Induced Pathway, KCC: co-transporteur K-Cl, CC: conductance pathway, G: Gardos channel) (224).

La déshydratation du globule rouge résultant de ces phénomènes engendre une augmentation de la concentration en hémoglobine. Ce qui favorise la polymérisation de l'hémoglobine S et la falciformation.

1.2.1.3.2.2. Anomalies hémorhéologiques

Les globules rouges drépanocytaires sont rigides et peu déformables (34). Cette caractéristique ainsi que d'autres anomalies des éléments figurés du sang associées à la drépanocytose vont entraîner des altérations hémorhéologiques. La rhéologie est la branche de la mécanique étudiant la résistance des matériaux aux contraintes et aux déformations. L'hémorhéologie étudie le sang : son écoulement et les propriétés biophysiques des éléments qui le composent.

La rhéologie classe les fluides en deux grands groupes :

- **les fluides newtoniens** dont la viscosité est indépendante de la vitesse ou contrainte de cisaillement appliquée. On parle de viscosité absolue. Elle n'est fonction que de la température et de la pression extérieures. C'est le cas de l'eau, du plasma et de la plupart des solvants.

- **les fluides non newtoniens** dont la viscosité varie avec la vitesse et la contrainte de cisaillement. C'est le cas du sang. Il existe deux types de liquides non newtoniens :

- Les fluides rhéo-fluidifiants, comme le sang, dont la viscosité apparente diminue avec l'élévation de la vitesse de cisaillement.

- Les fluides rhéo-épaississants dont la viscosité apparente augmente

avec l'élévation de la vitesse de cisaillement.

Au-delà de ses caractéristiques non-newtoniennes et rhéo-fluidifiantes, le sang possède également des propriétés visco-élastiques (il est caractérisé par la présence d'un seuil d'écoulement en dessous duquel il ne s'écoule pas) et thixotropes (il a la capacité de se fluidifier sous l'effet d'un cisaillement constant au cours du temps et de se restructurer après un certain temps de repos).

Portons notre attention sur trois propriétés en hémorhéologie : la viscosité du sang, la déformabilité et l'agrégation des globules rouges.

1.2.1.3.2.2.1. Viscosité sanguine

La viscosité sanguine varie en fonction de l'hématocrite (401). Plus l'hématocrite est élevé, plus la viscosité sanguine augmente. L'effet de l'hématocrite sur la viscosité sanguine est plus important à faible cisaillement (un hématocrite élevé va favoriser la formation d'agrégats érythrocytaires). A cisaillement élevé, une augmentation de 1 point de l'hématocrite se traduit par une augmentation de 4% de la viscosité sanguine pour un sang dont les autres propriétés hémorhéologiques (déformabilité et agrégabilité érythrocytaire, viscosité plasmatique) restent inchangées (39).

Les drépanocytaires homozygotes SS, du fait de l'anémie dont ils sont sujets, ont une viscosité sanguine généralement plus faible que celle observée chez les sujets sains (92).

En revanche, les hétérozygotes SC présentent une viscosité sanguine à hématocrite natif supérieur à celui des sujets sains, car l'anémie plus modérée de ces patients ne permet pas de compenser les autres anomalies hémorhéologiques observées dans la

maladie (447).

Cependant, à hémocrite comparable, la viscosité sanguine des drépanocytaires homozygotes SS est supérieure à celle des sujets sains du fait de la rigidité accrue de leurs globules rouges (88, 92, 401). Il existe aussi une hyperviscosité plasmatique chez les patients drépanocytaires SS, cette élévation de la viscosité plasmatique étant notamment liée à l'élévation de la concentration en fibrinogène circulant (112).

Dans la drépanocytose, il existerait une association étroite entre l'élévation de la viscosité sanguine et la survenue de CVO chez les homozygotes SS, d'ostéonécroses chez les drépanocytaires SS et SC et de rétinopathies proliférantes chez les hétérozygotes SC (255, 263, 270, 333). Charlot et Al ont rapporté une corrélation positive entre le taux de CVO et la viscosité sanguine chez des enfants homozygotes SS. Du fait de la dysfonction vasculaire chronique, toute augmentation de la viscosité sanguine se traduit par un risque accru de déclencher une CVO dans cette population (88).

Deux propriétés rhéologiques des globules rouges décrites ci-dessous modulent la viscosité sanguine : la déformabilité et les propriétés d'agrégation/désagrégation érythrocytaire.

1.2.1.3.2.2.2. Déformabilité érythrocytaire

La déformabilité des globules rouges en réponse à l'application de la force d'un fluide est un phénomène complexe et dépend de trois caractéristiques cellulaires : les propriétés membranaires, la géométrie de la cellule (rapport surface/volume) et la viscosité cytoplasmique (304, 307). Les globules rouges des patients drépanocytaires

sont caractérisés par une déformabilité érythrocytaire réduite par rapport à celle des sujets sains (62, 92, 235, 304, 307, 447). Dans la drépanocytose, il a été montré qu'une modification de l'un ou l'autre de ces paramètres pouvait être responsable d'une diminution de la déformabilité du globule rouge (34, 142, 143).

Grâce à l'ecktyctométrie, Clark et al ont étudié la déformabilité des globules rouges drépanocytaires. Ils concluent que la déshydratation du globule rouge et l'élévation de la viscosité cytoplasmique en résultant seraient impliqués dans la rhéologie anormale des hématies drépanocytaires oxygénées (101). D'autres études ont montré que la perte d'élasticité membranaire et la diminution de la stabilité membranaire contribueraient à l'altération de la déformabilité des globules rouges drépanocytaires (154, 297).

De nombreuses études font état d'une diminution de la déformabilité des globules rouges drépanocytaires en conditions oxygénées (53, 92, 101, 141, 198, 328, 402, 449). En condition désoxygénées, la diminution de la déformabilité des globules rouges est accrue dans la drépanocytose de par la formation de cellules falciformées consécutive à la polymérisation de l'HbS (329, 425).

La déformabilité érythrocytaire conditionne le flux sanguin dans les vaisseaux et notamment dans la microcirculation (39). Les globules rouges ont un diamètre supérieur à celui des petits vaisseaux sanguins. Il est donc indispensable que ces cellules puissent se déformer afin de circuler dans les capillaires sanguins. Ballas et ses collaborateurs ont montré que la déformabilité érythrocytaire était inversement proportionnelle au nombre de cellules denses (35). On distinguerait deux phases d'évolution de la déformabilité érythrocytaire au cours d'une CVO : durant la première phase d'accroissement de la douleur, la déformabilité diminue et le nombre de cellules

denses augmente, durant la deuxième phase au cours de laquelle la douleur décroît, la déformabilité augmente et le nombre de cellules denses baisse. Les mécanismes à l'origine des modifications de déformabilité et de numération des cellules denses restent mal compris. L'une des hypothèses serait qu'il pourrait y avoir un blocage des hématies falciformées déformables dans la microcirculation, laissant dans la macrocirculation les drépanocytes irréversibles rigides et moins déformables (35, 145). D'autres études ont montré que des globules rouges déformables en suspension dans du plasma hépariné citraté étaient quatre à cinq fois plus adhérents à l'endothélium que les drépanocytes irréversibles rigides (145, 305, 306). Ballas et ses collaborateurs ont montré que plus les GB étaient déformables, plus leur adhérence à l'endothélium vasculaire augmentait et plus ils pourraient être de ce fait responsable de la survenue d'une CVO (35, 255).

De nombreuses études font état d'une déformabilité différentes des globules rouges selon les complications physiques étudiées. Glomérulopathies et ulcères de jambes seraient associées à une déformabilité érythrocytaire réduite (113, 254). Par contre, une déformabilité augmentée associée à la présence d'une alpha-thalassémie serait un facteur de risque d'ostéonécroses (265). L'altération de la déformabilité érythrocytaire pourrait ralentir le flux sanguin dans la microcirculation, augmentant ainsi le risque d'accident vasculaire cérébral notamment dans les petits vaisseaux (52, 116). Connes et ses collaborateurs ont également montré que dans la drépanocytose, un taux élevé d'hémolyse était associé à une diminution de la déformabilité des GR (114).

1.2.1.3.2.2.3. Agrégation érythrocytaire

L'agrégation érythrocytaire est un processus physiologique se produisant en condition de faible cisaillement ou de stase, au cours duquel les globules rouges s'empilent les uns sur les autres pour former des structures en trois dimensions appelés « rouleaux » linéaires, similaires à des piles de pièces de monnaie. Ce phénomène requiert peu d'énergie et est réversible (112, 374). Les veines et veinules post-capillaires présentent de faibles contraintes de cisaillement. C'est donc dans ces compartiments vasculaires que l'agrégation des globules rouges peut se produire. À contrario, les agrégats de globules rouges peuvent se désagréger dans les compartiments vasculaires à fort taux de cisaillement tels que les artères, les artérioles et les capillaires (40). L'agrégation des globules rouges dépend de la présence de macromolécules dans le milieu de suspension (fibrinogène, macroglobulines) (40). Le fibrinogène est une macromolécule très importante pour la formation d'agrégats érythrocytaires dans le sang. Il en est de même pour les propriétés de surface du globule rouge (surface disponible, charge de surface, épaisseur du glycocalyx) (39, 374, 378). Deux théories existent afin d'expliquer l'agrégation des GR : d'une part, le « bridging », mécanisme au cours duquel une protéine ou un polymère est capable de rentrer en contact avec deux cellules et de produire une force d'attraction ; d'autre part, la déplétion au cours de laquelle la concentration de la protéine ou du polymère au voisinage de la surface du GR est inférieure à leur concentration en suspension dans le milieu, et de ce fait, les forces osmotiques éjectent les liquides des liaisons intercellulaires, et produisent ainsi une force attractive. S'il reste encore difficile de faire la part des choses entre ces deux hypothèses, de récentes études tendent à privilégier la théorie de la déplétion (40, 338–340).

Par rapport aux sujets sains, Tripette et al ont rapporté une agrégation et une

déformabilité réduite chez les patients drépanocytaires (447). En revanche, bien que l'agrégation érythrocytaire soit réduite dans la drépanocytose (formes SS et SC), le seuil de désagrégation érythrocytaire (c'est à dire la force nécessaire pour dissocier des agrégats de globules rouges) était 2,5 à 3 fois supérieur chez les drépanocytaires par rapports à des individus sains. Dans leur étude, le taux de fibrinogène chez les sujets drépanocytaires était comparable à celui des sujets sains, ce qui confirme le rôle joué par les propriétés de surface du globule rouge dans le processus d'agrégation érythrocytaire. Ils avancent également que le stress oxydant pourrait également être impliqué dans ce processus (201, 447).

Lamarre et al ont mis en évidence une association entre anomalies de la désagrégation érythrocytaire et la survenue de syndrome thoracique aigu d'une part et de glomérulopathies d'autre part (255, 320). Une augmentation de la force des agrégats érythrocytaires pourrait perturber le flux sanguin au niveau pré-capillaire, perturbant ainsi l'approvisionnement en oxygène résultant ainsi en dommages tissulaires et dysfonctionnement des organes (112, 114, 264).

1.2.2. Après la polymérisation de l'hémoglobine

La polymérisation de l'hémoglobine S est le mécanisme primaire de la vaso-occlusion et a pour conséquence la falciformation des globules rouges.

1.2.2.1. Falciformation

1.2.2.1.1. Causes déclenchant la falciformation

Initialement réversible, la formation de polymères de désoxyHbS cesse de l'être au

bout de quelques cycles d'hypoxie/réoxygénation, au cours desquels, l'association des polymères en fibres selon un processus auto catalytique devient irréversible (37). Les hématies prennent alors une forme de faucille, et sont moins déformables. Cette « falciformation » rend difficile leur passage dans les vaisseaux de la microcirculation, tels que les capillaires, de diamètre inférieur aux leurs. La diminution de la déformabilité des hématies induit une augmentation de la viscosité sanguine. A contrario, cette diminution de la déformabilité des GR les fragilise. Devenus plus sensibles à l'hémolyse, leur durée de vie n'est plus que d'une dizaine de jours au lieu de 120. L'anémie hémolytique chronique qui en résulte dérégule l'érythropoïèse, en libérant notamment des populations érythrocytaires jeunes de stress (réticulocytes de stress), proadhérentes aux parois vasculaires. Ces nouvelles caractéristiques hématologiques participent à la vaso-occlusion aboutissant à l'ischémie des tissus (37, 291, 292).

1.2.2.1.2. Pérennisation de la falciformation : le cercle vicieux

La falciformation érythrocytaire est le *primum movens*, mais il est insuffisant pour expliquer l'ensemble des désordres et ce sont ses conséquences sur le plan vasculaire qui font toute la sévérité de la maladie. L'adhérence et la rigidité des GR falciformés perturbent le flux sanguin. En ralentissant le débit sanguin, ils augmentent la durée du transit cellulaire dans les capillaires favorisant ainsi, la stase, l'hypoxie, l'acidose et donc la polymérisation de l'HbS (236).

En conséquence, le temps nécessaire à ce processus devient inférieur à celui du transit des GR dans la circulation (237). Ils auto-entretiennent les troubles qui sont à

l'origine de leur formation. De plus, les CVO consécutives sont entretenues par l'adhérence des érythrocytes à l'endothélium vasculaire. De nombreuses études font état d'une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion endothéliales : vascular cell adhesion protein -1 (VCAM-1), Intercellular adhesion molecule-1, P-selectin, E-selectin, Leucocyte surface antigen CD47, $\alpha V\beta 3$ Integrin, protéoglycane heparine sulfate, phosphatidylsérine qui sont responsables de l'adhérence des érythrocytes et des leucocytes. Les cellules endothéliales activées produisent également des médiateurs de l'inflammation tels que IL-1 β , IL-6, le facteur de nécrose tumoral (TNF) participant à un état inflammatoire chronique (90, 233, 356).

1.2.2.1.3. Facteurs favorisant la falciformation

Ce sont : la baisse de la pression en oxygène, l'acidose (contribuant à augmenter la concentration d'Hb dans le GR), la déshydratation (la perte d'eau du GR entraîne l'hyperviscosité) et l'élévation de la température (à l'origine de la déshydratation) (8, 54, 256, 441).

Ceci explique son intensité dans certains tissus (rate, médullaire rénale) et au cours des infections.

1.2.2.2. Adhérence vasculaire

1.2.2.2.1. Notion de « delay time » - « temps de latence »

Comme nous venons de le voir, le primum movens de la CVO est la polymérisation de

l'hémoglobine S. Elle conduit à la falciformation.

Cependant cette polymérisation nécessite un temps de latence supérieur au temps nécessaire au passage des globules rouges dans la microcirculation. Les hématies devraient donc avoir le temps de revenir au niveaux des gros vaisseaux avant la formation de fibres de désoxyHbS (315). D'autres facteurs conduisent à un ralentissement de la circulation des hématies, permettant leur falciformation au sein de la microcirculation : l'adhérence des globules rouges et les interactions entre endothélium vasculaire et cellules circulantes.

1.2.2.2.2. Interactions entre globules rouges et cellules endothéliales

1.2.2.2.2.1. Hétérogénéité des globules rouges dans la drépanocytose

Il existe une hétérogénéité des populations érythrocytaires dans la drépanocytose. Des études sur la séparation des GR par gradient de densité ont permis de mettre en évidence ces différentes classes, d'importance variable d'un patient à l'autre. Kaul *et al* ont retrouvés un enrichissement de 4 principales fractions de viscosité et de densité croissantes, leur densité étant corrélée à l'augmentation de leur concentration corpusculaire moyenne d'Hb (237). En suivant le gradient, celles-ci sont composées de réticulocytes, de discocytes, de discocytes denses et de drépanocytes irréversibles (DI) (146).

Comme nous l'avons dit plus haut, l'état hémolytique régnant dans la drépanocytose conduit à la formation de réticulocytes sortis précocement de la moelle osseuse et immatures. Ce sont des « réticulocytes de stress ».

On peut noter deux grandes étapes dans la survenue des CVO : adhérence des réticulocytes de stress et des globules rouges matures puis leur blocage secondaire à la falciformation et à la formation de drépanocytes irréversibles.

Chacune des populations érythrocytaires porte à sa surface des récepteurs permettant l'adhérence vasculaire.

1.2.2.2.2. Les marqueurs des réticulocytes

Les réticulocytes libérés dans la circulation portent les protéines de surface VLA-4 et CD36 qui leur confèrent un phénotype pro-adhérent. Ces protéines de surface viennent se lier aux cellules endothéliales (69, 226, 440).

- CD36 : La molécule CD36 du réticulocyte se lie à la molécule CD36 endothéliale via un pontage par la thrombospondine-1. La thrombospondine-1 (TSP-1) est une protéine plasmatique produite par les plaquettes activées. Leur taux est élevé chez les drépanocytaires (69, 438).
- VLA-4 : Elle se lie à VCAM-1, molécule exprimée au niveau des cellules endothéliales activées par les cytokines. Elle se lie également à la fibronectine du plasma et de la matrice extra-cellulaire.

Dans la drépanocytose, VLA-4 favorise l'adhérence des globules rouges aux cellules endothéliales non seulement via VCAM-1 et la fibronectine mais aussi par l'intermédiaire d'autres ligands comme TSP-1 et Lu-BCAM (66, 166, 336, 337, 442, 444).

1.2.2.2.3. Marqueurs des globules rouges matures

L'adhérence des globules rouges matures aux cellules endothéliales est accrue via plusieurs molécules :

- **CD 47 ou IAP (Integrin-Associated Protein)** : c'est une macromolécule transmembranaire dont la fonction est à la fois d'être un site de liaison de la thrombospondine mais aussi un récepteur agoniste en réponse à la thrombospondine soluble. IAP, liée à la TSP qui active les plaquettes, les cellules T matures et les neutrophiles. IAP est à la fois exprimé sur les GR normaux et drépanocytaires mais seuls les GR SS interagissent avec la thrombospondine immobilisée (66, 68).
- **CD44** : c'est une protéine transmembranaire dont le principal récepteur est le hyaluronate. Elle se lie également à la fibronectine, la laminine, les fibrilles de collagène de type 1, l'ostéopontine. On la retrouve sur tous les types cellulaires à l'exception des plaquettes et des hépatocytes. Aussi bien exprimée chez les patients SS que des sujets AA, elle est impliquée dans l'adhérence des GR mais aussi des polynucléaires neutrophiles à la fibronectine des sujets drépanocytaires (230, 448). Par ailleurs, elle permet l'agrégation des lymphocytes sur les cellules endothéliales (230, 448).
- **ICAM-4 (Intracellular Adhesion Molecule-4)** : Il s'agit d'une immunoglobuline exprimée par les cellules érythroïdes. Elle se lie aux réticulocytes via $\alpha 4\beta 1$ mais aussi aux plaquettes via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Elle est exprimée de façon plus importante par les GR SS que par les AA et participe à leur adhérence accrue aux cellules endothéliales (426, 473).
- **BCAM-Lu (Basal Cell Adhesion Molecule - Lutheran blood group)** située à la surface des GR-SS interagit avec la laminine de la matrice sous-endothéliale (348).

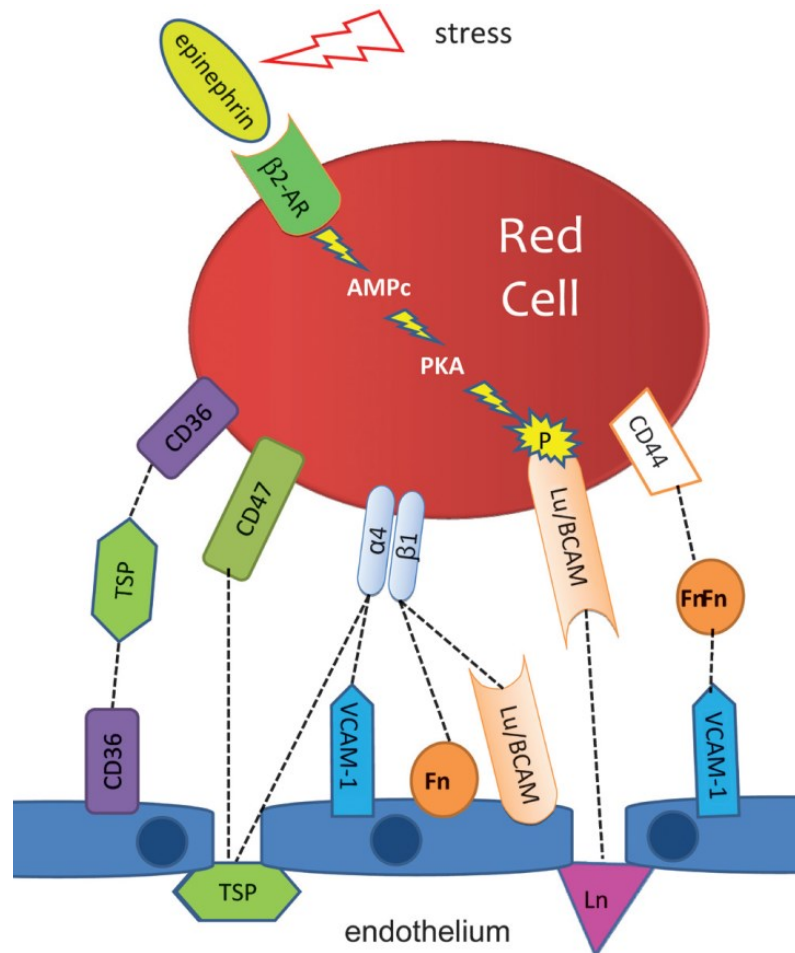


Figure 9. Adhérence et activation des globules rouges à l'endothélium dans la drépanocytose (348).

1.2.2.2.3. Interactions entre leucocytes et cellules endothéliales

Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la drépanocytose. Par rapport aux sujets sains, il existe chez les drépanocytaires une expression accrue de molécules d'adhésion par les neutrophiles les rendant plus sensibles aux stimuli inflammatoires :

- la L-sélectine
- l'intégrine $\alpha M \beta 2$

- l'intégrine $\alpha\text{L}\beta 2$.

Ces molécules présentent une expression augmentée chez les patients drépanocytaires (50, 147, 350). Leurs ligands au niveau des cellules endothéliales incluent les molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1, les sélectines E et P (350).

La séquestration des neutrophiles dans la microcirculation est la première étape du recrutement des neutrophiles dans l'inflammation et participe aux crises CVO.

Koehl et al ont récemment montré en 2017 que l'endothéline-1 était impliquée dans ce processus via deux récepteurs ET_A et ET_B . Les neutrophiles exprimeraient des récepteurs ET_B -calcium dépendants conduisant à leur adhérence accrue à l'endothélium. Les neutrophiles synthétiseraient aussi de l'endothéline-1 et contribueraient ainsi aux taux élevés d'endothéline-1 chez les sujets drépanocytaires (248).

Les leucocytes expriment à leur surface d'autres molécules d'adhérence : L-sélectine, intégrine $\alpha\text{M}\beta 2$, intégrine $\alpha\text{L}\beta 2$ qui sont retrouvés de façon importante chez les patients drépanocytaires (147, 248, 350). Ces molécules ont pour ligand au niveau des cellules endothéliales : ICAM1, VCAM-1, E et P-sélectines (350).

1.2.2.2.4. Les plaquettes

La place exacte des plaquettes dans les crises vaso-occlusives drépanocytaires n'est pas encore bien comprise. Mais plusieurs études démontrent qu'elles jouent un rôle dans l'augmentation de l'adhérence vasculaire.

Il semblerait que les plaquettes participent à l'adhérence cellulaire en augmentant l'adhérence des érythrocytes à l'endothélium vasculaire via la libération de molécules tels que la TSP (65). Par ailleurs, en 1990, Antonucci a retrouvé une adhérence accrue

entre globules rouges matures et cellules endothéliales des veines ombilicales en présence des plaquettes (14). De plus, Il a été montré chez les souris drépanocytaires que l'adhérence des plaquettes aux cellules endothéliales étaient accrue (466). Par ailleurs, il y aurait une augmentation des molécules et des récepteurs d'adhérence en cas d'activation des plaquettes (90, 470). *In vitro*, plusieurs auteurs ont montré des adhérences entre plaquettes et monocytes d'une part, et entre plaquettes et globules rouges d'autre part chez les patients drépanocytaires (67, 469).

.2.2.2.5. Interactions entre globules rouges et monocytes et polynucléaires neutrophiles.

Des études ont montré que les globules rouges drépanocytaires adhèrent de façon anormale aux monocytes et aux polynucléaires neutrophiles (83, 91, 211, 404). Cette adhérence se produit via Lu-BCAM érythrocytaire et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ monocyttaire (81). Ils formeraient ainsi des agrégats participant à la survenue d'accidents vaso-occlusifs. Et ce, d'autant plus qu'il existerait dans la drépanocytose des leucocytes moins déformables, de plus grand diamètre, avec une adhérence accrue perturbant ainsi le flux sanguin intravasculaire, concourant à la vaso-occlusion (90).

1.2.2.3. Activation cellulaire

1.2.2.3.1. Phénotype pro-inflammatoire

L'inflammation est une réponse de défense des organismes vivants, vascularisés, à une agression.

L'inflammation joue un rôle primordial dans la physiopathologie de la drépanocytose comme en témoigne l'hyperleucocytose chronique (93, 136, 367, 462).

Ces leucocytes présentent une demi-vie raccourcie. Les monocytes activés, activent à leur tour les cellules endothéliales. Il existe de ce fait un état vasculaire inflammatoire chronique dans la drépanocytose (46, 56, 257, 367). Chies et al ont également retrouvé une augmentation de la phagocytose dans la drépanocytose (93).

Les occlusions provoquées, et répétées, par l'adhérence des GR aux cellules endothéliales entraînent une réponse du type ischémie-reperfusion avec des signaux déclenchant l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui contribue à l'expression de facteurs pro-inflammatoires provoquant une activation vasculaire chronique avec la stimulation de l'expression de molécules endothéliales d'adhérence (90).

Les leucocytes utilisent des médiateurs de l'inflammation :

- les chimiokines, protéines activatrices des leucocytes présentant des propriétés chimiotactiques attirant ces cellules au site même de l'inflammation.
- les cytokines, protéines sécrétées par les leucocytes assurant la communication intercellulaire.
- les molécules d'adhérence.

Les cytokines inflammatoires augmentent la capacité d'adhérence des leucocytes (118, 158).

En fait, l'endothélium vasculaire est activé par l'hypoxie, les infections et les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL6) (90, 93). Ces cytokines activent à leur tour les leucocytes qui activent à leur tour l'endothélium vasculaire. Il existe donc un cercle vicieux.

Cette activation de l'endothélium vasculaire et des leucocytes induit une expression et une activation accrue des molécules d'adhérence que sont les intégrines, les

sélectines, ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule), favorisant de ce fait le risque de survenue d'obstruction vasculaire et VCAM-1 (93).

VCAM-1 est considéré comme un marqueur d'inflammation et/ou d'athérosclérose. VCAM-1 est exprimé par les cellules endothéliales sous l'influence de stimuli inflammatoires (409). En effet, dans des conditions physiologiques, VCAM-1 n'est que rarement présent sur les cellules endothéliales non activées (21, 203). Solovey et al ont montré que les patients drépanocytaires présentaient une augmentation du taux de VCAM-1 circulant (423). Ceci confirme le caractère inflammatoire et d'activation endothéliale de la drépanocytose.

1.2.2.3.2. Phénotype pro-coagulant

Dans la drépanocytose, il existe un état d'hypercoagulabilité. Au niveau clinique, il existe un risque augmenté d'accidents thromboemboliques artériels et veineux tels que les syndromes thoraciques aigus ou les accidents vasculaires cérébraux et d'hypertension artérielle pulmonaire (203, 208, 445). Les accidents vasculaires cérébraux peuvent-être secondaires à la formation de caillots, mais elles semblent le plus souvent provenir d'une altération progressive de la paroi artérielle évoluant vers la sténose provoquant un ralentissement et une stase de la circulation sanguine (432, 458). Ceci aboutit alors à l'obstruction d'un vaisseau sanguin.

Cet état pro-coagulant, pro-thrombogène et anti-fibrinolytique résulte de plusieurs phénomènes incluant une activation et une altération de l'endothélium, une diminution de l'antithrombine III et des protéines C et S (inhibitrices de la coagulation) (463), une activation plaquettaire et une augmentation du taux de facteur de Von Willebrand (nécessaire à l'adhérence des plaquettes au cours de l'hémostase primaire). Le facteur tissulaire est également augmenté chez les patients drépanocytaires (422). Il

a été montré que l'hémolyse et la déplétion chronique en NO conduiraient à l'activation plaquettaire et contribuerait ainsi à un état d'hypercoagulabilité (268, 364, 450).

De plus, les microparticules, fragments de membrane plasmique libérés par les cellules activées ou apoptotiques sont retrouvées à des taux élevés chez les patients drépanocytaires (57, 277, 332). Or, les microparticules sont considérées comme des marqueurs pathogènes du risque thrombotique (310). Les microparticules circulantes dérivées des plaquettes externalisent la phosphatidylsérine (PS) membranaire et expriment pour certaines d'entre-elles le facteur tissulaire (FT), deux molécules pro-thrombotiques et pro-coagulantes (354, 414). Les microparticules dérivées des plaquettes pourraient être un marqueur de sévérité du phénotype vaso-occlusif (332).

1.2.3. Monoxyde d'azote et tonus vasculaire

1.2.3.1. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène, un radical libre libéré par les cellules endothéliales, les macrophages, les hépatocytes et les neurones. Il est synthétisé par les NO-synthases à partir de la L-arginine et l'oxygène. Il existe trois isoformes de NO-synthases : neuronales, inductibles et endothéliales (5).

Au niveau de l'endothélium vasculaire, le NO diffuse et active la Guanylate cyclase soluble des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. Ceci entraîne la production de GMP-cyclique, second messenger du NO, dont le relargage induit une cascade de phosphorylation des protéines impliquées dans le recaptage et l'extrusion du calcium, induisant la relaxation de la cellule musculaire lisse, et *in vivo*, la vasodilatation et une augmentation du débit sanguin (140).

Le NO de l'endothélium vasculaire a également d'autres rôles : il diminue l'expression des récepteurs d'adhérence et l'expression de l'endothéline-1 (60, 467). Par ailleurs, il inhibe l'agrégation plaquettaire et améliore la déformabilité des globules rouges (58, 185, 295, 370). La diminution de la biodisponibilité du NO dans la drépanocytose participerait à l'altération de la déformabilité des globules rouges (184, 246, 314).

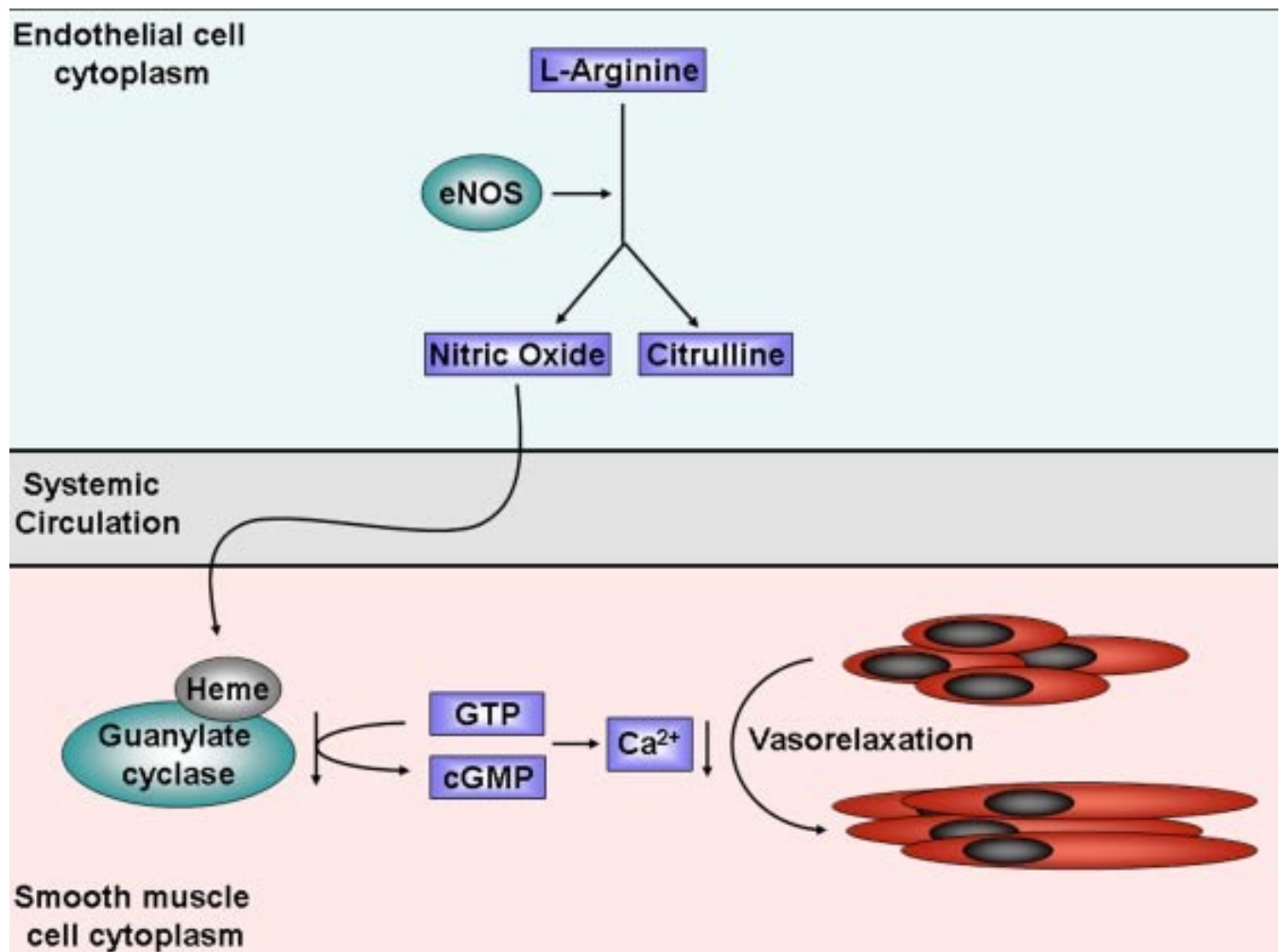


Figure 10. Synthèse de NO par la NO-synthase et effet sur les cellules musculaires lisses. La L-Arginine est convertie en NO et citrulline par l'action de la NO-synthase endothéliale. Au niveau de l'endothélium vasculaire, le NO diffuse et active la Guanylate cyclase soluble des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire. Ceci entraîne la production de GMP-cyclique, dont le relargage induit l'extrusion du calcium, induisant la relaxation de la cellule musculaire lisse (5).

1.2.3.2. Endothéline-1

L'endothéline 1 (ET-1) est un neuropeptide sécrété par l'endothélium vasculaire, ayant un effet vasoconstricteur puissant sur les cellules musculaires lisses. Identifié en 1985, par son effet vasoconstricteur important et durable, l'ET-1 est le plus puissant vasoconstricteur connu. Il existe trois isopeptides d'endothéline (ET-1, ET-3 et ET-4), chacun étant produit par différents gènes. L'expression de ces gènes peut être stimulée par de nombreux facteurs tels que l'hypoxie, la présence de cytokines pro-inflammatoires, la thrombine, l'hémoglobine, les facteurs de nécrose tumorale $\text{TNF-}\alpha$ et $\text{TGF-}\beta$ et peut être inhibée par le NO et le GMPc (60, 390).

Les effets de l'endothéline-1 passent par sa fixation sur deux récepteurs : ET-A et ET-B. ET-A est surtout exprimé au niveau des cellules musculaires lisses et participe à leur contraction. ET-B est également présent au niveau de l'endothélium vasculaire des cellules musculaires lisses (302).

La stimulation des deux récepteurs de l'endothéline-1 induit une contraction des cellules musculaires lisses dépendant de la concentration extracellulaire en calcium. L'augmentation de la concentration en calcium active une protéine Kinase C qui diminue l'activité de la phosphatase des MLCP (Myosin-Light-Chain Phosphatase) favorisant la phosphorylation de la myosine et donc la contraction. Par contre, le récepteur ET-B présent sur l'endothélium vasculaire inhibe la contraction musculaire puisque sa stimulation active la NO Synthase endothéliale et induit la production de NO, et donc une vasodilatation (2, 247).

L'ET-1 module aussi l'activité des globules rouges (386). En effet, il a été démontré d'abord chez les souris, puis chez les êtres humains que les globules rouges

présentaient des récepteurs à l'endothéline-1, ET-B (276, 385). Ces récepteurs à l'ET-1 activeraient les canaux Gardos (385). Or il a été montré que ces derniers ainsi que les co-transporteurs K-Cl⁻, constituent les deux principales voies à l'origine de la déshydratation du globule rouge (70, 71).

1.2.3.3. Monoxyde d'azote et endothéline-1 dans la drépanocytose

Dans la drépanocytose, il existe un état pro-vasoconstrictif favorisant la survenue de crises vaso-occlusives.

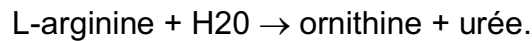
A noter tout de même que Belhassen et ses collaborateurs ont montré qu'il existe dans la drépanocytose une vasodilatation chronique engendrée par la libération de NO par l'endothélium. De ce fait, il existe une incapacité de artères musculaires notamment à adapter de façon supplémentaire leur diamètre à un stress de cisaillement résultant de plusieurs mécanismes : altération de la synthèse et/ou de la libération du NO, accélération de sa dégradation, anomalies de la voie de transduction du signal endothélial (responsable de l'activation de la NO-synthase endothéliale) (49).

Tout d'abord, le taux plasmatique d'ET-1 est anormalement élevé à l'état basal chez les patients drépanocytaires. Sabaa et al ont démontré en 2008 que l'inhibition des récepteurs de l'ET-1 prévenait la survenue de CVO chez la souris (392).

De plus, les sujets drépanocytaires présenteraient un état de « résistance au NO » occasionnant une dysfonction endothéliale. Cette résistance au NO résulterait notamment d'une diminution de sa biodisponibilité (5, 240).

Cette diminution de la biodisponibilité résulte de plusieurs phénomènes :

- L'hémolyse intravasculaire. Elle entraîne la libération d'arginase. Celle-ci catalyse la réaction :



Or la L-arginine est utilisée par les NO-Synthase dans la synthèse du NO. Donc en catabolysant la L-arginine, l'arginase diminue la synthèse de NO et donc sa biodisponibilité.

- La destruction chronique des globules rouges entraîne une libération d'hémoglobine dans le plasma. Celle-ci capte le monoxyde d'azote pour le transformer en nitrate et induit de ce fait une diminution de sa biodisponibilité.

Le NO réagit avec les radicaux libres produits par le stress oxydant pour former des produits stables inhibant les réactions avec H_2O_2 , limitant ainsi le stress oxydant. Il réagit avec les radicaux libres plus rapidement que la superoxyde dismutase, et induit la synthèse d'hème-oxygénase-1 qui élimine l'hème libre et prévient la formation de radicaux libres toxiques (5, 133).

Cependant, le NO participe aussi au stress nitrosatif. En effet, la réaction du NO avec l'anion superoxyde génère du peroxynitrite (ONOO^-), puissant oxydant et responsable en majeure partie de la toxicité du NO. Le peroxynitrite réagit avec les protéines telles que l'Hb en convertissant l'hème ferreux dans sa forme ferrique. Il réagit aussi avec les résidus cystéine entraînant la formation de radicaux « Thiyl » augmentant encore le stress oxydatif (5).

Ainsi, la diminution de la biodisponibilité induite par ces processus, entraîne un

dysfonctionnement de l'endothélium avec diminution de la réserve vasomotrice et augmentation de la vasoconstriction.

Par ailleurs, elle pourrait également être impliquée dans la survenue de coagulopathies intravasculaires puisque le NO interagirait avec les composants de la cascade de la coagulation (facteur XIII, fibrine) et aurait un rôle protecteur contre la formation de thrombi (241, 410).

Cette diminution de la biodisponibilité du NO avec à terme un « état de résistance au NO » serait à l'origine de plusieurs complications de la drépanocytose : l'hypertension artérielle pulmonaire, les ulcères de jambe, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques et le priapisme (82, 231, 342).

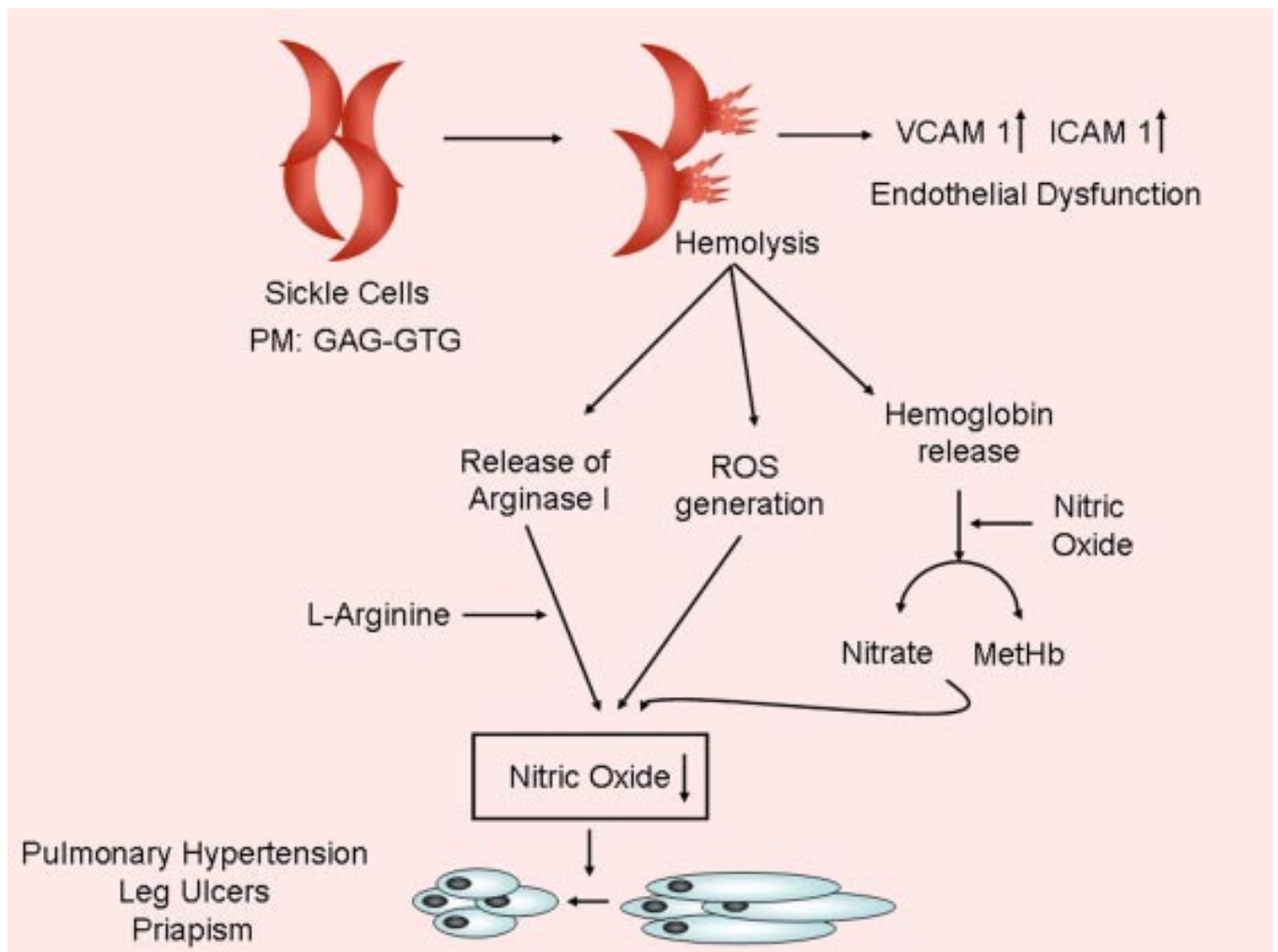


Figure 11. Etat de résistance au NO dans la Drépanocytose. L'Hb libre et l'arginase 1 sont libérées dans le plasma, et des dérivés réactifs de l'oxygène sont générés. L'hémoglobine réagit avec le NO, produisant de la méthémoglobine et du nitrate. L'arginase-1 entre en compétition avec la NO-synthase endothéliale, pour la L-arginine et les dérivés réactifs de l'oxygène détruisent le NO. Ceci conduit à une diminution de la biodisponibilité du NO, allant jusqu'à un état de résistance au NO qui serait impliqué notamment dans la survenue des ulcères de jambe, de l'hypertension pulmonaire, des accidents vasculaires cérébraux ischémiques/vasculopathies cérébrales et du priapisme (5).

1.2.4. Hémolyse intravasculaire

L'hémolyse est la destruction des globules rouges libérant l'hémoglobine dans le plasma sanguin. C'est un état physiologique : chez les individus sains, les globules rouges sont détruits en 120 jours. En cas d'hémolyse pathologique accrue, la durée de vie des globules rouges est réduite.

Dans la drépanocytose, il existe une augmentation de cette hémolyse, notamment lors des CVO et des épisodes hémolytiques aigus (33).

Quand l'hémoglobine libre se retrouve dans le plasma, elle forme un complexe avec l'haptoglobine qui se lie aux macrophages et aux leucocytes circulant par l'intermédiaire de la protéine CD163 (250). Cependant, ce processus est insuffisant pour éliminer l'excès d'hémoglobine libre dans la drépanocytose (231). Une grande partie de cette hémoglobine libre réagit donc avec le NO pour former de la méthémoglobine et des nitrates, réduisant ainsi la biodisponibilité du NO (5, 379). L'hème est éliminé par une autre protéine plasmatique, l'hémopexine. Sa production par le foie est stimulée par l'inflammation. Dans la drépanocytose, il existe une diminution de l'hémopexine. Dès que la liaison hème-hémopexine se produit, les macrophages éliminent l'hème de la circulation (398, 399).

1.2.5. Drépanocytose et stress oxydant

Dans la drépanocytose, il existe une augmentation chronique du stress oxydant. Il pourrait jouer un rôle significatif dans la physiopathologie des anomalies de la microcirculation, les phénomènes vaso-occlusifs et les atteintes des différents organes (344).

1.2.5.1. Les dérivés réactifs de l'oxygène

95% de l'oxygène de l'organisme sont normalement réduits en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale pour apporter aux cellules l'énergie dont elles ont besoin pour assurer leurs fonctions. Ces processus se produisent dans les mitochondries (74). 5% de l'oxygène sont transformés en dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), en anglais *reactive oxygen species* ou ROS.

Les DRO sont le résultat d'un catabolisme intracellulaire nécessitant de l'oxygène comme accepteur terminal d'électron. Durant ce processus, des DRO tels que l'ion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyl ($OH^\cdot$) sont produits comme intermédiaires, et ceci même chez les individus sains (18, 345). Dans des conditions physiologiques, il existe un équilibre entre les DRO et le système de défense anti-oxydant (superoxyde dismutase, catalase, glutathion et glutathion peroxydase, ascorbate, pyruvate, flavonoïdes et caroténoïdes), prévenant et limitant ainsi les dommages oxydatifs (190).

1.2.5.2. Le stress oxydant

Il résulte d'un déséquilibre entre substances oxydantes et anti-oxydantes en faveur des premières. L'augmentation de la production de substance pro-oxydantes et/ou la diminution de la production de substances anti-oxydantes entraîne une cascade de réactions oxydatives engendrant des lésions sur les lipides, protéines et l'ADN conduisant à une mort cellulaire prématurée (344).

1.2.5.3. Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose

1.2.5.3.1. Auto-oxydation de l'hémoglobine

En présence d'oxygène, l'hémoglobine est capable de s'auto-oxyder induisant la formation de méthémoglobine HbFe^{3+} par l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} . Cette auto-oxydation de l'hémoglobine génère des radicaux libres parmi lesquels les anions superoxydes O_2^- . Bien que ce processus soit retrouvé à la fois pour l'HbA et l'HbS, Hebbel et ses collaborateurs ont montré que l'HbS aurait la capacité de s'auto-oxyder 1,7 fois plus vite que l'HbA (202). En effet, l'HbA est capable de contrecarrer ces réactions, à l'inverse de l'HbS qui se retrouve rapidement submergée par la production continue de O_2^- , puis par sa dismutation en H_2O_2 , ce dernier pouvant produire alors de OH^- .

Cependant, des études plus récentes menées par ces mêmes auteurs, montrent que ce chiffre de 1,7 serait surestimé. L'HbS aurait un taux légèrement augmenté, causé plus par le stress oxydatif présent dans le cytoplasme des hématies que par une instabilité de l'HbS (413).

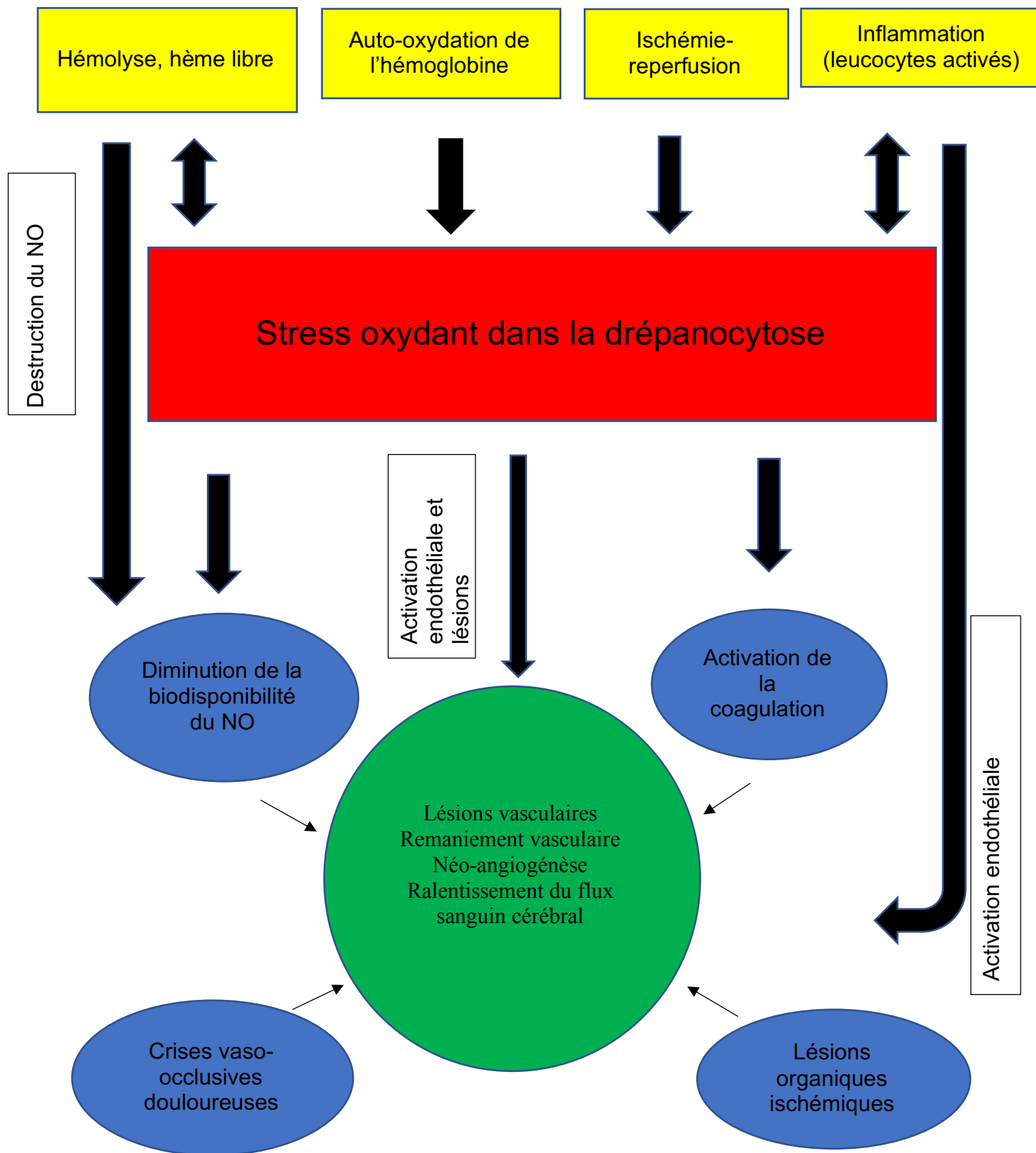


Figure 12 : Sources et rôle physiopathologique du stress oxydant dans l'hémolyse, la coagulation, l'inflammation, l'activation endothéliale, les CVO et dommages organiques dans la drépanocytose (344).

Dans la drépanocytose, les anomalies hémorhéologiques (diminution de la déformabilité et de l'agrégation des GR, augmentation de la force des agrégats érythrocytaires) pourraient en partie être en rapport avec une augmentation du stress oxydant. En effet, Baskurt et ses collaborateurs ont montré que les radicaux libres de l'oxygène altéraient les GR de sujets sains en diminuant leur déformabilité et leur agrégabilité, et en augmentant la force des agrégats érythrocytaires (41, 206). Ces anomalies rhéologiques du globule rouge pourraient être responsable des atteintes de la macro et de la microcirculation dans la drépanocytose. Les GR drépanocytaires sont plus sensibles au stress oxydant que les GR de sujets sains, et ce, probablement du fait d'un système antioxydant déficient (206).

1.2.5.3.2. L'hémoglobine libre

Du fait de l'hémolyse intravasculaire chronique, le taux plasmatique de l'hémoglobine libre est très élevé chez les patients drépanocytaires (de 3,6 à l'état de base à 9,6 μ M en période de crise) (234, 379). Comme nous l'avons vu plus haut, elle capte le NO et diminue ainsi sa biodisponibilité, limitant ainsi son action vasodilatatrice, antithrombique et anti-inflammatoire. L'hème hydrophobe s'intercale aussi rapidement dans la membrane des cellules endothéliales et y libère son fer. Ce processus induit une activation endothéliale et des lésions favorisant la production de DRO (344).

1.2.5.3.3. L'ischémie-reperfusion

Dans la drépanocytose, de grandes quantités de xanthine-oxydase sont libérées dans la circulation sanguine après des épisodes pathologiques d'ischémie-reperfusion, notamment au niveau hépatique (18). En effet, l'hypoxie secondaire à l'interruption de la circulation sanguine provoque la production d'hypoxanthine et de xanthine oxydase

à partir de l'adénosine triphosphate et de la xanthine déshydrogénase. Au moment de la reperfusion, la xanthine oxydase, après diffusion jusqu'à l'endothélium, exacerbe la production de DRO (ion superoxyde) et la destruction du NO engendrant ainsi des altérations vasculaires (44, 344).

1.2.5.3.4. Réponse inflammatoire et stress oxydant

Les patients drépanocytaires présentent un état chronique pro-inflammatoire, et ceci même en phase asymptomatique (46, 257).

La première source de DRO chez les patients drépanocytaires est l'hyperleucocytose chronique(468). En plus de leur rôle immunitaire, les polynucléaires neutrophiles produisent des DRO suivant la voie de la superoxyde dismutase (468). Dias-Da-Motta et al ont montré que les cellules mononucléaires ont une libération accrue d'anion superoxyde en réponse à des agonistes. La libération d'anion superoxyde pourrait inhiber l'effet de l'oxyde nitrique *in vivo* contribuant ainsi à la vasoconstriction. L'anion superoxyde pourrait également induire des dommages oxydatifs (125).

Les relations entre état pro-inflammatoire et stress oxydatif seraient vraisemblablement bidirectionnelles dans la drépanocytose. L'hème induirait l'expression de molécules d'adhérence pro-inflammatoires à la fois sur les cellules endothéliales et les cellules sanguines, augmentant la perméabilité vasculaire et l'afflux de polynucléaires neutrophiles, ainsi que la production de DRO (455). Kaul et ses collaborateurs ont mis en évidence une réponse inflammatoire marquée par l'augmentation de leucocytes après des épisodes d'hypoxie-réoxygénation chez des souris transgéniques.(238). De plus, l'hémoglobine libre et l'hème constituent des « Erythrocyte Danger-associated Molecular pattern molécules » (e-DAMP), activant le

système immunitaire inné et l'endothélium, aboutissant à un état pro-inflammatoire et pro-adhésif concourant aux CVO et aux atteintes pulmonaires dans les modèles murins (234).

1.2.5.4. Le système anti-oxydant

Afin de lutter contre le stress oxydatif, les érythrocytes et autres cellules sont dotés d'un système anti-oxydant. Dans la drépanocytose, il y aurait une diminution de ces systèmes anti-oxydants.

1.2.5.4.1. Système anti-oxydant enzymatique

1.2.5.4.1.1. Superoxydes dysmutases (SOD)

Elles éliminent l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène.

Les études concernant les taux de SOD dans la drépanocytose sont contradictoires (95). Certains auteurs tels que Das et Nair ont montré une augmentation du taux de SOD intra-érythrocytaires chez les patients drépanocytaires concluant ainsi qu'elle constituerait un mécanisme de défense en réponse au stress oxydatif et pourrait de plus conduire à la formation de H_2O_2 (119, 279). Schacter et ses collaborateurs ont retrouvé une diminution du taux de SOD intra-érythrocytaire proportionnel à la sévérité de la pathologie chez des sujets SS. Ceci pourrait provenir d'une dégradation accrue de la SOD par les radicaux libres oxygénés. Ils ont également retrouvé une augmentation du taux de SOD chez les sujets contrôles noirs par rapport aux sujets contrôles caucasiens (397). La différence entre ces études pourrait ainsi provenir de l'origine ethnique des sujets contrôles.

1.2.5.4.1.2. Glutathion peroxydase

Elle détoxifie normalement le peroxyde d'hydrogène. Le taux de glutathion peroxydase plasmatique au niveau tissulaire est réduit dans la drépanocytose et il existerait une relation directe avec la sévérité de la maladie (120, 330).

1.2.5.4.1.3. Catalase

Les études sont également contradictoires concernant les taux de catalase dans la drépanocytose.

Dasgupta et al retrouvent dans les globules rouges drépanocytaires un taux augmenté pouvant jouer un rôle protecteur d'élimination du H_2O_2 tandis que Das et Nair décrivent une diminution du taux de catalase probablement en rapport avec l'importance du stress oxydatif (119, 120).

Möckesch et al ont récemment comparé l'activité enzymatique antioxydante plasmatique chez des enfants SS, SC et AA. Ils ont ainsi montré que les SS et SC présentaient des niveaux de stress oxydant et d'activité enzymatique anti-oxydante supérieurs à ceux des sujets sains AA. Les sujets SS présentaient en outre des taux plasmatiques plus élevés de marqueurs du stress oxydant (advanced oxydation protein products), de glutathion peroxydase, de catalase, de capacité anti-oxydante totale (FRAP) que les SC. La production accrue de DRO engendre non seulement une augmentation des taux plasmatiques de marqueurs du stress oxydant, mais aussi des enzymes du système antioxydant (303).

1.2.5.4.1.4. Hème-oxygénase-1 (HO-1)

Il s'agit d'une enzyme cytoprotectrice anti-inflammatoire intervenant dans le catabolisme de l'hème dont la production est induite par le stress oxydatif (45, 181). Elle fait l'objet de nombreuses publications ces dernières années (47, 94, 183). Elle est présente à des taux élevés dans les tissus impliqués dans la sénescence des GR : rate, foie, système réticulo-endothéliale, moelle osseuse (45). En réponse au stress, elle produit du monoxyde de carbone (CO), de l'ion fer et de la biliverdine de façon physiologique (183). Dans la drépanocytose, la production de CO par l'HO-1 limiterait l'inflammation et les phénomènes vaso-occlusifs (181). Elle inhibe l'expression du facteur nucléaire KB (NF- κ B), celles de VCAM-1, ICAM -1, et de ce fait les interactions entre leucocytes et endothélium, et atténue l'état d'ischémie-reperfusion (48). Les patients drépanocytaires présentent une élévation de l'expression de HO-1 en réponse à l'hémolyse et à l'élévation du stress oxydant (45).

Du fait de l'hémolyse chronique dans la drépanocytose, les taux plasmatiques d'haptoglobine (Hp) et d'hémopexine sont bas (316). L'Hb libre est éliminée en premier lieu au niveau des tubules rénaux. Un excès d'hémoglobine libre est à l'origine de dommages rénaux. L'administration d'Hp réduirait la dégradation de l'hème par HO-1 au niveau des tubules rénaux, réduisant ainsi la toxicité induite par l'hémoglobine libre (94) .

1.2.5.4.2. Système anti-oxydant non enzymatique

Il s'agit du glutathion mais aussi des vitamines A, C et E.

Les vitamines A (beta-carotène), C et E sont des « destructeurs » de radicaux libres. L'administration de vitamine C augmente la concentration intracellulaire en GSH,

réduisant ainsi le stress oxydatif (377, 424).

Les taux de glutathion total (et à fortiori de glutathion réduit), de vitamines A (caroténoïdes) sont réduits chez les sujets drépanocytaires (12, 172, 330).

Il en va de même pour les taux de flavonoïdes, zinc (part de la superoxyde dismutase), vitamines C et E. Il a été montré que l'administration de flavonoïdes aux GR drépanocytaires, réduisait l'auto-oxydation de l'Hb, la peroxydation lipidique et la déformation membranaire (80, 344) La supplémentation en Zinc des patients drépanocytaires réduit le stress oxydant, la vulnérabilité aux infections, et la production de cytokines pro-inflammatoires (80, 344).

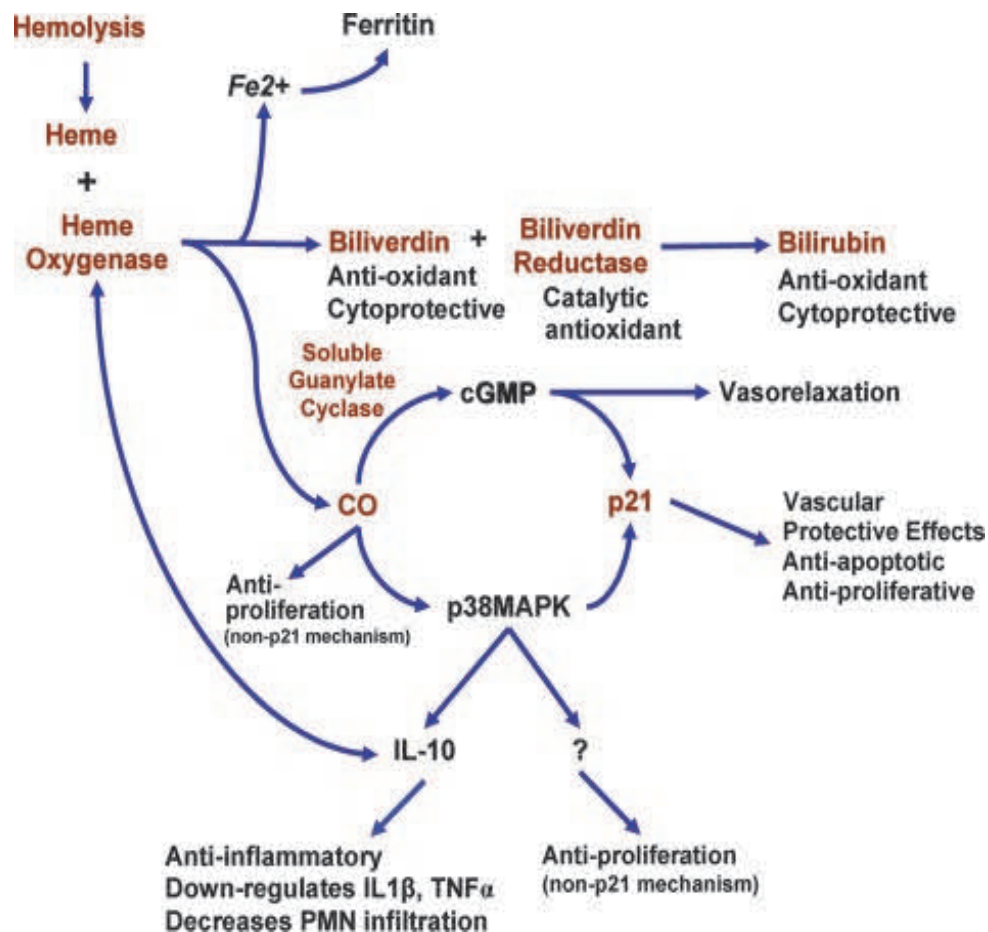


Figure 13. Système anti-oxydant dans la drépanocytose (223).

1.2.5.5. Stress oxydant et α -thalassémie

Renoux et al ont récemment montré que la présence d'une α -thalassémie réduisait le stress oxydant chez les drépanocytaires SS (381). L' α -thalassémie réduit la concentration intra-érythrocytaire en HbS (137, 194), réduisant ainsi l'auto-oxydation de l'HbS, les cycles de polymérisation-dépolymérisation, l'hémolyse, et les épisodes d'ischémie-reperfusion. Ces phénomènes sont connus pour augmenter la production de DRO (95, 121, 239).

1.3. MANIFESTATIONS DE LA DREPANOCYTOSE

Si la drépanocytose est une maladie autosomale récessive à mutation unique, la pénétrance et la sévérité des complications drépanocytaires, ainsi que les facteurs de risque qui leurs sont associés, sont très variables d'un patient à un autre (29, 233).

Compte-tenu de la diversité clinique et physiopathologique des complications de la drépanocytose, Gladwin et Vichinsky ont proposé de classer les complications selon deux sous-phénotypes reflétant deux mécanismes physiopathologiques distincts mais complémentaires: le phénotype visqueux/vaso-occlusif et le phénotype hémolytique/dysfonction endothéliale (174, 231).

1.3.1. Phénotype hémolytique avec dysfonction endothéliale

Le phénotype hémolytique est caractérisé par un taux d'hématocrite plus bas que dans le phénotype vaso-occlusif avec des taux élevés de LDH et de bilirubine indiquant une anémie hémolytique plus sévère (233). Ceci aurait un impact aussi bien sur la vascularisation pré-capillaire qu'au niveau des gros vaisseaux (116, 231). L'importante quantité d'hémoglobine et d'arginase libérée dans le plasma réagirait avec le NO et la L-arginine, diminuant ainsi la biodisponibilité du NO. La diminution de la concentration du NO plasmatique engendrerait une dysfonction endothéliale, la surexpression de molécules d'adhérence endothéliale et des altérations du tonus vasculaire (232, 269).

Ces anomalies pourraient être impliquées dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire, la glomérulopathie, les ulcères de jambe, le priapisme et la

vasculopathie cérébrale (52, 61, 116, 123, 174, 231)

1.3.1.1. L'hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire est une élévation de la pression sanguine dans la circulation pulmonaire que ce soit au niveau de la micro- ou de la macro-circulation. Cliniquement elle se manifeste par la présence de : dyspnée, palpitations, douleurs thoraciques et abdominales, syncope, cyanose, insuffisance cardiaque. L'OMS classifie l'hypertension pulmonaire en cinq groupes parmi lesquels l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et l'hypertension veineuse pulmonaire (HTVP) sont les plus communes dans la drépanocytose (29).

La physiopathologie de l'HTAP fait intervenir deux processus : l'occlusion vasculaire et l'hyperplasie intinale. La vasoconstriction est secondaire à la diminution de la biodisponibilité du NO et à l'augmentation de la production de vasoconstricteurs tels que ET-1 (161). L'hyperplasie intinale est une réponse à l'hypoxie chronique (418). En fait, l'hypoxie induit la production de facteurs HIF α et β (Hypoxia Inducible Factors) qui sont transloqués à travers la membrane cellulaire jusqu'au noyau. Le complexe $\alpha\beta$ active la transcription de gènes à l'origine d'une augmentation de la prolifération cellulaire et de l'inflammation causant hyperplasie intinale et inflammation. L'hypertension pulmonaire veineuse (HTVP) est, elle, causée par une insuffisance ventriculaire gauche (321).

L'hypertension pulmonaire se définit par une pression artérielle pulmonaire moyenne $\geq 25\text{mmHg}$ (déterminée par échocardiographie). La distinction entre HTAP et HTVP

se fait par la pression capillaire pulmonaire moyenne qui nécessite une cathétérisation cardiaque droite. L'HTAP est caractérisée par une pression artérielle pulmonaire moyenne ≥ 25 mmHg et une pression capillaire pulmonaire moyenne ≤ 15 mmHg, alors que cette dernière est ≥ 15 mm Hg dans l'HTVP (29).

Gladwin et ses collaborateurs ont montré que l'HTAP, diagnostiquée par l'échocardiographie était une complication fréquente dans la drépanocytose et qu'elle était associée à un taux plus élevé de mortalité que chez les drépanocytaires ne présentant pas cette complication (173). Elle serait liée à une pression artérielle pulmonaire plus faible et des débits cardiaques plus élevés chez les sujets drépanocytaires que chez les sujets sains (173). L'étude ETENDARD, confirme cette complication comme marqueur pronostic péjoratif de la drépanocytose mais montre que la prévalence de l'HTAP validée par cathérisme droit est bien moindre que celle estimée par échocardiographie (355).

Morris et ses collaborateurs ont montré le rôle joué par la diminution de l'arginine biodisponible dans le développement de l'HTAP (222, 312). D'autres facteurs de risques ont également été identifiés : l'hémolyse intravasculaire chronique, l'élévation de la LDH, l'hypercoagulabilité, la présence d'ulcères de jambe, l'atteinte glomérulaire sous forme de protéinurie ou d'altération de la fonction rénale (173, 278, 472).

1.3.1.2. Vasculopathie cérébrale

Ce terme inclut les accidents vasculaires cérébraux ischémiques constitués (AVC), les accidents ischémiques transitoires (AIT), les infarctus silencieux et les déficiences neurocognitives. Les AVC ischémiques surviennent le plus souvent chez les enfants et les AVC hémorragiques et les syndromes de Moyamoya chez les adultes. Un AVC

ischémique résulte d'un ralentissement du flux sanguin cérébral sans aucune complication hémorragique et durant plus de 24 heures. Un AVC hémorragique et une hémorragie intracérébrale responsables de symptômes neurologiques (349). Le syndrome de Moyamoya est caractérisé par la présence d'un réseau vasculaire anormal en « fumée de cigarette » en rapport avec la formation de collatérales secondaires à une sténose vasculaire ou à une occlusion de grosses artères cérébrales (130).

Les AIT sont des accidents vasculaires cérébraux dus à une ischémie cérébrale transitoire responsable de dysfonctions neurologiques durant classiquement plus d'une heure mais sans infarctus cérébral constitué (349).

La déficience neurocognitive est définie par une fonction non verbale normale attestée par la Wechler Adult Intelligence Scale III Performance IQ Index chez des adultes drépanocytaires neurologiquement asymptomatiques. La déficience neurocognitive pourrait être en rapport avec une hypoxie cérébrale chronique indétectable par les techniques actuelles d'imagerie (28, 454).

Plusieurs facteurs de risques de vasculopathie cérébrale ont été identifiés : l'hypoxie, l'anémie, l'hémolyse (116, 252, 349). Les études sont contradictoires concernant le rôle joué par le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (153, 169, 298). L' α -thalassémie est protectrice (52, 225)

1.3.1.3. Ulcères de jambes

Les ulcères de jambe sont une complication douloureuse et invalidante affectant 5 à 10% des patients drépanocytaires. Ils sont principalement localisés au niveau du tiers

distal de la jambe, dans sa partie médiale juste au-dessus de la malléole interne. L'ulcération implique la peau et les tissus sous-jacents. Leur degré de sévérité dépend de leur profondeur (29). La douleur qui en résulte nécessite l'utilisation d'antalgiques opiacés ou non ainsi que d'analgésiques locaux (27).

Concernant les facteurs de risque, on retrouve plus souvent des ulcères de jambe chez les individus de sexe masculin, présentant un âge avancé. Par contre, la présence d'une alpha-thalassémie, d'un taux élevé d'hémoglobine, d'une hémoglobine F élevée sont associées à une moindre survenue de cette complication (249). Les ulcères seraient également moins fréquents chez les porteurs de l'haplotype CAR- β (365).

1.3.1.4. Priapisme

Le priapisme est secondaire à la congestion du corps pénien par les drépanocytes bloquant ainsi l'évacuation du sang du pénis. Il s'agit d'une complication classique de la drépanocytose affectant 35% des hommes quel que soit leur âge (352). Le priapisme peut survenir quel que soit le génotype drépanocytaire bien qu'il soit plus fréquent chez les individus SS (1, 351).

Cliniquement le priapisme peut être récurrent, mineur ou majeur (avec dysfonction érectile et impotence fonctionnelle séquellaire). Le priapisme récurrent est caractérisé par la survenue d'épisodes brefs, répétés et réversibles avec une résolution survenant quelques heures après le pic de l'érection. Cette forme est de bon pronostic et nécessite rarement une prise en charge médicale. La prévalence du priapisme varie de 2% à 60% selon les séries publiées (139, 412).

La survenue du priapisme dans la drépanocytose est associée à la présence de marqueurs d'hémolyse chronique : élévation de la LDH, de la bilirubine et du taux de réticulocytes (343).

1.3.1.5. Glomérulopathie

20 à 30% des patients drépanocytaires présentent une protéinurie caractérisant la glomérulopathie (150). On la retrouve le plus souvent chez les patients SS et elle peut se compliquer d'une insuffisance rénale terminale mettant en jeu le pronostic vital (9, 363). Deux facteurs pourraient favoriser la survenue de cette glomérulopathie : l'hémolyse chronique et l'absence d'alpha-thalassémie (334).

1.3.2. Phénotype hypervisqueux et crises vaso-occlusives

Dans le phénotype hypervisqueux, l'hémolyse est moindre et l'anémie est moins sévère que dans le phénotype hémolytique. Le phénotype visqueux regroupe les CVO, le syndrome thoracique aigu et l'ostéonécrose.

La « Cooperative Study of Sickle cell Disease » aux Etats-Unis a montré qu'un hématokrite élevé serait un facteur de risque de CVO douloureuses (24, 299, 443). Sachant que la viscosité sanguine est dépendante du taux d'hématocrite, l'hyperviscosité sanguine pourrait être responsable des crises douloureuses vaso-occlusives drépanocytaires. Cependant la viscosité sanguine n'est pas un examen de routine chez les patients drépanocytaire, et le rôle de l'hémorhéologie restait, de manière surprenante, relativement mal connu jusqu'à très récemment (112, 115).

1.3.2.1. La crise vaso-occlusive

Elle est secondaire à une atteinte organique. C'est une douleur nociceptive. Elle peut-être aiguë ou chronique, somatique ou viscérale, uni- ou bilatérale, localisée ou diffuse et minime, modérée ou sévère (26, 31). Elle affecte typiquement les os longs et les articulations (31). Les lombalgies sont fréquentes, mais d'autres zones de l'organisme peuvent être atteintes : la mâchoire, la tête, le pelvis, l'abdomen. Une CVO pourrait se définir comme un épisode douloureux nécessitant un traitement parentéral en milieu hospitalier pour une durée de 4 heures ou plus (85, 87). L'occurrence de CVO à au moins trois reprises indique que le patient souffre de drépanocytose sévère (31).

50% des patients souffrant de CVO, manifestent des critères objectifs : fièvre, hyperleucocytose, œdèmes des articulations (32). Les CVO nécessitant une hospitalisation évoluent classiquement en quatre phases : prodromale, initiale, établie, et résolutive. Chaque phase étant caractérisée par des signes cliniques et biologiques propres. Plus la douleur augmente, plus le nombre de GR augmente avec une diminution concomitante de leur déformabilité. Durant la CVO, certains patients présentent une hyperhémolyse avec diminution du taux d'hémoglobine et augmentation de nombre de réticulocytes (25, 333). Durant la phase résolutive, le schéma s'inverse avec une diminution du nombre de cellules denses, et une augmentation de la déformabilité des GR (35).

1.3.2.2. Syndrome thoracique aigu

Le syndrome thoracique aigu (STA) est une complication de la drépanocytose caractérisée par une douleur thoracique pleurale, de la fièvre, des râles à l'auscultation pulmonaire et une infiltration pulmonaire sur la radiographie thoracique (79).

L'incidence du STA est dépendante de l'âge et du génotype mais non du genre. Il est trois fois plus fréquent chez les jeunes enfants mais plus sévère chez les adultes. Il peut être observé, par ordre de fréquence décroissante, chez les individus SS, $S\beta^0$ -thalassémiques, SC, $S\beta^+$ -thalassémiques. La présence d'une α -thalassémie, le taux de plaquettes, le VGM ne semble pas influencer sur la survenue de cette complication (79). La fréquence du STA décroît en présence d'une HbF élevée, d'une anémie sévère mais est directement proportionnelle au taux de leucocytes (79, 255). Le STA est étroitement lié aux CVO chez les adultes. Le STA est responsable de 15% des hospitalisations aiguës des patients drépanocytaires et est potentiellement fatal. Le STA est la cause la plus fréquente de décès chez les patients drépanocytaires et représente après les CVO, la seconde cause d'hospitalisation chez ces patients. Bien que le STA soit résolutif sous traitement, il peut être responsable d'une insuffisance respiratoire. Son taux de mortalité est de 1,8% chez les enfants et de 4,8% chez les adultes. Les causes de STA incluent les pneumonies et les embolies graisseuses de moelle osseuse, les infarctus pulmonaires en rapport avec la falciformation, les infections, et les embolies pulmonaires. Aucune étiologie n'est retrouvée dans près de 50% des cas. Les embolies graisseuses responsables de STA se manifestent par des douleurs des os longs, suivies de dyspnée, d'hypoxie et de fièvre. Il a été montré que l'infarctus tissulaire au sein de la moelle osseuse des os longs génère de la graisse et de la nécrose (174, 233, 427, 453).

1.3.2.3. La nécrose avasculaire

La nécrose avasculaire (également appelée ostéonécrose ou nécrose ischémique) est une complication fréquente de la drépanocytose. Bien qu'elle soit fréquemment

rapportée au niveau de la hanche, il s'agit d'un problème pouvant affecter de façon équivalente les têtes humérales et fémorales et la colonne vertébrale. Leur vascularisation terminale et leur pauvreté en circulations collatérales rend ces trois régions particulièrement vulnérables à la falciformation et à la nécrose osseuse secondaire (29). La Cooperative Study of Sickle Cell Disease rapporte que les patients SS avec alpha-thalassémie présentent un taux plus élevé de survenue d'ostéonécrose en raison de l'élévation de l'hématocrite probablement à l'origine d'une hyperviscosité sanguine avec microvasculopathie secondaire (24, 299). Une élévation du volume globulaire moyen (VGM) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT) hépatique sont associées à un taux plus élevé d'ostéonécrose, en particulier en présence d'une alpha-thalassémie homozygote (299). Pour Lemonne et al, la présence d'une nécrose avasculaire n'est pas associée à une modification de la viscosité sanguine (et ce en dépit des variations du taux d'hémoglobine et d'hématocrite) (265). Il semblerait donc qu'une augmentation de l'hémoglobine puisse être associée à la survenue d'ostéonécroses indépendamment de la viscosité sanguine.

Comme nous venons de le dire, les deux phénotypes ainsi décrits ne tiennent pas compte des anomalies hémorhéologiques présentes dans la physiopathologie de la drépanocytose.

Il a été montré que les complications du phénotype visqueux que sont les crises douloureuses vaso-occlusives et l'ostéonécrose étaient associées à une élévation de l'hématocrite et de la numération des globules rouges (265). Les complications hémolytiques (ulcères de jambe, priapisme et glomérulopathie) sembleraient, elles, être associées à une diminution du taux d'hématocrite et de la déformabilité des

globules rouges (99, 113, 254). Il existerait donc un lien entre les anomalies hémorhéologiques et les phénotypes décrits par Gladwin chez les patients drépanocytaires.

Connes et ses collaborateurs ont ainsi montré en 2014 que le phénotype hémolytique était caractérisé par une diminution de la déformabilité et une augmentation de la force des agrégats de globules rouges. Par contre, le phénotype visqueux se distinguerait par une augmentation de la déformabilité érythrocytaire mais pas toujours par une augmentation de la viscosité sanguine. Les deux sous-phénotypes drépanocytaires devraient donc prendre en considération non seulement les anomalies hémorhéologiques mais aussi le statut vis-à-vis de l'alpha-thalassémie et donc du nombre de gènes alpha-globine délétés (114, 254, 255, 265, 333).

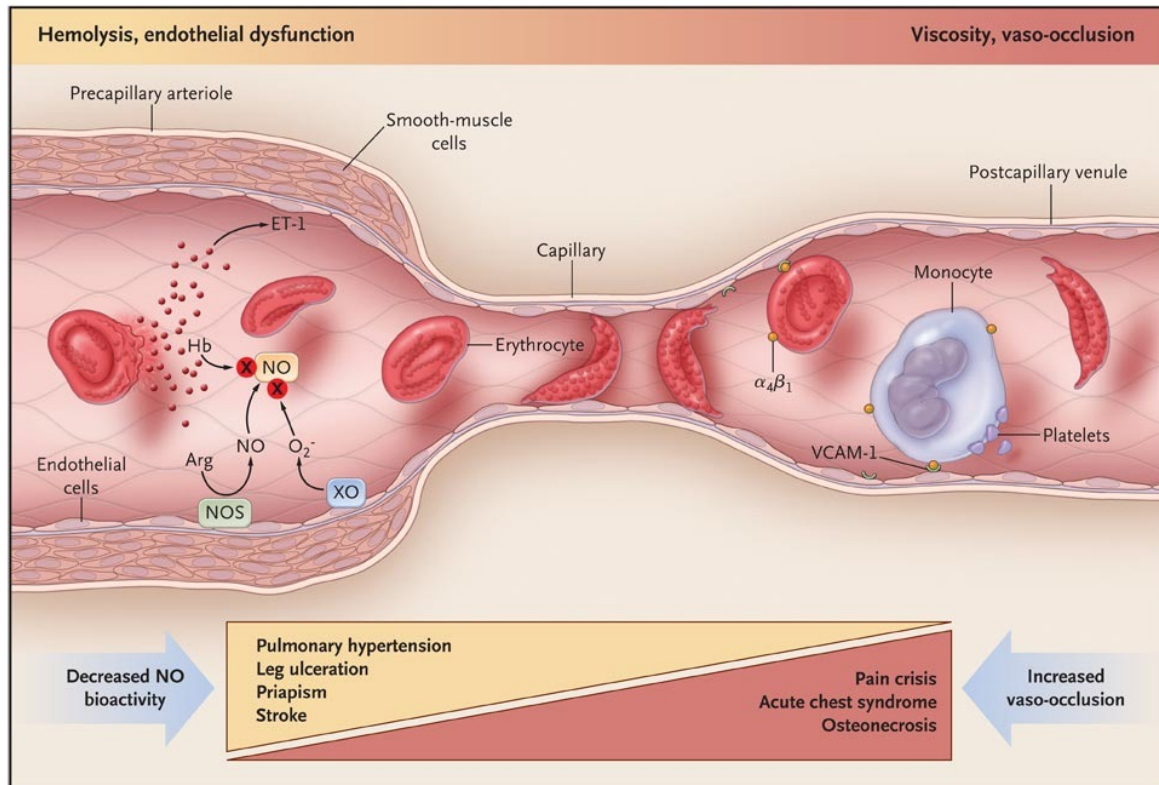


Figure 14; Hypothèse des mécanismes des sous-phénotypes clinique de la drépanocytose (174).

1.3.3. Autres complications non prises en compte par le modèle de Gladwin

1.3.3.1 Douleurs intercurrentes

Certains patients drépanocytaires se plaignent de douleurs entre les épisodes de CVO en dehors de tout facteur déclenchant identifiable (infection, déshydratation, ischémie). Leur description n'est pas similaire à certaines douleurs chroniques habituellement décrites dans la population générale telles que les douleurs de migraines ou de fibromyalgie. Ces patients sont ainsi traités de façon chronique par des antalgiques opiacés ou non (29).

1.3.3.2. Neuropathie et douleurs neuropathiques

Ce sont deux entités distinctes. Les patients atteints de neuropathie ne présentent pas nécessairement de douleurs neuropathiques. Les douleurs neuropathiques sont très mal documentées dans la drépanocytose d'autant plus que les échelles d'évaluation de ce type de douleurs sont différentes de celles utilisées pour les douleurs habituellement décrites dans la drépanocytose. La neuropathie périphérique est rare dans la drépanocytose. Le « numb chin syndrome » ou « mental nerve neuropathy » est la neuropathie la plus fréquemment rapportée chez les drépanocytaires et est souvent associée aux CVO (30).

1.3.3.3. Infections

Bien que le trait drépanocytaire procure une résistance à l'infection par le *Plasmodium falciparum*, les patients drépanocytaires sont extrêmement vulnérables à un certain nombre d'autres infections (189, 361). En raison de l'altération de leur fonction splénique, ils sont très sensibles aux infections par des bactéries encapsulées (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*). Ces patients présentent également une altération de leur système immunitaire cellulaire (en rapport avec l'hémossidérose post-transfusionnelle) et leur immunité humorale. On peut également observer des infections urinaires à *Escherichia coli*, des ostéomyélites à *Staphylococcus aureus* ou à *salmonella Typhimurium* (362).

1.3.3.4. Complications cardiaques

Les insuffisances cardiaques, hémossidérose cardiaque et cardiomégalie sont classiquement décrites dans la drépanocytose. Ont été mis en évidence des

complications ischémiques (angor, infarctus du myocarde), prolapsus de la valve mitrale (271, 286).

1.3.3.5. Complications génito-urinaires

Les infections du tractus urinaire sont généralement dues à *Escherichia Coli* et sont plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes. L'augmentation de leur fréquence dans la drépanocytose pourrait être en rapport avec les infarctus rénaux et l'immunodépression. L'environnement hypoxique, acide et hypertonique entraîne une falciformation des GR dans les vaisseaux droits de la médulla rénale causant des hyposthénuries et des hématuries. Ces complications surviennent aussi bien sur les patients drépanocytaires homozygotes et hétérozygotes. L'hématurie peut être secondaire à une nécrose papillaire rénale aigue, à une infection du tractus urinaire, une glomérulonéphrite, une sténose, une toxicité des analgésiques, une infection à mycobactérie, lithiase rénale, tumeur (carcinome), malformations artério-veineuses et vascularites (29).

Chez les enfants, peut exister une énurésie. L'excrétion du potassium peut aussi être altérée et des épisodes d'acidose hyperchlorémique ont été rapportés. La nécrose papillaire est plus fréquente chez les drépanocytaires SC. Chez les SS, l'hyperuricémie est en rapport avec d'une part une hyperactivité médullaire et une augmentation consécutive du métabolisme des purines, et d'autre part à des infarctus tubulaires rénaux. Une véritable goutte n'est observée que chez très peu de patients.

1.3.3.6. Complications hépato-biliaires

La séquestration hépatique est la séquestration de GR dans les capillaires sinusoides hépatiques conduisant à une hépatomégalie conduisant à une diminution du taux d'Hb de 2g/dL par rapport à la normale avec réticulocytose. Le foie s'élargit alors de plus de 3 cm chez les enfants et de plus de 5 cm chez les adultes sans aucune cause retrouvée (36, 197). La cholestase hépatique est le blocage de la production ou du débit de la bile entraînant une hyperbilirubinémie. Dans la drépanocytose, ce syndrome peut survenir dans un contexte de séquestration hépatique associée à une défaillance hépatique aigue avec une élévation notable de la bilirubine directe en l'absence de toute obstruction biliaire extra-hépatique ou d'hyperhémolyse (411).

1.3.3.7. Complications musculo-squelettiques et dermatologiques

La dactylite ou syndrome main/pied est une inflammation en rapport avec une ischémie d'un os de la moelle osseuse au niveau de la main et / ou du pied. Il s'agit de l'une des complications les plus précoces de la drépanocytose affectant les enfants entre 6 mois et 3 ans et rarement au-delà de 5 ans en raison de l'absence d'activité hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse des mains et des pieds (10).

1.3.3.8. Syndrome de défaillance multiviscérale aigue

C'est une complication gravissime de la drépanocytose mettant en jeu le pronostic vital, survenant dans un contexte de CVO, et ce même en présence d'un syndrome drépanocytaire modéré. Elle se caractérise par une anémie et une thrombopénie aigues avec encéphalopathie et rhabdomyolyse. Des taux élevés d'Hb pourrait-être un facteur prédisposant à cette complication (196).

Le paradigme de l'hyperhémolyse est en fait critiqué (200, 204). Tout d'abord, l'évaluation de l'hémolyse signée par les taux des biomarqueurs que sont l'hémoglobine libre et le LDH est remise en question. L'hémoglobine libre mesurée par les méthodes actuelles serait surestimée puisque c'est le taux d'hème plasmatique qui est mesuré. Or de nombreuses autres espèces circulantes comportent de l'hème avec par ordre de concentration décroissante : l'Hb liée à l'haptoglobine, la méthémalbumine, l'hémoglobine libre (331). Par ailleurs, dans la crise drépanocytaire, une grande partie de l'Hb libre mesurée est en fait contenue dans les particules dérivées des GR (415).

Le LDH est également remis en question comme marqueur d'hyperhémolyse dans la drépanocytose. En effet, aucun lien direct n'a été mis en évidence entre le LDH et la drépanocytose. Il a simplement été mis en exergue une élévation de son taux de façon concomitante à celle des autres marqueurs d'hémolyse (ASAT, Hb libre, arginase) au cours de la crise drépanocytaire. Or le taux de LDH plasmatique est le reflet de la combinaison de plusieurs mécanismes indépendants : l'hémolyse intravasculaire, extravasculaire, déficience de l'érythropoïèse. Les valeurs de ces facteurs dans la drépanocytose restent méconnues (200).

Les yeux peuvent eux aussi être le siège de complications drépanocytaires potentiellement invalidantes. De par mon activité clinique, mon travail de thèse s'est naturellement porté sur les complications oculaires.

1.4. MANIFESTATIONS OCULAIRES DE LA DREPANOCYTOSE

1.4.1. Rappels anatomiques

1.4.1.1. Anatomie de l'œil

L'œil est l'organe sensoriel de la vision. Il mesure 2,5 cm de diamètre, pèse 7 grammes et présente un volume de 6,5 cm³.

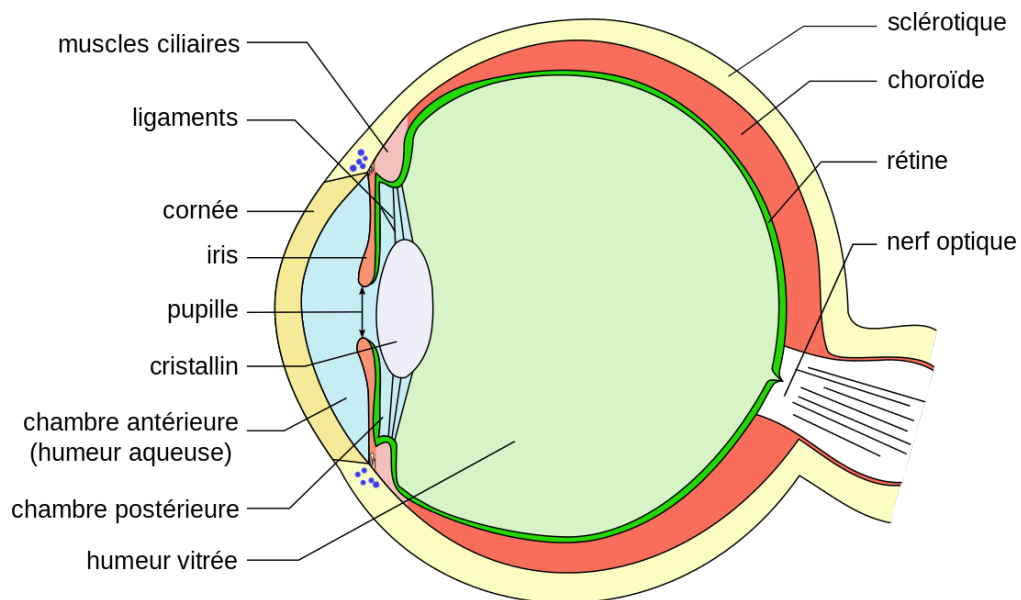


Figure 15. Anatomie de l'œil (coupe sagittale) (esculape.com)

L'œil est localisé dans l'orbite mais n'est pas en contact direct avec elle. Son bord interne en est distant de 11 mm et son bord externe de 6 mm. Le bord antérieur de l'œil est tangent à une ligne droite unissant les rebords orbitaires supérieur et inférieur.

Trois tuniques sont décrites au niveau de l'œil :

- La sclère : il s'agit de la tunique la plus externe se prolongeant en avant par la cornée. C'est au niveau de la sclère que s'insèrent les muscles oculo-moteurs.
- L'uvée est la tunique intermédiaire vasculaire et nourricière de l'œil. Elle est formée d'arrière en avant par la choroïde, le corps ciliaire et l'iris.
- La rétine (tunique interne). C'est la tunique sensorielle constituée d'un ensemble de fibres nerveuses qui convergent pour former le nerf optique.

L'œil contient 3 milieux transparents :

- Le vitré : gel transparent occupant toute la chambre postérieure de l'œil. Il exerce une pression permettant de maintenir d'une part les différentes couches rétinienne accolées entre elles, et le volume de l'œil.
- Le cristallin : lentille transparente biconvexe située derrière l'iris. Il permet de focaliser les images sur la rétine. Il change de forme en fonction de la distance de l'objet que l'on regarde (c'est l'accommodation, qui diminue avec l'âge).
- L'humeur aqueuse est un liquide aqueux transparent produit par le corps ciliaire. Elle circule de la chambre postérieure de l'œil à la chambre antérieure où elle est éliminée au niveau de l'angle iridocornéen, filtrée par le trabéculum, et évacuée par le canal de Schlemm. Elle apporte nutriments et oxygènes aux structures internes de l'œil et participe au maintien du volume et de la pression oculaire.

On peut décrire deux segments au niveau de l'œil :

- Le segment antérieur en avant du cristallin constitué par la cornée et l'iris. Ces deux structures délimitant la chambre antérieure et l'angle irido-cornéen. Entre l'iris et le cristallin, est délimitée la chambre postérieure.
- Le segment postérieur, en arrière du cristallin : sclère, choroïde, vitré et rétine.

1.4.1.2. La rétine

La rétine est l'organe sensible de la vision. C'est la tunique la plus interne du segment postérieur de l'œil située entre le vitré et la choroïde. D'origine diencéphalique, c'est une mince membrane pluri-stratifiée (11 couches) mesurant environ 0,5 mm d'épaisseur. Elle est constituée de plusieurs types de cellules nerveuses dont les principales sont appelées photorécepteurs : environ 5 millions de cônes (pour la vision diurne et colorée) et de 120 millions de bâtonnets (vision crépusculaire et nocturne en noir et blanc). Les photorécepteurs captent les signaux lumineux et les transforment en signaux électro-chimiques. Au niveau de la rétine, existent également des neurones parmi lesquels ces cellules ganglionnaires qui intègrent ces signaux chimiques (neurotransmetteurs) et les transforment en signaux électriques à l'origine de potentiels d'action. Ces potentiels d'action sont ensuite acheminés par les nerfs optiques vers l'encéphale par les corps géniculés latéraux.

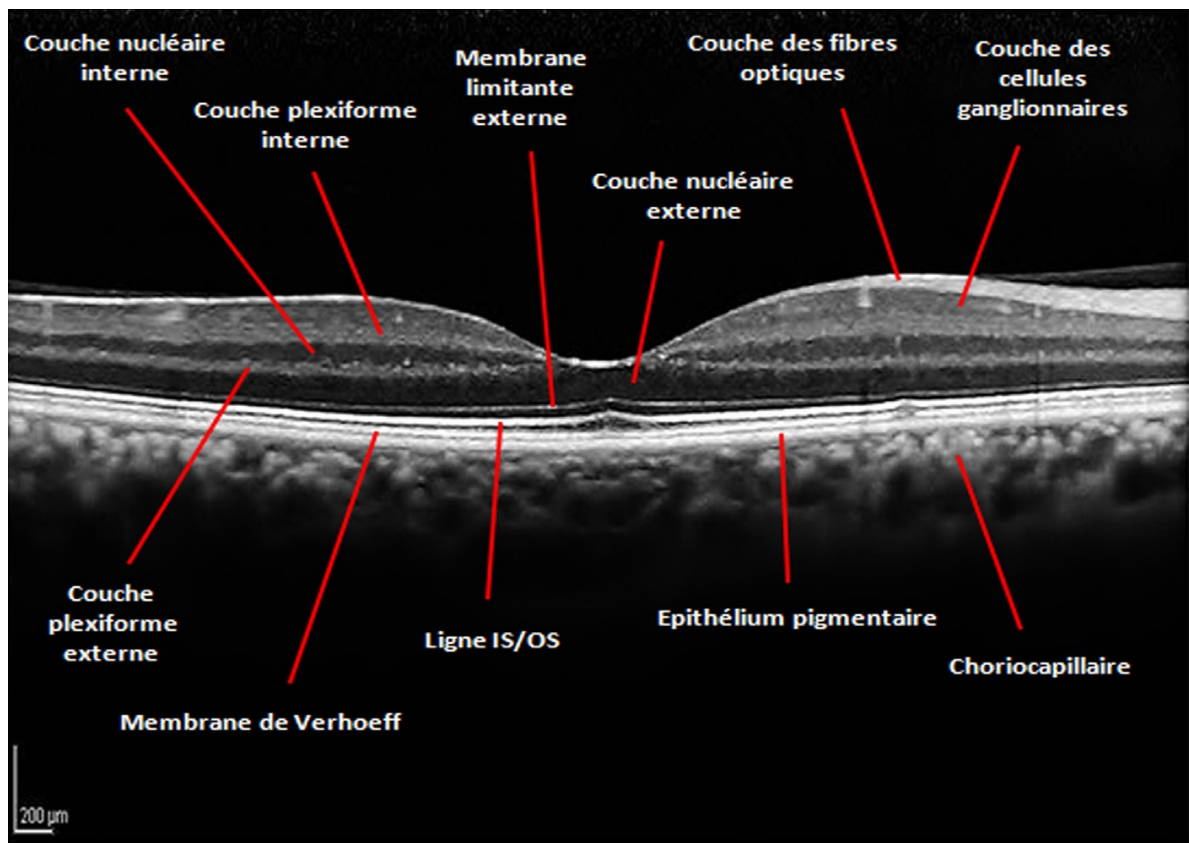


Figure 16. Les 11 couches rétinienne en tomographie en cohérence optique (OCT) (474).

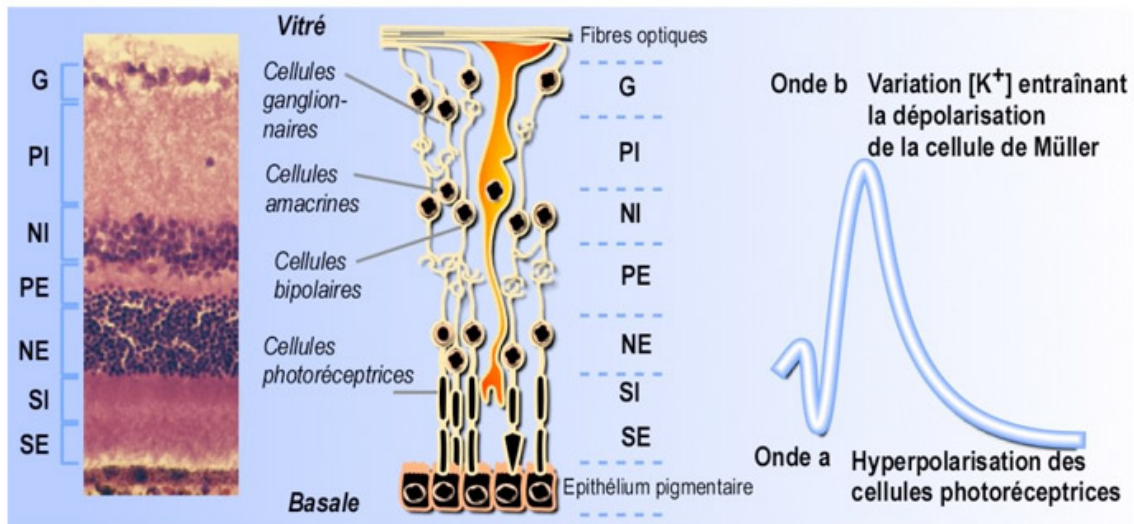


Figure 17. Histologie de la rétine et origine des ondes a et b du potentiel d'action des photorécepteurs.(Chabry J. Introduction aux encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles.www. 123bio.net Biologie et recherche)

1.4.1.2.1. La rétine : deux zones

1.4.1.2.1.1. La rétine centrale

Elle mesure 5 à 6 mm de diamètre. Il s'agit de la zone du pôle postérieur de l'œil délimitée par les artères temporales (supérieure et inférieure). On y retrouve la fovéola, la fovéa et la macula.

1.4.1.2.1.1.1. La fovéola

Dépression centrale de la fovéa, elle est située à 2 diamètres papillaires en dehors du bord temporal de la papille. Elle mesure 150 microns de diamètre.

1.4.1.2.1.1.2. La fovéa

Zone elliptique de 1,5mm de large et 1mm de hauteur, elle comporte la fovéola au centre et le clivus qui bordent latéralement la dépression fovéolaire. Son aspect jaunâtre est dû à la présence du pigment xanthophylle.

Les capillaires rétiens s'arrêtent à 200 microns du centre de la fovéola, délimitant ainsi une zone avasculaire centrale de 400 microns de diamètre.

1.4.1.2.1.1.3. La région maculaire

Elle est formée par la fovéa, les régions parafovéale et périfovéale qui entourent la fovéa.

1.4.1.2.1.2. La rétine périphérique

On peut classiquement la diviser en quatre zones :

- la périphérie proche : au contact du pôle postérieur qui s'étend sur 1,5mm.
- la périphérie moyenne qui mesure 3 mm.
- la périphérie éloignée qui s'étend sur 9 à 10 mm du côté temporal et 16 mm du côté nasal.
- L'ora serrata ou extrême périphérie, qui mesure 2,1 mm en temporal et 0,8 mm

en nasal.

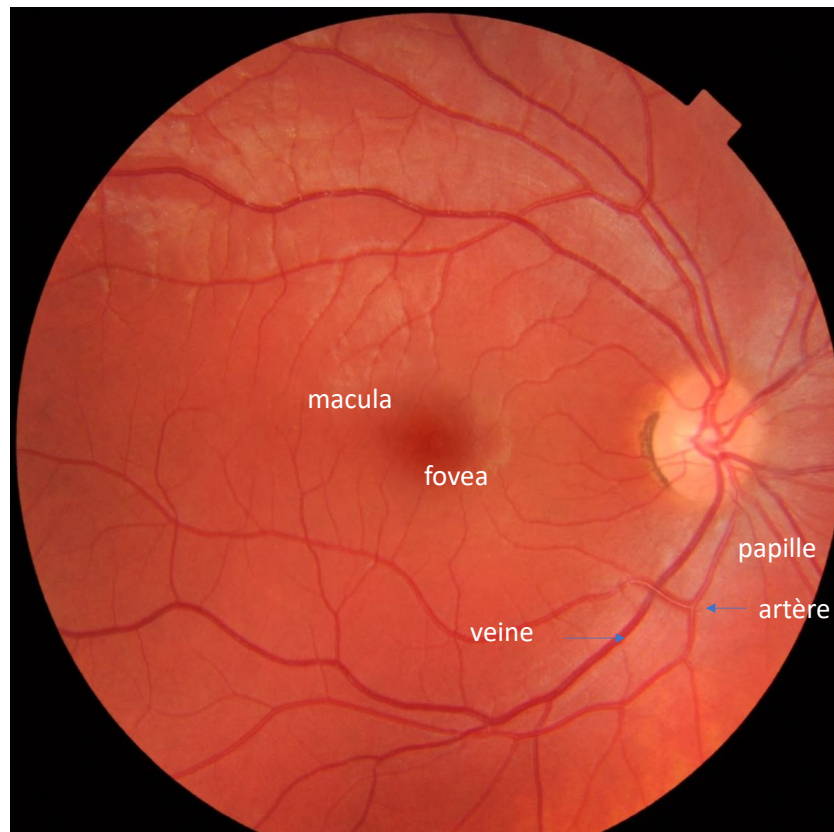


Figure 18. Fond d'œil normal. (Häggström M.2014." Medical gallery of Mickael Häggström 2014".

1.4.1.2.2. La vascularisation rétinienne

1.4.1.2.2.1. Vascularisation artérielle

La rétine reçoit son apport sanguin par un double système :

- choriocapillaire

C'est elle qui vascularise les couches externes et les photorécepteurs. Ce réseau capillaire assure la vascularisation de la fovéola.

- Les artères intra-rétiniennes

Ce sont les branches de l'artère centrale de la rétine. Parfois enrichies par des artères cilio-rétiniennes surnuméraires, elles vascularisent les couches internes de la rétine.

1.4.1.2.2.1.1. Vascularisation des couches externes

Elle se fait par diffusion à partir de la choriocapillaire, à travers la membrane de Bruch. La choriocapillaire est constituée d'une couche unique de capillaires d'un diamètre allant de 12 microns (au niveau maculaire) à 200 microns (au niveau de l'ora serrata). La choriocapillaire est issue des ramifications des artères ciliaires courtes postérieures en arrière et des artères récurrentes du grand cercle artériel de l'iris en avant.

1.4.1.2.2.1.2. Vascularisation des couches internes

Elle est essentiellement assurée par les branches de l'artère centrale de la rétine et accessoirement par des artères cilio-rétiniennes inconstantes. Juste après son émergence de la papille, l'artère centrale de la rétine se divise en deux branches supérieure et inférieure qui elles-mêmes se redivisent très vite pour former 4 branches : 2 artères temporales supérieure et inférieure et 2 artères nasales, supérieure et inférieure.

Artères et artérioles rétiniennes donnent naissance aux capillaires rétiens. Contrairement aux capillaires de la choriocapillaire, les capillaires rétiens sont non fenestrés.

1.4.1.2.2.2. Vascularisation veineuse

La veine centrale de la rétine est le principal système de drainage veineux de la rétine.

Les veinules de petit calibre se réunissent de façon centripète de l'ora vers la papille pour fournir des veines de plus en plus en plus gros calibre se drainant dans 4 troncs : les veines temporales supérieure et inférieure, les veines nasales supérieure et inférieure. Les deux branches supérieures se réunissent en une veine supérieure et les deux branches inférieures en veine inférieure. Ces 2 troncs veineux supérieur et inférieur se lient pour former la veine centrale de la rétine au niveau de la papille. La veine centrale de la rétine chemine ensuite le long du nerf optique accompagnée de l'artère centrale de la rétine.

Par la suite, la veine centrale de la rétine se détache du nerf optique pour rejoindre le sinus caverneux soit de façon isolée soit en se jetant dans la veine ophtalmique supérieure ou moyenne.

1.4.2. Manifestations ophtalmologiques de la drépanocytose

1.4.2.1. Segment antérieur

1.4.2.1.1. Paupières

Les paupières sont rarement le siège d'hématomes ou d'ecchymoses uni- ou bilatéraux (164).

1.4.2.1.2. Atteinte conjonctivale

La conjonctive peut présenter des signes de vaso-occlusion : petits segments rouges foncés, en «virgule» ou en «tire-bouchon», paraissant isolés des autres vaisseaux de voisinage (138). On les retrouve surtout au niveau de la conjonctive bulbaire inférieure, et ils seraient plus fréquents dans les formes SS. Ces signes ne sont pas spécifiques (419).

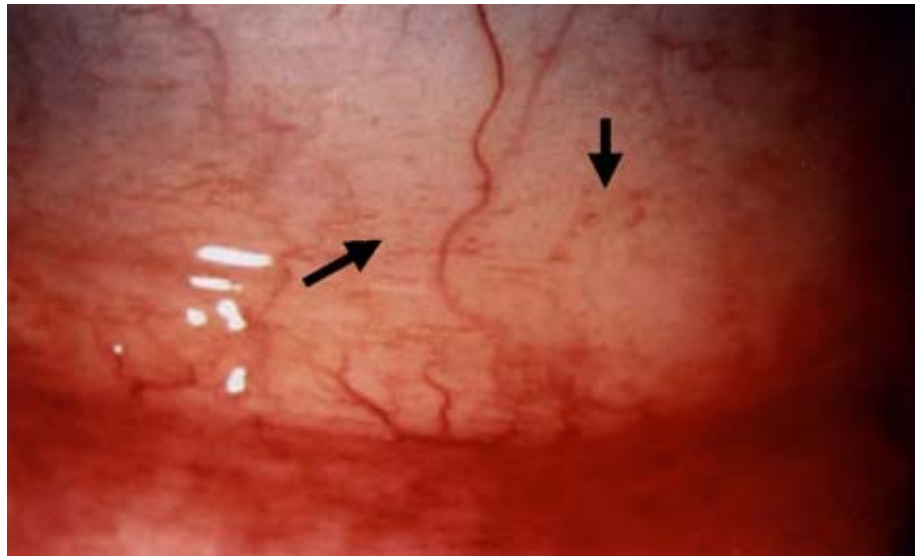


Figure 19. Segment des vaisseaux conjonctivaux rouge-foncés dans la drépanocytose (138).

1.4.2.1.3. Hyphéma

Un hyphéma est un niveau de sang en chambre antérieure de l'œil. Il peut être secondaire à un traumatisme ou à une chirurgie intra-oculaire.

Dans cet environnement cloisonné, le métabolisme des GR et des leucocytes utilise de l'oxygène et libère du CO_2 et de l'acide lactique induisant hypoxie, augmentation de la concentration en CO_2 et acidose. Ceci induit une falciformation des GR dans la chambre antérieure (124, 160, 180). Les GR falciformés se retrouvent alors bloqués dans la chambre antérieure car ils ne peuvent plus être évacués par le canal de Schlemm du fait de la diminution de leur déformabilité. Leur accumulation empêche également l'évacuation de l'humeur aqueuse par le canal de Schlemm. Cependant, la production de l'humeur aqueuse se poursuit et s'ensuit donc une élévation de la pression intraoculaire. Cette hypertonie oculaire entraîne un ralentissement voire un

blocage complet de la circulation sanguine de l'œil compromettant ainsi la vascularisation du nerf optique et de l'œil. On peut alors observer une atrophie optique ou une occlusion de l'artère centrale de la rétine aboutissant à une baisse d'acuité visuelle majeure imprévisible (6, 124).

1.4.2.1.4. Atteinte irienne

Rarement, on peut retrouver au niveau de l'iris : atrophie segmentaire, nécrose irienne en rapport avec une ischémie aigue du segment antérieur (par exemple dans les suites d'une chirurgie vitréo-rétinienne), rubéose irienne accompagnant ou non un glaucome néovasculaire compliquant une rétinopathie proliférante (151, 261).

1.4.2.2. Segment postérieur

Dans la drépanocytose, ce sont les atteintes du segment postérieur qui peuvent mettre en jeu le pronostic visuel.

1.4.2.2.1. Altérations de la papille

La papille peut être le siège d'occlusions vasculaires qui apparaissent à l'examen du fond d'œil comme des taches intravasculaires rouge sombre. Elles sont surtout retrouvées chez les drépanocytaires SS. Elles correspondraient à des amas d'hématies désoxygénées dans les petits vaisseaux de la surface de la papille. Il s'agit d'un phénomène transitoire ne mettant pas en jeu le pronostic visuel.

Comme nous l'avons vu plus haut, il est également possible d'observer une atrophie optique pouvant être secondaire à une hypertonie oculaire ou à une occlusion de l'artère centrale de la rétine (420).

La papille est rarement le siège d'une néovascularisation. En effet, la rétinopathie drépanocytaire ne se complique classiquement pas de néovascularisation prépapillaire. Cette constatation n'ayant été faite chez les drépanocytaires qu'en présence d'une autre pathologie rétinienne potentiellement proliférante telle que le diabète (245).

1.4.2.2.2. Pathologie rétinienne : rétinopathie drépanocytaire

1.4.2.2.2.1. Rétinopathie drépanocytaire non proliférante

1.4.2.2.2.1.1. Blancs sans pression

Ce sont des zones de rétine pâles, qui pourraient être secondaires à un œdème ischémique intracellulaire compliquant la rétinopathie drépanocytaire proliférante (403).

1.4.2.2.2.1.2. Hémorragies saumonées

Elles résultent d'une rupture de la barrière hémato-rétinienne secondaire avec une occlusion artériolaire en amont. Elles apparaissent comme des hémorragies arrondies, planes ou légèrement surélevées pouvant mesurer jusqu'à 2 mm de diamètre. Dans un premier temps, rouge vif, elles deviennent ensuite saumon du fait de l'hémolyse progressive. Après résorption, la rétine peut retrouver une coloration normale ou présenter des micro dépôts jaune brillant, rétractiles nommés « tâches iridescentes »

ou « givre doré » correspondant à des macrophages chargés d'hémosidérine. En cas d'hémorragie importantes, la rétine peut être le siège de lésions kystiques séquellaires.

1.4.2.2.1.3. Black sunburst spots (BSS)

L'examen du fond d'œil met en évidence des taches noires arrondies et planes, mesurant entre 0,5 et 2 mm de diamètre. Leurs contours peuvent être étoilés ou spiculés. Ils correspondent à l'hyperplasie et à la prolifération focale de l'épithélium pigmentaire engendrée par des hémorragies intra-rétiniennes profondes. Les BSS sont retrouvés chez 40% des SC, 35% des SS, et 20% des S- β thal (16, 107–109, 138).



Figure 20. Figure 16. Black sunburst entouré de spots iridescents (138).

1.4.2.2.2. Rétinopathie drépanocytaire proliférante

Elle conditionne le pronostic visuel. Goldberg la classifie en cinq stades selon la gravité des lésions (178).

Stade I : occlusions artériolaires périphériques.

Les vaisseaux occlus prennent un aspect caractéristique en « fil d'argent » des vaisseaux occlus, contrastant avec le segment artériolaire rouge sombre situé en amont de l'occlusion.

Stade II : anastomoses artério-veineuses.

A la limite entre rétine perfusée et rétine ischémique se produit un remodelage vasculaire à l'origine d'anastomoses artério-veineuses. A la différence des néovaisseaux, les anastomoses ne laissent pas diffuser la fluorescéine en angiographie, confirmant qu'il s'agit bien de canaux préexistants dont la barrière hémato rétinienne est intacte.

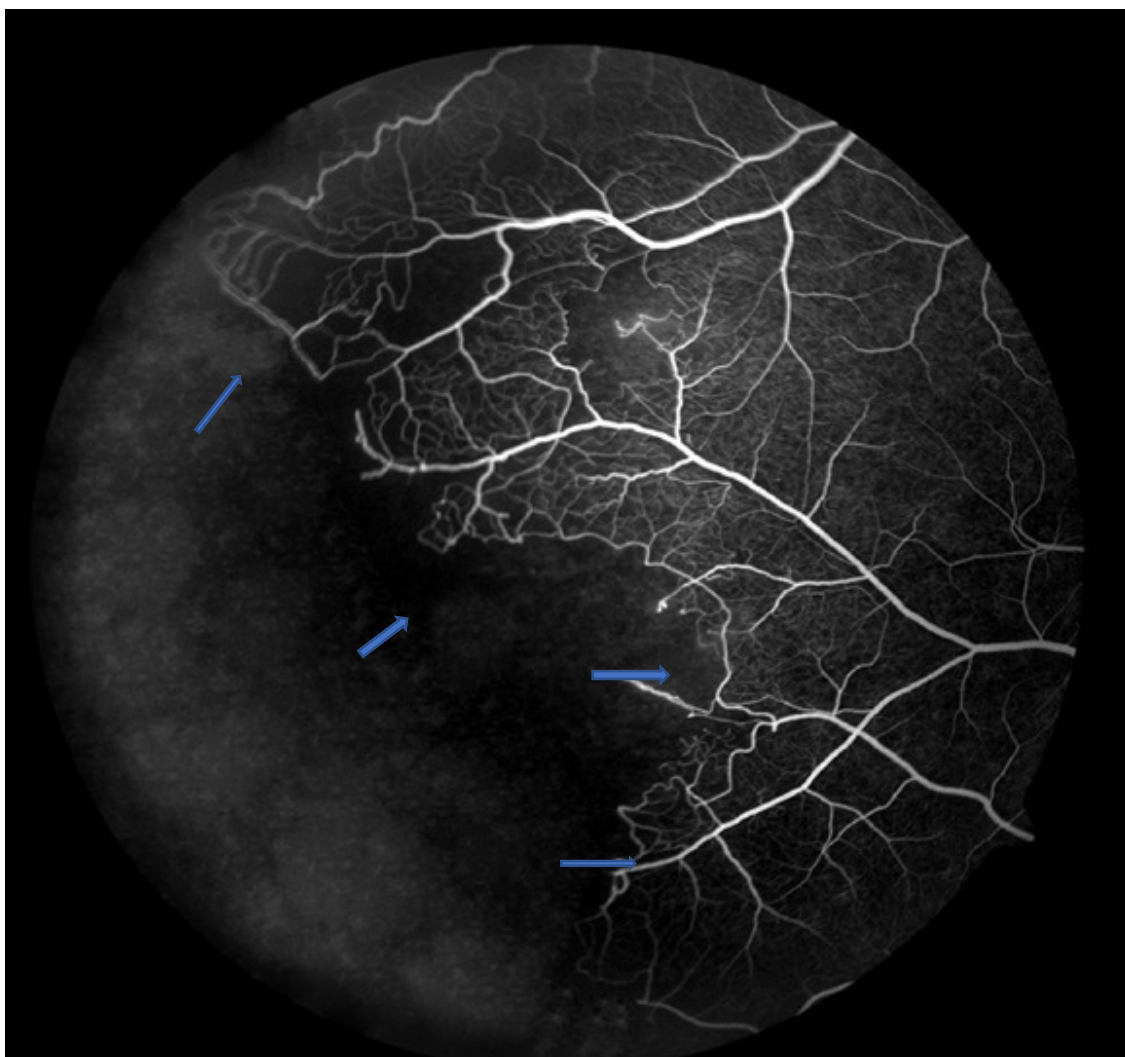


Figure 21. Image angiographique d'une rétinopathie drépanocytaire proliférante stade 2. On note des anastomoses artério-veineuses à la limite entre rétine ischémique et rétine perfusée (flèches).

Stade III : néovascularisation rétinienne périphérique.

Les néovaisseaux rétiens périphériques ont un aspect caractéristique en « éventail de mer » (*sea-fan*) qui rappelle un invertébré marin appelé *Gorgonia flabelum*. En général, les sea-fan naissent à partir d'une anastomose, à la jonction entre rétine

perfusée et non perfusée. Puis ils croissent en direction de la rétine ischémique pré-équatoriale.

Les *sea-fan* peuvent être alimentés et drainés par de multiples artérioles et veinules et se développent sous la limitante interne pour gagner la jonction vitréo-rétinienne. Ils sont localisés par ordre de fréquence dans le quadrant supéro-temporal puis inféro-temporal, supéro-nasal et enfin inféro-nasal. Quasiment toujours pré-équatoriaux, ils sont exceptionnellement postérieurs.

Ce sont de vraies formations néovasculaires comme en témoigne la diffusion de la fluorescéine dès les temps précoces de l'angiographie, traduisant la rupture de la barrière hémato-rétinienne.

L'évolution des *sea-fan* est variable. Ils peuvent continuer à proliférer, d'abord à la surface de la rétine, puis vers la cavité vitréenne. Là, ils peuvent former une membrane néovasculaire fibro-gliale adhérent à la hyaloïde postérieure du vitré pouvant potentiellement se compliquer de tractions rétinienne. A l'inverse, ils peuvent présenter une involution spontanée dans 60% des cas par auto-infarctissement laissant place à des membranes fibrogiales de couleur blanc nacré ou grisâtre, au sein desquelles peuvent persister des néovaisseaux plus ou moins inactifs et plus ou moins nombreux. La physiopathologie de l'auto-infarctissement est probablement multifactorielle. Au sein des *sea-fan*, on retrouve de nombreuses molécules d'adhérence endothéliale des leucocytes ce qui augmenterait le nombre de leucocytes à ce niveau contribuant ainsi à l'auto-infarctissement (132, 251, 326, 373)

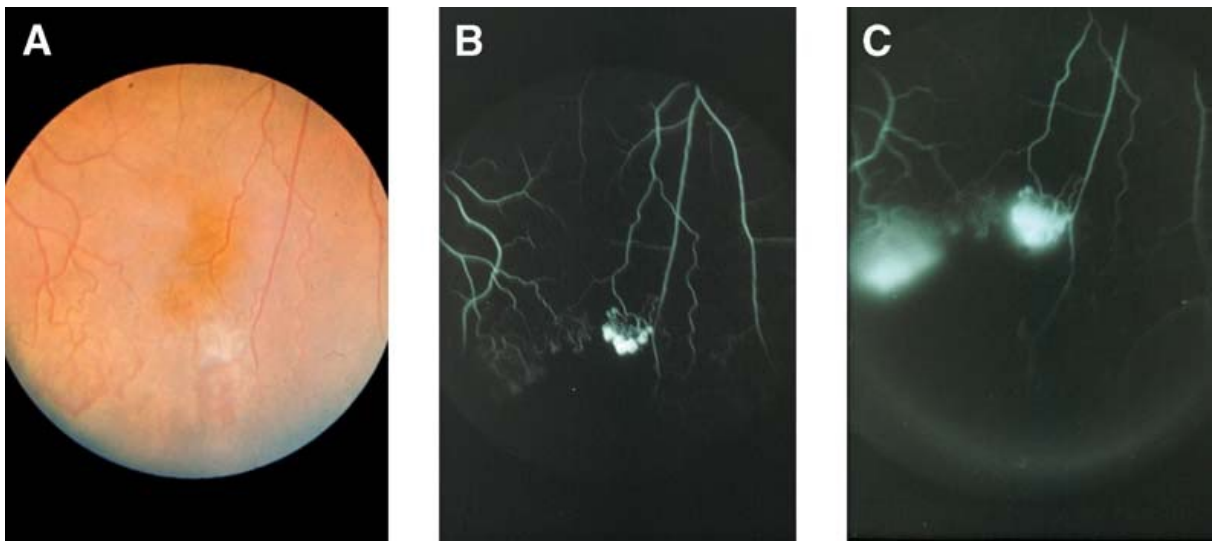


Figure 22. Rétinopathie drépanocytaire proliférante stade III. On note des sea-fan à l'interface entre rétine saine et rétine ischémique. A noter une diffusion de la fluorescéine au niveau des néovaisseaux (138).

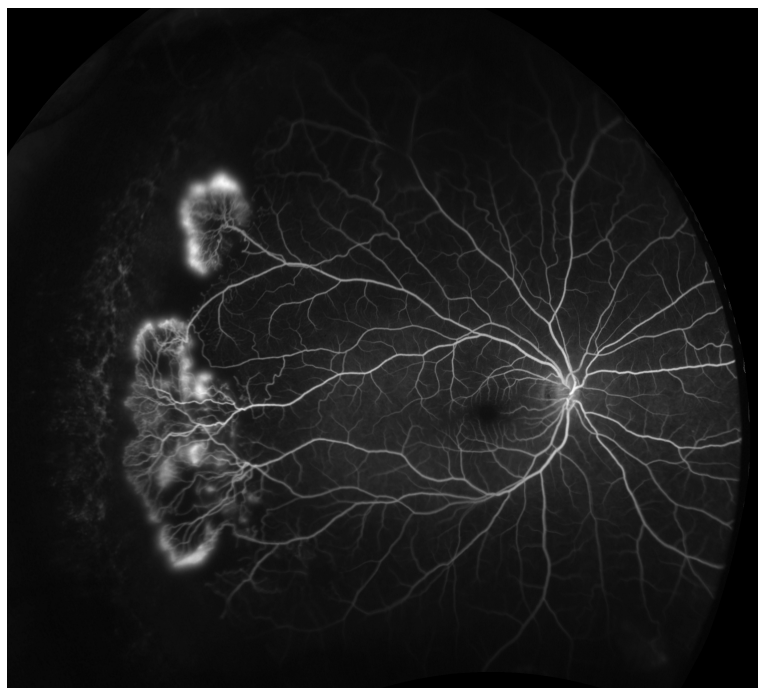


Figure 23. Stade 3 de rétinopathie drépanocytaire proliférante. Il existe des sea fan à la limite entre rétine ischémique et rétine saine (recognizingpathology.optos.com).

Stade IV : hémorragie intravitréenne.

Les tractions s'exerçant sur des néo vaisseaux proliférant vers la cavité vitrénne sont à l'origine de saignements itératifs. Il peut s'agir d'hémorragies rétrohyaloïdiennes périphériques, spontanées, récidivantes, souvent localisées en regard des « sea-fan », fréquemment asymptomatiques. Lorsque l'hémorragie intravitréenne est massive la baisse visuelle est majeure et le fond d'œil non analysable.

Dans tous les cas ces hémorragies sont source d'organisation fibrinohématique progressive du vitré, elle-même responsable de tractions ultérieures sur la rétine et de la progression vers le stade V.

Stade V : décollement de la rétine.

Il est tractionnel et/ou rhégmatoène (138). C'est une complication rare. Il est plus fréquent chez les drépanocytaires SC que chez les SS et les AS (107, 216, 242, 461), conséquence d'une fréquence plus élevée de rétinopathie proliférante chez les SC également.

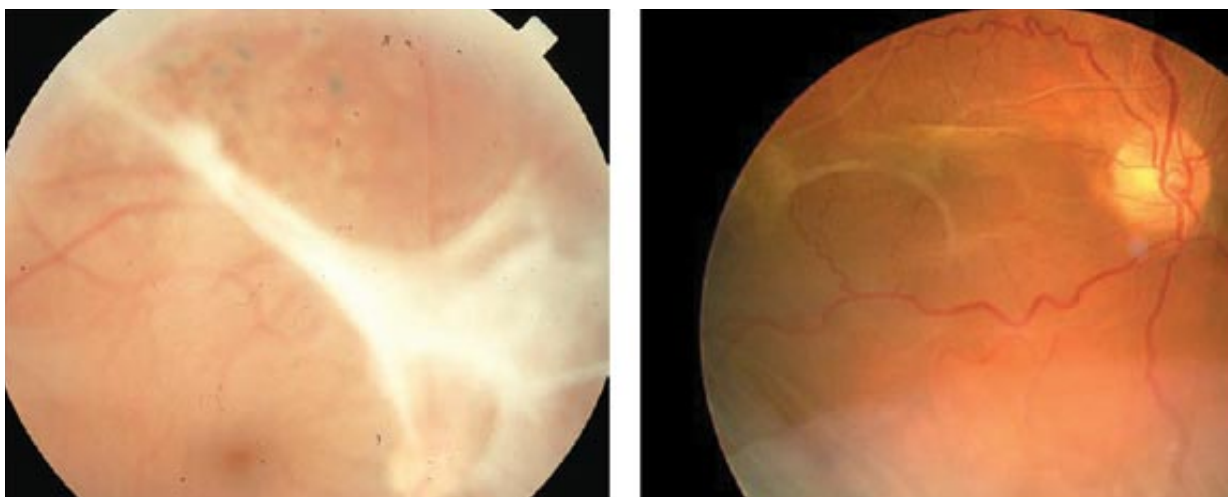


Figure 24. Décollement de rétine tractionnel compliquant une rétinopathie drépanocytaire proliférante (stade 5) (reviewofoptometry.com).

La physiopathologie de la rétinopathie drépanocytaire reste mal comprise. Le lien entre troubles hématologiques et développement de la rétinopathie drépanocytaire a été établi par certains auteurs (199, 406). Hayes et son équipe ont ainsi décrit une association entre la présence d'une rétinopathie drépanocytaire proliférante et des taux élevés d'HbF et de VGM (199). Seuls Lemaire et ses collaborateurs ont mis en évidence une hyperviscosité sanguine chez les patients SC porteurs de rétinopathie drépanocytaire par rapport aux SS (179, 263, 266).

1.4.2.2.3. Maculopathie drépanocytaire

Elle correspond à un amincissement localisé de la macula secondaire à une ischémie. Des études en angiographie fluorescéinique ont mis en évidence une exclusion capillaire périfovéolaire résultant d'une occlusion maculaire artériolaire. Cette absence de perfusion entraîne une dégénérescence et un amincissement de la rétine interne créant une concavité maculaire appelée « signe de la dépression fovéolaire » (175).

Elle peut se manifester à l'examen du fond d'œil comme une augmentation du reflet lumineux à la limite entre rétine atrophique et rétine saine. L'angiographie peut alors révéler un aspect de maculopathie ischémique avec rupture de la maille anastomotique périfovéolaire et élargissement de la zone avasculaire centrale. Cette maculopathie ischémique chronique est, paradoxalement, bien tolérée chez le drépanocytaire avec une acuité visuelle qui reste souvent normale (260, 267). Il est à noter que Mathew et al suggèrent dans leur étude que cette dépression fovéolaire ne serait pas spécifique de la drépanocytose mais correspondrait à une variation ethnique normale des yeux d'origine africaine (289).

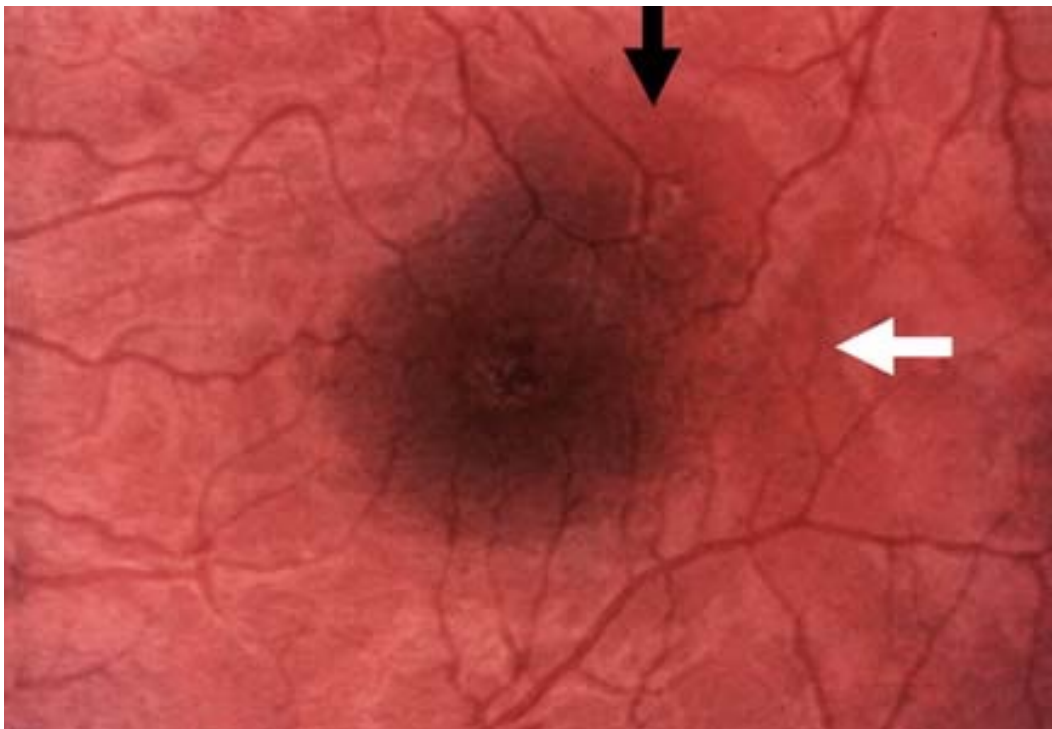


Figure 25. Signe de la dépression fovéolaire. On note des zones d'amincissement rétinien en supéro-temporal de la macula (flèche noire) et le long du raphé temporal (flèche blanche)(138).

Cependant, la maculopathie drépanocytaire est le plus souvent asymptomatique et non décelée à l'examen clinique du fond d'œil. Elle est plus facilement détectable en utilisant une tomographie en cohérence optique spectral domain (SD-OCT) ou une OCT angiographie (OCT-A). Des études histopathologiques ont mis en évidence une perte de fibres internes de la rétine chez les patients drépanocytaires (388). D'autres études cliniques ont montré des zones d'atrophie sévère de la rétine interne et/ou externe à l'OCT, sans signe de non perfusion que ce soit à l'examen clinique ou paraclinique en angiographie fluorescéinique (63, 167, 210, 289). L'étiologie exacte de l'atrophie maculaire en l'absence de signe de non perfusion reste mal comprise. Cependant, de récentes études utilisant l'OCT-A suggèrent qu'une non perfusion au niveau des plexi capillaires rétiens pourrait en être responsable (192, 300, 395).

L'atrophie maculaire temporale pourrait avoir des conséquences sur la fonction visuelle même en l'absence de baisse d'acuité visuelle (287). En effet, les zones d'amincissement maculaire pourraient correspondre à des scotomes paracentraux en micropérimétrie (287).

La physiopathologie de la maculopathie drépanocytaire reste mal connue. Son lien avec la rétinopathie reste à élucider. Si Mathew et ses collaborateurs retrouvent des occlusions artériolaires au niveau du pôle postérieur des patients drépanocytaires de leur étude, ils retrouvent aussi une macula normale chez 49% des patients présentant une rétinopathie drépanocytaire proliférante stade 1 à 3, suggérant l'indépendance de ces deux affections (289).

La macula peut également être le siège d'irrégularités vasculaires : microanévrismes, une dilatation des artérioles pré-capillaires et des capillaires, des microboucles veinulaires et, très rarement, des nodules cotonneux (correspondant à un

infarctus localisé au niveau de la couche des fibres nerveuses) (17, 326, 431).

Ces anomalies sont retrouvées chez 36% des SC, 32% des SS et 20% des S β -thal (17, 285, 431).

Le pôle postérieur rétinien peut également être le lieu d'occlusions artériolaires isolées, avec un aspect classique du vaisseau en « fil d'argent » non perfusé en angiographie. Elles sont le plus souvent situées au niveau du raphé temporal (218).

Une occlusion aiguë et simultanée de plusieurs artéioles à destination maculaire peut induire un infarctus maculaire avec baisse massive et brutale de l'acuité visuelle et accumulation de nodules cotonneux sur la macula. On observe souvent une récupération spontanée de l'acuité visuelle mais souvent partielle (6, 103, 465).

Bien que rare, l'occlusion de l'artère centrale de la rétine, peut également survenir dans la drépanocytose (152, 281, 396).

Des occlusions mixtes de l'artère centrale et de la veine centrale peuvent également se produire engendrant une cécité complète brutale.

Si la maculopathie drépanocytaire semble résulter de mécanismes vaso-occlusifs, son histoire naturelle reste méconnue et aucun facteur de risque n'a pour l'instant été identifié.

1.4.2.2.4. Autres atteintes rétinien

1.4.2.2.4.1. Stries angioïdes

Elles sont retrouvées chez 1 à 2 % des drépanocytaires tous âges confondus. Par contre leur incidence augmente à 20% après 40 ans.

Elles peuvent rarement se compliquer de néovascularisation choroïdienne. Leur pathogénie reste mal comprise : il pourrait s'agir d'un trouble du métabolisme du fer qui se déposerait dans la membrane de Bruch entraînant sa dégénérescence (219).

1.4.2.2.4.2. Trous maculaires et membranes épimaculaires

Ils résultent des altérations de l'interface vitréo-rétinienne de la rétinopathie drépanocytaire proliférante. Cependant, des trous maculaires complets, probablement d'origine ischémique, peuvent aussi être observés chez des individus drépanocytaires relativement jeunes n'ayant pas obligatoirement une rétinopathie périphérique sévère (76, 372).

1.4.2.2.4.3. Occlusions choroïdiennes

Elles semblent résulter d'occlusions vasculaires au sein des artères ciliaires longues postérieures (111, 127, 293, 428). Certains auteurs suggèrent qu'elles pourraient être impliquées dans l'apparition des black sunburst (104). Les observations histopathologiques retrouvent des GR agrégés, de la fibrine, et des thrombi fibrinoplaquettaires (275). Les occlusions choroïdiennes pourraient également être impliquées dans la survenue des stries angioïdes (138)

1.4.2.2.5. Evolution naturelle de la rétinopathie et de la maculopathie drépanocytaire

1.4.2.2.5.1. Rétinopathie drépanocytaire.

L'évolution naturelle de la rétinopathie drépanocytaire proliférante reste mal connue. Raichand et ses collaborateurs rapportent dans une étude prospective un délai d'apparition des néovaisseaux de 2 à 3 mois après le passage au stade 2 (anastomoses artério-veineuses). Le passage du stade 2 au stade 3 se produisant dans 14% des cas par an (373). L'évolution péjorative de la rétinopathie drépanocytaire proliférante semble rare. Ainsi, Downes décrit dans une étude portant

sur 473 patients drépanocytaires suivis de leur naissance à l'âge de 20 ans, un faible nombre de complications graves et seulement deux cas de perte fonctionnelle. Dans la majorité des cas, la rétinopathie drépanocytaire proliférante a peu ou pas du tout progressé d'un examen à l'autre (132).

Les néo-vaisseaux peuvent régresser spontanément par auto-infarctissement et fibrose, et ce, dans 30 à 40% des cas (178, 327). Cependant, même si on peut observer une régression spontanée des néovaisseaux dans un secteur rétinien particulier, d'autres peuvent apparaître et continuer à évoluer dans d'autres secteurs rétiniens d'un même œil (327, 373).

Le suivi ophtalmologique régulier des patients drépanocytaires est donc primordial afin de dépister le plus précocement possible les patients à risque d'évolution péjorative et d'adopter un schéma de surveillance et de traitement adapté (110, 311). Il serait également intéressant de mettre en évidence d'éventuels facteurs de risque afin de guider la prise en charge.

1.4.2.2.5.2. Evolution de la maculopathie drépanocytaire

Aucune étude n'a pour l'instant permis d'exposer un schéma d'évolution de la maculopathie drépanocytaire.

Comme nous l'avons vu plus haut, Mathew et ses collaborateurs suggèrent une évolution indépendante entre maculopathie et rétinopathie drépanocytaire (289).

1.5. TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE

1.5.1. Traitements systémiques

La drépanocytose présente une grande variété de présentation clinique. Malgré les nombreuses recherches mises en œuvre ces dernières années, les outils thérapeutiques restent limités.

1.5.1.1. Dépistage néonatal et éducation thérapeutique

Le diagnostic précoce de la pathologie est primordial afin d'en améliorer le pronostic. De ce fait, des programmes de dépistage ont été développés. Le premier a été mis en œuvre de façon expérimental en 1983 aux Antilles. Il a ensuite été étendu à la France métropolitaine en 1985.

Sa mise en route systématique date de 1984 aux Antilles et 2000 au niveau national (170).

L'éducation thérapeutique est également primordiale dans la prise en charge des enfants drépanocytaires. On enseigne aux enfants et à leurs parents d'une part les signes annonciateurs de complications potentiellement graves : fièvre, asthénie, altération de l'état général, splénomégalie mais aussi les situations à risques de complications vaso-occlusives : changement brutal de température, déshydratation, altitude

1.5.1.2. Prévention des infections

Les infections bactériennes sont une cause fréquente de décès chez l'enfant drépanocytaire (262, 368, 445). Gaston et al ont montré en 1986 qu'une antibioprophylaxie quotidienne par pénicilline réduirait de 84% l'incidence des infections à pneumocoque dans un groupe traité vers le groupe placebo (165).

Cependant, du fait du risque de non observance et du développement de souches bactériennes de sensibilité diminuées à la pénicilline, la vaccination anti-pneumococcique est systématiquement réalisée chez les drépanocytaires (309).

1.5.1.3. Traitements antalgiques

Les CVO douloureuses sont les manifestations cliniques les plus fréquentes de la pathologie. Leur intensité est extrêmement variable et nécessite la mise en place de traitements adaptés allant du paracétamol aux morphiniques dont l'administration peut nécessiter une hospitalisation.

1.5.1.4. Les échanges transfusionnels

L'objectif des échanges transfusionnels est de remplacer les GR drépanocytaires par des globules rouges normaux provenant de donneurs sains. Ils permettent en outre d'augmenter le taux d'hémoglobine. Le but est de ramener la concentration d'hémoglobine S à moins de 30% du taux total d'hémoglobine, sans dépasser 11g/dL (hématocrite à 35%), taux au-delà duquel pourraient se développer des complications en rapport avec une hyperviscosité sanguine (20, 73, 436, 452).

Cependant, compte-tenu du caractère chronique de la drépanocytose, une stratégie de transfusion de longue durée n'est pas sans risque : allo-immunisation chez les patients polytransfusés dont les phénotypes érythrocytaires peuvent-être différents de ceux des donneurs de sang souvent d'origine européenne, surcharge en fer (13, 401, 437).

1.5.1.5. Hydroxyurée

L'hémoglobine fœtale, comme nous l'avons déjà vu, inhibe la polymérisation de l'hémoglobine S en s'intercalant dans les fibres de désoxyhémoglobine (341, 405).

L'administration d'un traitement par hydroxyurée est associée à une augmentation du taux d'hémoglobine F, et diminue ainsi la polymérisation de l'hémoglobine S (50, 86, 131, 429, 435). L'hydroxyurée diminue la fréquence des CVO et des STA ainsi que le besoin en transfusion.

Aucun effet sur les complications ophtalmologiques de la drépanocytose, n'a pour l'instant été mis en évidence.

1.5.1.6. Saignées

Les patients drépanocytaires peuvent aussi bénéficier de saignées associées ou non au traitement par hydroxyurée (19, 243). Les saignées réduisent l'hyperviscosité sanguine en diminuant le taux d'Hb et en diminuant la concentration corpusculaire moyenne en Hb, ce qui engendre une diminution de la polymérisation de l'HbS en cause dans la drépanocytose (59). Les phlébotomies sont plus fréquemment réalisées chez les drépanocytaires SC en raison de leur hyperviscosité sanguine par rapport aux sujets SS. Cependant (270, 282), Summarell et Sheehan ont évalué le traitement par hydroxyurée associé aux phébotomies chez les drépanocytaires SC et concluent que ce traitement combiné pourrait être bénéfique chez les patients non améliorés par l'hydroxyurée seule (439).

1.5.1.7. Greffe de moelle osseuse

Il s'agit du seul traitement curatif de la drépanocytose. La moelle osseuse est le lieu de production des globules rouges. Au cours, du processus de transplantation, dans

un premier temps, la moelle osseuse du patient drépanocytaire est détruite par chimiothérapie. Puis, dans un deuxième temps, elle est remplacée par la moelle saine prélevée chez un donneur HLA compatible (en général, un frère ou une sœur). Cette procédure permettrait d'augmenter la survie globale (51).

1.5.1.8. Perspectives thérapeutiques

1.5.1.8.1. Antioxydants

Compte-tenu du rôle joué par le stress oxydant dans la physiopathologie de la drépanocytose, la question de traitements anti-oxydants s'est naturellement posée. Cependant, très peu d'essais cliniques sont disponibles, ce qui limite l'évaluation de ces traitement anti-oxydants dans la drépanocytose (417).

1.5.1.8.2. Thérapie génique

La drépanocytose SS résulte d'une mutation portée à l'état homozygote affectant le gène de la β -globine engendrant une HbS qui va ensuite se polymériser. S'il s'agit d'un modèle de choix pour la thérapie génique, il a fallu surmonter un grand nombre de difficultés avant d'obtenir les outils moléculaires indispensables à la mise en place de cette approche thérapeutique. Toutefois, Ribeil et ses collaborateurs ont inoculé en 2017 un vecteur lentiGlobin BB305 « antifalciformation » contenant un gène de β -globine dans des cellules souches hématopoïétiques autologues. Quinze mois après le début du traitement, le taux d'hémoglobine « anti-falciformation » restait élevé (environ 50% des chaînes de β -globine) sans récurrence de CVO et diminution de

l'hémolyse (383). Un suivi plus long est nécessaire afin d'évaluer la durabilité de l'efficacité mais aussi l'innocuité à long terme d'une telle procédure.

Il est à noter que les patients les plus jeunes restent plutôt réticents à la thérapie génique par méconnaissance du processus mais aussi peur d'éventuels effets secondaires (infertilité notamment). Des efforts supplémentaires restent à fournir afin d'améliorer la compréhension de ce traitement et de permettre ainsi aux patients plus jeunes de l'accepter (434).

1.5.2. Traitement ophtalmologique des atteintes rétinienne

Étant donné le taux élevé de régression spontanée et d'absence d'évolutivité fréquente des néovaisseaux imprévisibles, les indications de traitement de la rétinopathie drépanocytaire proliférante restent mal définies. Cependant, les traitements restent indiqués en cas de rétinopathie drépanocytaire proliférante compliquée d'hémorragie intravitréenne spontanée, de larges « sea-fan » rapidement évolutifs, ou dans le cas où un œil présenterait déjà une cécité secondaire à la rétinopathie drépanocytaire proliférante. Dans ce dernier cas, si l'œil restant ne présente que très peu de signe de néovascularisation, une surveillance rapprochée serait également licite.

Habituellement le traitement est indiqué au stade 3 afin de prévenir la survenue d'une hémorragie intravitréenne ou d'un décollement de rétine. En cas de traitement précoce, cela pourrait permettre d'éviter le recours à la chirurgie vitéo-rétinienne et donc la survenue des complications inhérentes à cette procédure.

1.5.2.1. Photo-coagulation du vaisseau nourricier

Dans une étude randomisée, la photo-coagulation laser directe d'une artériole nourricière ou d'une veinule de drainage d'un « sea-fan » a permis d'occlure ces derniers dans 88% des yeux, ce qui a permis de diminuer le taux de survenue d'hémorragie intra-vitréenne et la baisse d'acuité visuelle concomitante (217). Cette technique présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, un « sea-fan » peut avoir plusieurs artérioles nourricières et plusieurs veinules de drainage. Par ailleurs, du fait des paramètres élevés (impacts longs et de puissance élevée), du laser utilisé, certaines complications potentiellement graves peuvent survenir au décours d'une telle procédure : néovascularisation choroïdienne, néovascularisation chorio-vitréenne, décollement de rétine (77, 106, 126, 155, 162, 176, 221, 319). Une étude a rapporté 32% de complications dans les 6 mois suivant le traitement (217). La plupart des spécialistes ont abandonné cette technique au profit de la photo-coagulation pan-rétinienne.

Cependant, il semblerait que la photo-coagulation du vaisseau nourricier soit supérieure à la photo-coagulation pan-rétinienne pour traiter les néovaisseaux surrélevés (375).

1.5.2.2. Photo-coagulation pan-rétinienne

Elle a elle aussi démontré son efficacité dans la réduction des hémorragies intra-vitréennes et de la baisse d'acuité visuelle consécutive (151).

Elle consiste en une photo-coagulation périphérique confluyente des territoires ischémiques antérieurs à la prolifération néovasculaire. Il s'agit donc d'un traitement limité aux zones comportant des néovaisseaux (151, 220).

Cette technique induit une involution des néovaisseaux en diminuant la sécrétion de vascular endothelial growth factor (VEGF) par la rétine ischémisée dans les suites d'une

vaso-occlusion. La cicatrice du laser augmenterait également l'adhérence chorioretinienne limitant théoriquement le risque de survenue de décollement de rétine (138). Dans le cas de néovaisseaux surrélevés, la pan-photocoagulation peut être associée au laser focal du vaisseau nourricier (375).

Dans les yeux présentant un « sea fan » isolé ou moins de 60 degrés de néovascularisation, les indications de laser sont moins claires étant donné le risque peu élevé d'hémorragie intravitréenne et de perte de la vision (106). De nombreux cliniciens, considèrent dans le même temps, qu'étant donné le peu de complications inhérentes à la photocoagulation panrétinienne, elle devrait être réalisée quelque-soit le degré de néovascularisation observée (151). L'exception pourrait être les drépanocytaires SS de plus de 40 ans, car 86% d'entre eux présentent des lésions stables et/ou spontanément régressives (156).

Un examen ophtalmologique régulier est nécessaire afin de suivre l'évolution des lésions. Les patients bénéficiant d'un suivi régulier sont les candidats de choix pour la panphotocoagulation localisée. De nouveaux fronts de néovascularisation peuvent apparaître dans des yeux déjà pan-photocoagulés (34% des cas) (151).

1.5.2.3. Chirurgie vitréo-rétinienne

La chirurgie vitréo-rétinienne présente un plus fort taux de complications per et post-opératoires chez les patients drépanocytaires que chez les patients non porteurs d'hémoglobinopathie (105, 261). De ce fait, ses indications sont très strictes (177, 391). En cas d'hémorragie intravitréenne récente, un suivi régulier du fond d'œil est préconisé jusqu'à éclaircissement des milieux. Si le fond d'œil devient accessible, un traitement au laser est indiqué. Par contre, en cas de fond d'œil inaccessible, un suivi

échographique mensuel est nécessaire afin de dépister tout décollement de rétine qui entraînerait une chirurgie plus précoce (138).

La vitrectomie est indiquée en cas d'hémorragie intravitréenne rendant l'accès au fond d'œil impossible et à fortiori la réalisation d'une photocoagulation pan-rétinienne ab-externo à lampe-à-fente, ou en cas de décollement de rétine. Si la fonction visuelle s'améliore et permet au patient de pratiquer ses activités normalement, la chirurgie est différée.

En fait, la vitrectomie associée à l'endolaser est indiquée en cas d'hémorragie intravitréenne évoluant depuis plus de 6 mois, rendant impossible la pratique du laser en consultation (138).

Les complications per-opératoires sont l'ischémie maculaire et/ou papillaire secondaire à une hypertension per-opératoire, CVO(138). Par la suite, des complications post-opératoires sont également possibles. Tout d'abord, la vitrectomie sur un œil aphake peut entraîner le passage de GR de la cavité vitréenne vers la chambre antérieure. Ils peuvent s'accumuler au niveau du trabéculum, bloquer ainsi l'évacuation de l'humeur aqueuse et ainsi induire le développement d'un glaucome aigu (6). La complication la plus redoutable reste l'imprévisible ischémie aiguë du globe oculaire.

Afin de diminuer le risque de survenue de ces complications, des précautions particulières peuvent-être prise. Afin de prévenir les crises vaso-occlusives et les complications ischémiques, des échanges transfusionnels peuvent être réalisés afin d'obtenir un taux d'HbA de 50 à 60% et un hématokrite à 35% (64).

Pour diminuer le risque d'ischémie du globe oculaire, une anesthésie loco-régionale est préférable. De plus, les indentations doivent-être évitées. (261).

1.5.2.4. Injections intravitréennes d'agents anti-angiogéniques (anti-VEGF)

Dans la littérature, seuls quelques cas d'utilisation d'anti-VEGF dans la drépanocytose ont été publiés (23, 296, 301, 313).

L'idée de leur utilisation est sous-tendue par le fait que la rétine ischémique dans les suites d'une vaso-occlusion, sécrète du VEGF à l'origine du développement des néovaisseaux (138).

2. TRAVAUX DE RECHERCHE

2.1. Objectifs et mise en place des études

La drépanocytose est une maladie complexe faisant intervenir plusieurs mécanismes physiopathologiques : phénomènes vaso-occlusifs, inflammation, stress oxydant, anomalies hématologiques, hémorhéologiques. Les rôles joués par tous ces processus dans le développement des complications systémiques de la drépanocytose font l'objet de nombreuses études.

Cependant, à ce jour, les mécanismes impliqués dans le développement de la rétinopathie et de la maculopathie drépanocytaires restent mal identifiés.

Par ailleurs, si le profil évolutif de la rétinopathie drépanocytaire a été décrit, celui de la maculopathie drépanocytaire reste peu compris. Son début reste mal défini, étant donné que des lésions histologiques peuvent être présentes sans atteinte fonctionnelle.

Mon travail de thèse a donc eu pour objectif :

- De rechercher les facteurs de risques génétiques et épidémiologiques de la rétinopathie et maculopathie drépanocytaires.
- De rechercher des facteurs de risques hématologiques et hémorhéologiques de ces complications.
- De savoir s'il s'agit de deux complications indépendantes ou associées.
- De mieux caractériser la maculopathie drépanocytaire afin de savoir si des atteintes maculaires électrophysiologiques pourraient être présentes sans maculopathie clinique suggérant un début plus précoce de l'affection.

2.2. MATERIEL ET METHODE

2.2.1. Type d'étude

L'étude 1 est prospective monocentrique portant sur 70 patients drépanocytaires : 33 SC et 37 SS.

L'étude 2 est également prospective monocentrique regroupant 54 patients drépanocytaires (32 SS et 22 SC) et 64 témoins sains.

2.2.2. Recrutement des patients et critères d'inclusion

Dans les deux études, les patients étaient suivis à l'unité transversale de la drépanocytose du CHU de Pointe-à-Pitre et suivis annuellement au sein du service d'ophtalmologie du CHU de Pointe-à-Pitre.

Les patients ont été inclus de janvier 2014 à Décembre 2016.

2.2.2.1. Critères d'inclusion (études 1 et 2)

Tous les patients étaient drépanocytaires.

Tous les patients étaient âgés de plus de 18 ans.

2.2.2.2. Critères d'exclusion (études 1 et 2)

Nous avons exclu tous les patients âgés de moins de 18 ans, ayant présenté une CVO ou complications médicales aiguës, bénéficié de transfusions sanguines ou de saignées dans les 3 mois ayant précédé la consultation. Nous avons également éliminé les patients bénéficiant d'un traitement pouvant modifier la rhéologie sanguine. La présence d'une pathologie vasculaire proliférative rétinienne tel qu'une rétinopathie

diabétique proliférante ou une occlusion veineuse ou artérielle rétinienne constituait aussi un critère d'exclusion.

2.2.3. Paramètres étudiés

Pour chacun des patients, nous avons recueilli les paramètres suivants :

2.2.3.1. Critères sociodémographiques, cliniques (études 1 et 2)

A savoir, la date de naissance, l'âge au moment de l'examen clinique, le sexe et le génotype.

2.2.3.2. Antécédents médicaux

Dans l'étude 1, Nous avons recherché les antécédents médicaux suivant :

- hypertension artérielle
- ostéonécrose
- néphropathie
- diabète
- déficit en Glucose 6 phosphate deshydrogénase (G6PD)
- antécédent de traitement par hydroxyurée
- antécédent de survenue de CVO entre un an et 3 mois avant l'examen clinique.

2.2.4. Données cliniques et biomicroscopiques de la drépanocytose.

2.2.4.1. Etude 1

Pour chaque patient, un examen ophtalmologique complet a été réalisé. Leur acuité visuelle a été mesurée grâce à l'échelle de Snellen. Puis nous avons recherché au niveau du segment antérieur des zones d'atrophie ou de rubéose irienne, une cataracte. La pression intraoculaire a aussi été mesurée à l'aplanation.

Un fond d'œil a également été fait afin de rechercher et de classer en stades une éventuelle rétinopathie drépanocytaire proliférante. Nous avons aussi noté la présence de cicatrices de photocoagulation rétinienne.

2.2.4.2. Etude 2

Chaque patient a également bénéficié d'un examen ophtalmologique complet avec mesure de l'acuité visuelle par l'échelle de Snellen et examen minutieux du fond d'œil.

2.2.5. Examen de la rétine en Ocular Coherence Tomography (OCT) (études 1 et 2)

Afin, de rechercher la maculopathie drépanocytaire, tous les patients ont bénéficié d'un examen de la rétine en OCT. L'appareil utilisé était un Copernicus SD-OCT (Copernicus, Optopol Technologies, Zawierci, Poland, spectral domain). L'OCT ou « Optical Coherence Tomography », qui se traduit par tomographie par cohérence optique, est une technique d'imagerie non invasive en ophtalmologie qui permet d'explorer les structures de l'œil. L'OCT permet d'explorer le segment antérieur ou le segment postérieur de l'œil, et en particulier la cornée et la rétine. Le principe de l'OCT repose sur l'interférométrie au laser, qui est fondé sur un phénomène optique. L'interférométrie combine l'analyse de longueurs d'onde de la lumière de référence et de la lumière réfléchie par les structures de l'œil. Les propriétés de réflexion et d'absorption de la lumière par les tissus de l'œil sont la source de contraste des images

d'OCT, révélatrices d'informations morphologiques. Classiquement, L'OCT produit des images en coupe axiale (en mode B tout comme l'imagerie échographique).

La tomographie par cohérence optique existe depuis le début des années 2000.

C'est un examen non invasif, de pratique courante. Au niveau du segment postérieur de l'œil, et en particulier de la macula, l'OCT réalise des coupes proches des données histologiques, permettant ainsi de préciser les lésions rétiniennes suspectées à l'examen du fond d'œil.

Dans la drépanocytose, cet examen permet de rechercher une maculopathie qui est, comme nous l'avons vu, souvent asymptomatique. L'OCT pourra mettre en évidence une diminution de l'épaisseur maculaire et précisera sa topographie, les couches rétiniennes affectées.

Dans notre étude, nous avons réalisé une OCT bilatérale et comparative systématiquement, même en l'absence de signe d'appel à l'examen clinique.

2.2.6. Electrorétinogramme multifocal (mfERG) : étude 2

Le mfERG est un test diagnostique non invasif permettant de mesurer le signal électrique des cellules rétiniennes (nerveuses ou non) en réponse à un stimulus lumineux. La lumière induit des modifications dans le passage transrétinien des ions (Na^+ et K^+) générant ainsi une réponse électrique. Selon le protocole ISCEV (International Society of Clinical Electrophysiology of Vision), le mfERG évalue le système des cônes sur 103 hexagones au niveau du pôle postérieur. Le stimulus lumineux est constitué d'une séquence de flash appliqués sur l'œil. Les réponses électriques sont recueillies via une électrode cornéenne. La réponse typique est une onde biphasique avec une déflexion négative initiale suivie d'un pic positif. S'ensuit une seconde déflexion négative. Ces 3 pics sont appelés N1, P1 et N2 respectivement.

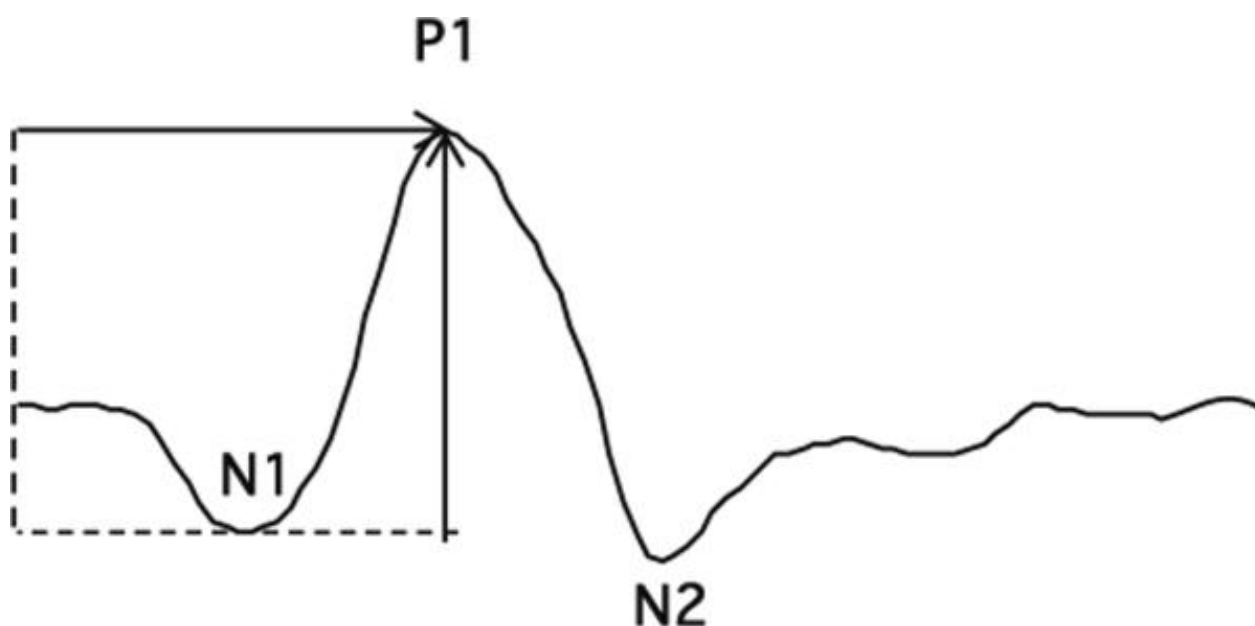


Figure 26: diagramme de la réponse biphasique typique en mfERG. Les flèches montrent d'une part l'amplitude "Through to peak" (flèche verticale) et d'autre part le temps implicite (flèche horizontale) (212).

2.2.7. Matériels et méthodes hématologiques et hémorhéologiques

2.2.7.1. Prélèvements sanguins (études 1 et 2)

Le recueil du sang a été réalisé au cours du bilan biologique annuel réalisé par les patients à l'Unité Transversale de Drépanocytose.

Suivant les instructions du guide international des bonnes pratiques en hémorhéologie, après un repos de 10 min, le sang était prélevé sur tube EDTA (Ethylenediaminetétraacétique) au niveau d'une veine située à la face antérieure de l'avant-bras (38).

2.2.7.2. Mesures hématologiques, biochimie et biologie moléculaire

Dans les 2 études, la numération formule sanguine, le taux de plaquettes, le volume globulaire moyen (VGM) et le taux d'hémoglobine étaient mesurées à l'aide d'un compteur hématologique (Mas M-Retic, Coulter, USA) dans les 4 heures suivant le prélèvement sanguin à l'EDTA.

Dans l'étude 1, afin de mesurer l'hématocrite, après avoir homogénéisé, le sang natif prélevé sur EDTA était placé dans deux tubes capillaires de 50 μ L (duplicate). Ces tubes étaient ensuite microcentrifugés pendant 10 min à 9500 g afin de séparer les éléments figurés du plasma.

Le pourcentage d'éléments figurés était ensuite obtenu à l'aide d'une réglette prévue à cet effet (Hawksley micro-Hematocrit reader)

La lactate déshydrogénase (LDH) a été mesurée photométriquement par un analyseur automatisé (Hitachi 912, Roche Ltd.)

Une immunoélectrophorèse en phase solide (Phase Range canine C-Reactive Protein Assay, Tridelata Ltd.) a été utilisée afin de déterminer la Protéine C-réactive (CRP).

6 délétions communes de l'alpha-thalassémie ont été recherchées en utilisant une approche de GAP-PCR (334) ;

2.2.7.3. Mesures hémorhéologiques (étude 1)

Afin de ne pas altérer les GR, les mesures ont été réalisées dans les 4 heures suivant le prélèvement sanguin. Avant toutes choses, nous avons oxygéné le sang durant 10 minutes dans un tube de volume au moins 20 fois supérieur au volume de sang (38). L'oxygénation du sang des patients drépanocytaires est primordiale étant donné que l'hémoglobine S polymérise en cas de désaturation en O₂.

2.2.7.3.1. Viscosité sanguine

Nous avons utilisé un viscosimètre cône-plan (Brookfield, modèle LVDV-II+PRO, cône CPE 40). Il est composé d'une surface fixe (le plan), d'une surface mobile (le cône) et d'un axe sur lequel se fixait le cône. L'axe comprenait un ressort et enregistrait la résistance (c'est-à-dire la contrainte de cisaillement τ) exercée par le sang sur le cône. Au début du test, nous avons ajusté l'entrefer, c'est-à-dire, la distance, e , entre le plan et le cône.

Ainsi, à partir de la vitesse de rotation V choisie pour la mesure, le viscosimètre mesurait la vitesse de cisaillement γ ($\gamma = V/e$). Puis, la viscosité sanguine était calculée à partir de la contrainte de cisaillement exercée par le sang sur l'axe et de la vitesse de cisaillement.

Nous avons ensuite mesuré la viscosité sur du sang à hématocrite natif à 5 vitesses de cisaillements différentes : 11.5, 22.5, 45, 90 et 225 s^{-1} . Le sang étant un fluide thixotropique, la vitesse de rotation du cône a été augmentée de manière croissante et chaque valeur de viscosité a été relevée après 30 secondes de rotation du disque afin d'obtenir des valeurs stables.

Mesure de la déformabilité et de l'agréation érythrocytaire.

La déformabilité et l'agréation érythrocytaire ont été mesurées à l'aide du LORCA (Laser Assisted Optical Rotational Cell Analyser). Deux cylindres se trouvaient dans ce système : un fixe au centre et un mobile à l'extérieur. Ces deux cylindres définissaient un espace appelé entrefer dans lequel était placée la suspension étudiée (globules rouges en tampon ou sang total). La vitesse de rotation du cylindre mobile

définissait les contraintes de cisaillement appliquées à la suspension étudiée dont la viscosité était connue (pour la mesure de la déformabilité érythrocytaire).

2.2.7.3.2. Déformabilité érythrocytaire

Nous avons utilisé le LORCA afin de mesurer la déformabilité érythrocytaire à 9 contraintes de cisaillement allant de 0,3 à 30 Pa. Nous avons ainsi pu obtenir une courbe de déformabilité.

2.2.7.3.2.1. Préparation de l'échantillon étudié

Nous avons mélangé une suspension de sang oxygéné à une solution de polyvinylpyrrolidone (PVP), à une concentration de 2 μ L de globules rouges par 1 mL de PVP (ce qui correspond à un hémocrite de 0,2%). Le PVP est une solution isotonique dont la viscosité est d'environ 30 mPa.s à 37°C (11, 38). Ensuite, nous avons mis 1 mL de cette suspension dans l'entrefer. Les mesures débutaient dès que la suspension atteignait la température de 37°C.

2.2.7.3.2.2. L'ektacytomètre

L'ektacytomètre (LORCA) comprenait un laser situé dans le cylindre central statique émettant une lumière, à 670 nm de longueur d'onde, qui traversait la suspension de sang diluée dans le PVP. Les hématies présentes dans la suspension diffractaient alors partiellement la lumière laser. Lorsque les contraintes de cisaillement augmentaient (par une augmentation de la vitesse de rotation du cylindre externe), les érythrocytes se déformaient et modifiaient le pattern de diffraction. Ce pattern de diffraction était projeté sur un écran et enregistré par une caméra. Nous obtenions de cette façon un indice d'élongation (EI ou Elongation Index), en fonction de la largeur

(b) et de la longueur (a) moyenne de l'ellipse se superposant au pattern de diffraction laser des globules rouges :

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

Plus EI est grand, plus la déformabilité érythrocytaire est grande. Il faut tout de même noter qu'à faible et moyenne contraintes de cisaillement (< 3Pa), EI reflète les propriétés de déformabilité de la membrane alors qu'à fortes contraintes de cisaillement (30 Pa), les valeurs d'EI dépendent beaucoup de la viscosité interne des globules rouges et du rapport surface/volume des érythrocytes (100).

La principale limite de cette technique est qu'elle ne donne qu'une valeur de déformabilité moyenne, alors que la déformabilité érythrocytaire dépend de la population érythrocytaire étudiée (réticulocytes, discocytes jeunes, denses, drépanocytes irréversibles). Dans le cas de cellules rigides, tels que les globules rouges drépanocytaires, la mesure de l'indice élongation peut être affectée (un élément central circulaire se superposerait au centre de l'image diffractée). De ce fait, il conviendrait d'utiliser des techniques permettant un traitement optique de l'image cellule par cellule afin de distinguer les sous populations érythrocytaires (128, 380, 433). Pour pallier cette limite, nous avons standardisé la taille de l'image du pattern de diffraction récupéré par la caméra (3,8 cm × 4,5 cm × 5,4 cm) et mesuré la taille du pattern directement sur l'écran à l'aide d'une règle (382).

2.2.7.3.3. Agrégation érythrocytaire

L'agrégation érythrocytaire a été mesurée par syllectométrie, c'est-à-dire par mesure de la variation de l'intensité de la lumière laser réfléchie au cours du temps grâce au LORCA. Les mesures ont été faites à 37° après ajustement de l'hématocrite à 40% (étant donné que le taux d'hématocrite influence fortement l'agrégation érythrocytaire). Ainsi mesurée, l'agrégation érythrocytaire rendait compte de la vitesse et de l'amplitude de l'agrégation érythrocytaire.

Dans le cylindre fixe, le laser envoyait une lumière qui était réfléchie par les globules rouges présents dans l'entrefer. La lumière réfléchie était ensuite collectée par deux photodiodes également situées à l'intérieur du cylindre fixe et ensuite convertie en un signal électrique. L'intensité de la lumière réfléchie variant avec la taille des agrégats, cette technique renseignait aussi sur le processus dynamique de formation des agrégats érythrocytaires.

4 étapes peuvent être distinguées au cours d'un syllectogramme (129) :

- 1- Les globules rouges sont étirés et alignés dans le sens du flux. Ils réfléchissent une lumière à l'origine d'un plateau initial durant la phase de désagrégation érythrocytaire. Le cylindre mobile externe tourne à forte vitesse de cisaillement (ie 800 s^{-1}) afin de séparer les agrégats érythrocytaires préexistants. L'intensité de la lumière réfléchie dépend du stade d'élongation et donc de la vitesse de cisaillement.
- 2- C'est le stade de restauration. Il suit immédiatement l'arrêt de la rotation du cylindre. Les globules rouges perdent leur alignement et reviennent à leur forme biconcave de repos. Ce stade de récupération s'accompagne d'une augmentation

exponentielle de la lumière réfléchie se traduisant par un pic de forte intensité sur le syllectogramme (294). Grâce à cette phase, nous pourrions avoir des renseignements sur l'élasticité membranaire des GR mais elle est rarement exploitée. Il faudrait resuspendre les érythrocytes dans un tampon standard (HEPES ou PBS), ce qui permettrait de normaliser la viscosité du fluide de suspension : ce qui n'est pas le cas si on travaille avec du sang total (38).

- 3- L'agrégation érythrocytaire débute durant la phase de restauration quand les forces de cisaillement externes ne parviennent plus à maintenir les globules rouges désagrégés. Les globules rouges forment alors des agrégats, des « rouleaux » similaires à des piles de pièces de monnaie. La lumière réfléchie diminue alors de façon exponentielle avec une constante de temps d'environ 1 à 3 secondes pour le sang humain (144).
- 4- Les rouleaux se rapprochent par leur partie terminale et latérale pour former des agrégats érythrocytaires en 3 dimensions, plus solides que les agrégats érythrocytaires en 2 dimensions. Dans le sang humain, cette phase est beaucoup plus lente avec une constante de temps d'environ 10-25 s (369).

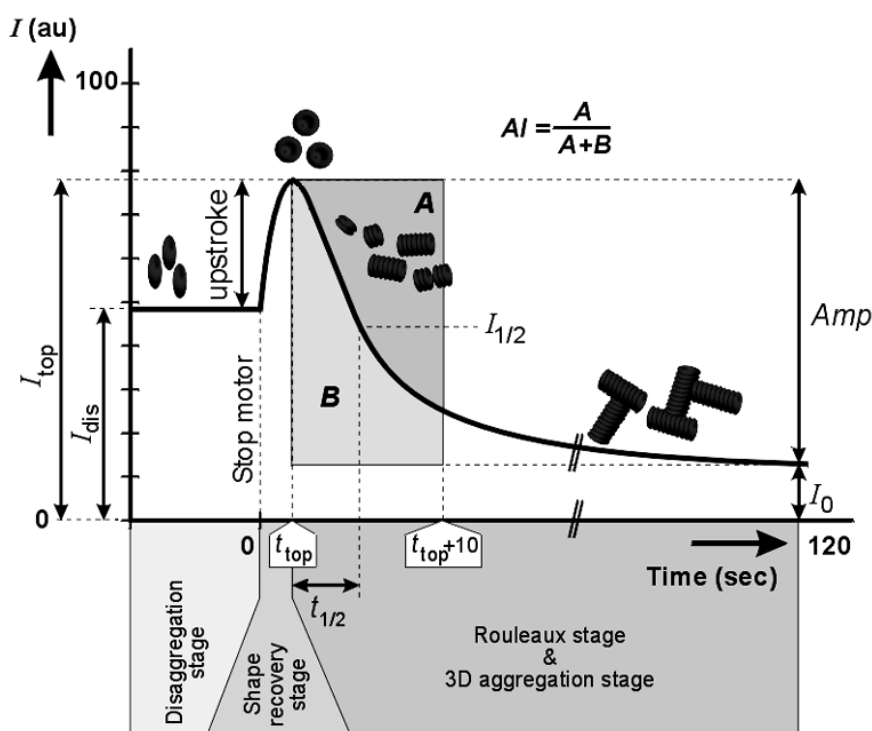


Figure 27 : Le syllectogramme distingue 4 phases (129) : 1) la désagrégation érythrocytaire, 2) la phase de restauration de la forme de repos des globules rouges 3) la formation de rouleaux 4) la formation d'agrégats en 3 dimensions.

I : intensité de la lumière réfléchie ; I_{top} : intensité maximale de lumière réfléchie ; I_{dis} : intensité de la lumière réfléchie durant la désagrégation érythrocytaire.

Au : unités arbitraires

Le syllectogramme est la variation de la quantité de lumière réfléchie par le sang en fonction du temps. Plus l'intensité de la lumière réfléchie diminue rapidement plus l'agrégation érythrocytaire est rapide.

L'appareil mesure la vitesse d'agrégation à l'aide de plusieurs indices : l'indice d'agrégation (AI), le temps nécessaire à la formation de rouleaux (Tf), le temps nécessaire à la formation de rouleaux en 3 dimensions (Ts) et la quantité totale

d'agrégats formés en 120 s (AMP). Dans notre étude, nous avons tenu compte uniquement de l'AI, selon la relation :

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

A : aire au-dessus de la courbe (syllectogramme) entre le moment où l'intensité de la lumière réfléchie est maximale (isc_{top}) et 10 secondes après ce moment ($isc_{top}+10$)

B : aire sous la courbe durant la même période que A et tenant compte de l'amplitude ($Amp = isc_{top} - isc_0$) de la diminution de la lumière réfléchie après une période de 120 secondes.

AI est exprimée en % et représente donc le pourcentage d'agrégats formés en 120 secondes (AMP).

Si AI est très sensible à la lumière, il est le paramètre le moins sensible aux conditions de stockage du sang et au niveau d'oxygénation de l'hémoglobine (129).

2.3. Analyses statistiques

Pour les deux études, les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad prism 6.

Concernant l'étude 1, la comparaison des données hématologiques et hémorhéologiques entre les différents groupes étudiés a été réalisée en utilisant un test t de student avec un seuil de significativité $p < 0,05$.

Un test de χ^2 a été utilisé afin de comparer la fréquence des complications physiques générales avec également $p < 0,05$.

Pour l'étude 2, les trois groupes, SS, SC et AA ont été comparés en utilisant une analyse de variance à une voie (et le test post-hoc de Tukey) ou le test de Kruskal-Wallis (et le test post-hoc de Dunn). Le seuil de significativité était $p < 0,05$.

2.4. RESULTATS

2.4.1. Etude 1

L'objectif de notre étude était d'étudier la prévalence de la rétinopathie et de la maculopathie drépanocytaires et de tester l'association entre ces deux complications. De plus, nous avons recherché un éventuel lien entre les profils hématologiques, hémorhéologiques, le génotype et la survenue des deux affections.

70 patients drépanocytaires ont ainsi été recrutés : 37 SS et 33 SC. Tous ces patients ont bénéficié d'un examen ophtalmologique complet avec fond d'œil et tomographie en cohérence optique. Des échantillons de sang ont été prélevés afin de mesurer les paramètres hématologiques et hémorhéologiques.

26 patients présentaient une maculopathie et 30 avaient une rétinopathie sans différence significative entre SS et SC. Nous n'avons pas observé d'association entre rétinopathie et maculopathie. Les patients SS présentaient une agrégation érythrocytaire plus élevée mais une déformabilité érythrocytaire moindre à 3 Pa par rapport aux SC. La viscosité sanguine et l'hématocrite étaient plus élevés chez les SC et chez les SS que chez les AA. Cependant, nous n'avons mis en évidence aucun lien entre les paramètres biologiques et les complications oculaires de la drépanocytose. Ainsi, notre étude a bien confirmé que la rétinopathie et la maculopathie étaient deux complications fréquentes mais indépendantes de la drépanocytose. Cependant, nous n'avons retrouvé aucune association avec les paramètres hématologiques, hémorhéologiques ou le génotype. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre la physiopathologie des complications oculaires dans la drépanocytose.

Proliferative retinopathy and maculopathy are two independent conditions in sickle cell disease: Is there a role of blood rheology?¹

Laurence Beral^{a,b}, Nathalie Lemonne^c, Marc Romana^{b,d}, Keyne Charlot^{b,d,e},
Marie Billaud^f, Malik Acomat^g, Coralie Zorobabel^g, Elie Nader^{d,f},
Maryse Etienne-Julan^f, Thierry David^g and Philippe Connes^{b,d,f,g,h}

^aService d'ophtalmologie, CHU de Pointe-à-Pitre/Abymes, route de Chauvel, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^bUniversité des Antilles, CHU de Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, Université Sorbonne Paris Cité, Université Paris Diderot, Inserm, INTS, Unité Biologie Intégrée du Globule Rouge UMR_S1134, Paris, France

^cUnité transversale de la Drépanocytose, CHU de Pointe-à-Pitre/Abymes, route de Chauvel, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

^dLaboratoire d'Excellence GR-Ex «The Red Cell: From Genesis to Death», PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^eUnité Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, France

^fLaboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM), EA7424, Equipe Biologie Vasculaire et du Globule Rouge, Université Claude Bernard Lyon 1, COMUE Lyon, Villeurbanne, France

^gInstitut Universitaire de France, Paris, France

Abstract

OBJECTIVE: Our study investigated the prevalence of retinopathy and maculopathy in sickle cell patients and tested the association between these two conditions. In addition, we tested whether hematological and hemorheological parameters, as well as genotype, were involved in the development of these two conditions.

METHODS: Seventy sickle cell adult patients were recruited: 37 with sickle cell anemia (SCA) and 33 with sickle cell hemoglobin C disease (SCC). All patients underwent retinal examination and macular ocular coherence tomography. Blood was sampled for the measurements of hematological and hemorheological parameters.

RESULTS: Twenty-six patients had maculopathy and 30 had retinopathy with no significant difference between SCA and SCC patients. No association between the presence of retinopathy and maculopathy was detected. RBC aggregation was higher and RBC deformability lower at 3 Pa in SCA patients. Blood viscosity and hematocrit were higher in SCC than in SCA patients. However, no association was found between biological parameters and the ocular complications studied.

CONCLUSIONS: Our study showed that retinopathy and maculopathy are common in sickle cell disease. Nevertheless, we found no association with hematological parameters, blood rheology or genotype.

Keywords: Hematology, hemorheology, maculopathy, retinopathy, sickle cell disease

¹No author has proprietary interest.

*Corresponding author: Philippe Connes, E-mail: pconnes@yahoo.fr and philippe.connes@univ-lyon1.fr.

1. Introduction

Retinopathy is a common complication of sickle cell disease (SCD) [1]. The National Institute of Health (NIH) recommends that all patients with SCD should have regular dilated funduscopy by an ophthalmologist with expertise in retinal diseases [2]. As a matter of fact, fundus examination may reveal microcirculatory alterations. Retinopathy is more frequently encountered in patients with sickle cell-hemoglobin C disease (SCC) than in patients with sickle cell anemia (SCA) [3]. The greater whole blood viscosity usually reported in SCC patients in comparison with SCA patients has been hypothesized to increase the risk of SCC patients to develop retinopathy [4, 5]. In addition, Serjeant et al. reported higher whole blood viscosity in SCA males with retinopathy than in SCA males without retinopathy [6]. It has also been reported that high hemoglobin concentration and low fetal hemoglobin level could increase the risk of SCA patients to develop retinopathy [7–9]. In SCC females, high mean cell volume and low fetal hemoglobin have been reported to be associated with retinopathy [7, 10].

In contrast, maculopathy has been poorly investigated in SCD but recent studies indicate that this complication could be frequent in this disease [11–13]. Han et al. reported 43 % of macular thinning among their SCD population and Mathew et al. found 44% of 107 SCD patients having maculopathy [12, 14]. In most of these studies, maculopathy in SCD was detected using a cross-sectional spectral domain tomography (SD-OCT) as a thinning of the temporal macula, with selective loss of the retinal ganglion cell and nerve fiber layer. The thinning may reflect chronic ischemia of the retinal ganglion cells and nerve fibers coursing temporally as they head towards the optic nerve [13]. However, the mechanisms at the origin of maculopathy in SCD have not been investigated until now. Because maculopathy is suggested to result from ischemic events [13] and because blood rheology is severely impaired in SCD [15], the aim of the present study was to compare hematological and hemorheological parameters between SCD (SCA and SCC) patients with maculopathy and those without [16]. In addition, we analyzed the association between maculopathy and retinopathy in SCA and SCC patients.

2. Methods

Seventy adult patients with SCD (37 SCA and 33 SCC) regularly followed by the sickle cell unit of the academic hospital of Pointe-à-Pitre (Guadeloupe, French West Indies) were included between January 2014 and December 2016. All patients were at steady state at the time of the study (i.e. without vaso-occlusive crisis, acute medical complication or blood transfusion/phlebotomies within the last 3 months). Any condition causing a peripheral proliferative retinopathy (i.e., diabetes, central retinal vein or artery occlusion) was exclusion criteria. Twenty-two SCA (59,4%) patients were treated by hydroxyurea while none of the SCC patients received this therapy. The information related to their medical history (vaso-occlusive crisis, acute chest syndrome, hypertension, leg ulcers, nephropathy, osteonecrosis) were collected over the year preceding the inclusion. Blood was sampled in EDTA tubes for hematological and hemorheological measurements. This study received the ethical approval of the Regional Ethics Committee (CPP Sud-Ouest Outre-Mer III, Bordeaux, France). The experiments were performed in accordance with the guidelines set by the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from the subjects after explanation of the nature of the study.

2.1. Ophthalmic measurements

Two independent ophthalmologists performed indirect ophthalmoscopy with a non-contact slit lamp lens (Super-Field, Volk Optical, Mentor, OH, USA). SD-OCT data were acquired using a Copernicus SD-OCT (Copernicus, Optopol Technologies, Zawierci, Poland). No patient needed fluorescein

angiography for further investigation. The patients were classified according to their genotype (SCA or SCC) and according to the presence/absence of retinopathy or maculopathy.

2.2. Hematological and hemorheological measurements

Hemorheological measurements were performed immediately after blood sampling to avoid any red blood cell alterations and were conducted in agreement with the most recent International recommendations for blood rheological analyses [16]. We measured whole blood viscosity with a cone-plate viscometer (Brookfield DVII + with CPE40 spindle) at 25°C and two shear rates: 90 and 225 s⁻¹. The ability of red blood cell (RBC) to deform under flow (i.e., RBC deformability) was studied by laser diffraction analysis (Ektacytometry, LORCA, RR Mechatronics, Hoom, The Netherlands) at 37°C and at two shear stresses: 3 Pa and 30 Pa. The system calculates an average RBC elongation index (EI). The higher this index, the more deformable the red blood cells (RBC). After adjustment of hematocrit to 40%, the LORCA (RR Mechatronics, Hoom, The Netherlands) was used to determine RBC aggregation properties at 37°C. The system uses sylectometry (i.e., laser backscatter versus time) to calculate an index of RBC aggregation index (AI). The RBC disaggregation threshold – i.e. the minimal shear rate needed to breakdown RBC aggregates – was determined using a re-iteration procedure. Hematocrit (Hct) was determined by blood microcentrifugation (Jouan-Hema-C, Saint Herblain, France). Total counts of white blood cells (WBC), platelets and RBCs, mean corpuscular volume (MCV), hemoglobin concentration (Hb) were determined using a hematology analyzer (Max M-Retic, Coulter, USA). An automatic analyser (Hitachi 912, Roche Ltd.) photometrically measured Lactate dehydrogenase (LDH). A solid phase sandwich immunoassay (Phase Range canine C-Reactive Protein Assay, Tridelita Ltd.) was used for quantitative analysis of CRP. Polymerase Chain Reaction (GAP-PCR) was used to detect six common α -thalassemia deletions [17, 18].

2.3. Statistical analysis

Hematological and hemorheological parameters were studied in the whole SCD group (SCA + SCC patients) and separately in SCA and SCC patients. We tested the associations between the occurrence of retinopathy and maculopathy as well as with α -thalassemia, hydroxyurea therapy and the different complications collected in the medical files, using a χ^2 test. Hematological and hemorheological parameters were compared between patients with or without retinopathy or maculopathy in SCA and SCC groups using an unpaired student *t* test. Significance level was set at $p < 0.05$. Analyses were conducted using GraphPad Prism (version 6.0 c).

3. Results

Of the 70 SCD patients included, 26 (37.1%) had maculopathy and 30 (42.9%) had retinopathy with no significant difference between SCA and SCC patients (Table 1). Nine SCA (26.5%) and 2 SCC (6.9%) patients had both maculopathy and retinopathy. In the whole cohort, 15 patients showed maculopathy without retinopathy and 17 had retinopathy without maculopathy. In SCA patients, 9 had retinopathy alone and 7 had maculopathy alone. In SCC patients, 8 had retinopathy alone and 8 had maculopathy alone. No association between the presence of retinopathy and maculopathy was detected.

AI was higher and RBC deformability lower at 3 Pa in SCA compared to SCC patients. Blood viscosity was higher in SCC patients than in SCA. MCV and LDH were higher and hemoglobin, RBC count and hematocrit lower in SCA than in SCC patients. WBC, platelet count and CRP were

Table 1
Comparison of general characteristics, hematological and hemorheological parameters between SCA and SCC patients

	SCA (n = 37)	SCC (n = 33)
Retinopathy (%)	51.3	34.4
Maculopathy (%)	47.1	34.5
Age (years)	40.3 ± 13.4	40.3 ± 2.3
Gender (M/F)	17/20	11/22
HbF (%)	9.3 ± 1.1	1.5 ± 0.2**
Hydroxyurea (%)	59.4	—
α-thalassemia (%)	45.9	27.3
WBC (10 ⁹ /L)	8.05 ± 0.4	7.51 ± 0.51
RCBs (10 ¹² /L)	2.7 ± 0.1	4.3 ± 0.1**
Hb (g/100 ml)	8.3 ± 0.2	10.7 ± 0.2**
MCV (fl)	90.6 ± 1.9	72.9 ± 1.4**
Platelets count (10 ⁹ /L)	320 ± 17.5	330.4 ± 30.8
Lactate dehydrogenase (U/L)	508 ± 22	265 ± 13**
CRP (mg/L)	12.1 ± 2.9	9.9 ± 2.4
Hct (%)	24.5 ± 0.7	30.8 ± 0.6**
Blood viscosity (cP) at 90 s ⁻¹	5.6 ± 0.3	7.3 ± 0.5*
Blood viscosity (cP) at 225 s ⁻¹	4.9 ± 0.3	5.6 ± 0.3*
AI (%)	59 ± 3	48 ± 3*
γ (s ⁻¹)	382 ± 44	315 ± 39
RBC deformability (a.u.) at 3 Pa	0.18 ± 0.01	0.23 ± 0.01*
RBC deformability (a.u.) at 30 Pa	0.44 ± 0.08	0.41 ± 0.01

WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; PLT: platelet count; Hb: hemoglobin concentration; Hct: hematocrit; MCV: mean cell volume; CRP: C-reactive protein; LDH: lactate dehydrogenase; AI: red blood cell aggregation index; γ: red blood cell disaggregation threshold. Statistical difference between the two groups: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

not statistically different between the two SCD patient groups. SCA patients showed a higher rate of hemoglobin F than SCC patients. Age, alpha-thalassemia frequency and gender did not differ between SCA and SCC patients (Table 1). Frequencies of each medical complication in SCA and SCC groups are displayed in Table 2. We observed that only the frequency of leg ulcers was significantly higher in SCA than in SCC patients.

No link was found between maculopathy and retinopathy and the complications studied. Alpha-thalassemia frequency was not different between those with ocular complications and those without (Tables 3 and 4). We found no association between hydroxyurea treatment and maculopathy or retinopathy (Table 3).

We then compared the different hematological and hemorheological parameters between SCA or SCC patients with or without maculopathy/retinopathy. The values are reported in the Tables 3 to 6 and no difference was found in any of the biological parameters investigated.

4. Discussion

Retinopathy is usually reported to be more frequent in SCC than in SCA patients [3, 19]. The high blood viscosity usually reported in SCC patients in comparison with SCA patients has been

Table 2
Comparison of the clinical complications frequencies between SCA and SCC patients (%)

	SCA (n = 37)	SCC (n = 33)
Maculopathy (%)	47	34
Retinopathy (%)	51	34
Leg ulcers (%)	21	3*
Osteonecrosis (%)	32	23
Nephropathy (%)	49	27
Acute chest syndrome (%)	13	3
Viso-occlusive crisis (%)	43	27

Statistical difference between the two groups: * $p < 0.05$.

Table 3
Comparison of general characteristics, hematological and hemorheological parameters between SCA patients with maculopathy and SCA patients without maculopathy

	SCA with maculopathy	SCA without maculopathy
Age	41.57 ± 2.04	40.33 ± 2.04
Gender (M/F)	6/9	10/8
HbF (%)	9.50 ± 1.14	9.48 ± 1.12
Hydroxyurea (%)	68.75	61.11
α -thalassemia (%)	37	44
WBC ($10^9/L$)	7.9 ± 0.5	8.02 ± 0.49
RBCs ($10^{12}/L$)	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1
Hb (g/100 ml)	8.6 ± 0.3	8.2 ± 0.3
MCV (fl)	91.28 ± 1.95	91.05 ± 1.90
Platelets count ($10^9/L$)	317.1 ± 18.4	324.1 ± 17.6
Lactate dehydrogenase (U/l)	498 ± 22	502 ± 22
Hct (%)	24.94 ± 1.02	24.16 ± 0.97
Blood viscosity (cP) at 90 s ⁻¹	5.6 ± 0.4	5.8 ± 0.3
Blood viscosity (cP) at 225 s ⁻¹	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.2
AI (%)	57 ± 3	57 ± 3
γ (s ⁻¹)	366 ± 43	359 ± 45
RBC deformability (a.u.) at 3 Pa	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01
RBC deformability (a.u.) at 30 Pa	0.44 ± 0.02	0.45 ± 0.02

WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; PLT: platelet count; Hb: hemoglobin concentration; Hct: hematocrit; MCV: mean cell volume; LDH: lactate dehydrogenase; AI: red blood cell aggregation index; γ : red blood cell disaggregation threshold.

hypothesized to be involved in the increased risk of SCC patients to develop retinopathy [20]. In our study, SCC patients had higher blood viscosity than SCA. Despite this difference, the frequency of retinopathy was identical between SCC and SCA patients. Moreover, it has been demonstrated that high hemoglobin concentration and low fetal hemoglobin level could increase the risks of SCA patients to develop sickle retinopathy [7, 10]. In our study, SCA patients showed a higher rate of fetal hemoglobin than SCC patients but we found no association between hematological or hemorheological parameters and maculopathy or retinopathy. Increased blood viscosity has been suspected to increase the risk for severe proliferative sickle retinopathy (PSR), notably in SCC patients [5]. However, we found no

Table 4
Comparison of general characteristics, hematological and hemorheological parameters between SCC patients with maculopathy and SCC patients without maculopathy

	SCC with maculopathy	SCC without maculopathy
Age	41.7 ± 2.4	40.1 ± 2.5
Gender (M/F)	4/6	7/13
HbF (%)	1.63 ± 0.26	1.55 ± 0.25
α-thalassemia (%)	37	46
WBC (10 ⁹ /L)	7.4 ± 0.5	7.3 ± 0.5
RBCs (10 ¹² /L)	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.1
Hb (g/100 ml)	10.6 ± 0.4	10.7 ± 0.3
MCV (fl)	73.1 ± 2.5	72.8 ± 1.7
Platelets count (10 ⁹ /L)	329.3 ± 29.2	323.1 ± 31.9
Lactate dehydrogenase (U/L)	264 ± 12	264 ± 14
Hct (%)	30.7 ± 1.1	30.8 ± 0.7
Blood viscosity (cP) at 90 s ⁻¹	6.8 ± 0.3	7.4 ± 0.5
Blood viscosity (cP) at 225 s ⁻¹	5.4 ± 0.3	5.5 ± 0.3
AI (%)	49 ± 3	48 ± 3
γ (s ⁻¹)	330 ± 44	316 ± 41
RBC deformability (a.u.) at 3 Pa	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01
RBC deformability (a.u.) at 30 Pa	0.41 ± 0.02	0.42 ± 0.02

WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; PLT: platelet count; Hb: hemoglobin concentration; Hct: hematocrit; MCV: mean cell volume; LDH: lactate dehydrogenase; AI: red blood cell aggregation index; γ: red blood cell disaggregation threshold.

Table 5
Comparison of general characteristics, hematological and hemorheological parameters between SCA patients with retinopathy and SCA patients without retinopathy

	SCA with retinopathy	SCA without retinopathy
Age	41.12 ± 2.11	40.33 ± 2.04
Gender (M/F)	8/11	9/9
HbF (%)	9.5 ± 1.1	9.5 ± 1.1
Hydroxyurea (%)	68.4	47.1
α-thalassemia (%)	41	60
WBC (10 ⁹ /L)	7.92 ± 0.49	8.02 ± 0.49
RBCs (10 ¹² /L)	2.8 ± 0.2	2.7 ± 0.1
Hb (g/100 ml)	8.3 ± 0.3	8.4 ± 0.3
MCV (fl)	91.28 ± 1.95	91.05 ± 1.90
Platelets count (10 ⁹ /L)	317.1 ± 18.4	324.1 ± 17.6
Lactate dehydrogenase (U/L)	498 ± 21	502 ± 22
Hct (%)	24.5 ± 1.1	24.5 ± 0.9
Blood viscosity (cP) at 90 s ⁻¹	5.7 ± 0.3	5.6 ± 0.4
Blood viscosity (cP) at 225 s ⁻¹	4.9 ± 0.2	4.8 ± 0.3
AI (%)	57 ± 2.5	58 ± 3
γ (s ⁻¹)	366 ± 43	383 ± 46
RBC deformability (a.u.) at 3 Pa	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01
RBC deformability (a.u.) at 30 Pa	0.44 ± 0.02	0.44 ± 0.02

WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; PLT: platelet count; Hb: hemoglobin concentration; Hct: hematocrit; MCV: mean cell volume; LDH: lactate dehydrogenase; AI: red blood cell aggregation index; γ: red blood cell disaggregation threshold.

Table 6
Comparison of general characteristics, hematological and hemorheological parameters between
SCC patients with retinopathy and SCC patients without retinopathy

	SCC with retinopathy	SCC without retinopathy
Age	41.4 ± 2.3	40.3 ± 2.3
Gender (M/F)	4/7	7/14
HBF (%)	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2
Hydroxyurea (%)	0	0
α -thalassaemia (%)	27	28
WBC ($10^9/L$)	7.4 ± 0.5	7.5 ± 0.5
RBCs ($10^{12}/L$)	4.5 ± 0.2	4.1 ± 0.1
Hb (g/100 ml)	11.1 ± 0.3	10.5 ± 0.3
MCV (fl)	72.8 ± 1.4	72.3 ± 1.4
Platelets count ($10^9/L$)	311.7 ± 29.2	330.4 ± 30.8
Lactate dehydrogenase (U/L)	256 ± 19	265 ± 13
Hct (%)	31.9 ± 0.8	30.2 ± 0.8
Blood viscosity (cP) at 90 s ⁻¹	6.9 ± 0.3	7.3 ± 0.5
Blood viscosity (cP) at 225 s ⁻¹	5.4 ± 0.3	5.7 ± 0.5
AI (%)	47 ± 3	48 ± 3
γ (s ⁻¹)	298 ± 40	316 ± 41
RBC deformability (a.u.) at 3 Pa	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01
RBC deformability (a.u.) at 30 Pa	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.01

WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; PLT: platelet count; Hb: hemoglobin concentration; Hct: hematocrit; MCV: mean cell volume; LDH: lactate dehydrogenase; AI: red blood cell aggregation index; γ : red blood cell disaggregation threshold.

difference in blood viscosity between patients with retinopathy and those without. Further studies in larger cohort are needed to understand the discrepancies between these different studies.

Our study found no association between sickle cell maculopathy and sickle cell genotype. While our SCA and SCC patients are very different regarding hematological and hemorheological parameters, the lack of genotype effect suggests that these biological factors could not play a key role in the development of maculopathy. Nevertheless, the pathophysiological mechanisms involved in retinopathy and maculopathy could be different and remain incompletely understood. It has been suspected that prolonged episodes of ischemia could play a role in the development of ocular complications [3]. Using ocular coherence tomography angiography (OCT-A), several authors reported reduced flow within the superficial and deep macular plexuses [21, 22]. In our study, only 11 patients had both retinopathy and maculopathy. Spontaneous regression by auto-infarction of neovascular complexes is well described in sickle cell retinopathy and occurs most of the time two years after development of proliferative lesions [8]. Indeed, the absence of retinopathy does not mean that the patient did not experience this complication few years ago. In contrast, maculopathy appears in OCT as a persistent macular thinning [21]. Maculopathy and retinopathy may develop simultaneously both resulting from an ischemic origin. Nevertheless, the lack of age difference between patients with maculopathy and those with retinopathy does not suggest a chronological sequence in the appearance of retinopathy and maculopathy.

SCD maculopathy has sometimes been reported to be the consequence of central retina artery occlusion (CRAO) [23]. However, none of our patient had a history of CRAO, although we found 37.1% of asymptomatic maculopathy. The thinning may reflect the chronic ischemia of the retinal ganglion cells and nerve fibers coursing temporally as they head toward the optic nerve [13]. Impaired

blood rheology in SCD plays an important role in the development of several complications, notably because of the resulting decrease in blood flow and tissue oxygenation [15]. Recently, Hussain et al. suggested a paracentral acute maculopathy as a precursor of macular thinning in SCD [24]. We found no association between hemorheological or hematological parameters and SCD maculopathy. Indeed, at that time, it is difficult to decipher the exact mechanisms at the origin of maculopathy in SCD. Although never studied, we could suspect a role of inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction in the development of this complication, as it is the case in diabetes [25].

Our study showed that retinopathy and maculopathy are common in SCD. Nevertheless, we found no association with hematological parameters, blood rheology or genotype.

References

- [1] Kim SY, Mocanu C, McLeod DS, Bhutto IA, Merges C, Eid M, et al. Expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroid. *Exp Eye Res.* 2003;77(4):433-45.
- [2] National Heart and Blood Institute Division of Blood Diseases and Resources. The management of sickle cell disease (fourth Edition, June 2002. *Manag Sick cell Dis (Fourth Ed June 2002).* 2002;95-7.
- [3] Elagouz M, Jyothi S, Gupta B, Sivaprasad S. Sickle cell disease and the eye: OM and new concepts. *Surv Ophthalmol* 2010;55(4):359-77. 10.1016/j.survophthal.2009.11.004
- [4] Asdourian GK, Nagpal KC, Busse B, Goldbaum M, Patriankos D, Rabib MF, et al. Macular and perimacular vascular remodelling sickling haemoglobinopathies. *Br J Ophthalmol.* 1976;60(6):431-53.
- [5] Lemaire C, Lemaire Y, Lemonne N, Waltz X, Chahed S, Cabot F, et al. Severe proliferative retinopathy is associated with blood hyperviscosity in sickle cell hemoglobin-C disease but not in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2013;55(2):205-12.
- [6] Serjeant BE, Mason KP, Condon PI, Hayes RJ, Kenny MW, Stuart J, et al. Blood rheology and proliferative retinopathy in sickle cell-haemoglobin C disease. *Br J Ophthalmol.* 1984;68(5):325-8.
- [7] Fox PD, Dunn DT, Morris JS, Serjeant GR. Risk factors for proliferative sickle retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 1990;74(3):172-6.
- [8] Goldberg MF. Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1971;71(3):649-65.
- [9] Hayes RJ, Condon PI, Serjeant GR. Haematological factors associated with proliferative retinopathy in sickle cell-haemoglobin C disease. *Br J Ophthalmol.* 1981;65(10):712-7.
- [10] Hayes RJ, Condon PI, Serjeant GR. Haematological factors associated with proliferative retinopathy in homozygous sickle cell disease. *Br J Ophthalmol.* 1981;65(1):29-35.
- [11] Han IC, Tadarat M, Scott AW. Macular Vascular Abnormalities Identified by Optical Coherence Tomographic Angiography in Patients With Sickle Cell Disease. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133(11):1337-40.
- [12] Mathew R, Bafiq R, Ramu J, Pearce E, Richardson M, Drasar E, et al. Spectral domain optical coherence tomography in patients with sickle cell disease. *Br J Ophthalmol.* 2015;99(7):967-72.
- [13] Murthy RK, Grover S, Chalam KV. Temporal Macular Thinning on Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Proliferative Sickle Cell Retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2011;129(2):247.
- [14] Han IC, Tadarat M, Pacheco KD, Scott AW. Evaluation of Macular Vascular Abnormalities Identified by Optical Coherence Tomography Angiography in Sickle Cell Disease. *Am J Ophthalmol.* 2017;177:90-9.
- [15] Connes P, Alexy T, Dettlerich J, Romana M, Hardy-Dessources M-D, Ballas SK. The role of blood rheology in sickle cell disease. *Blood Rev.* 2016;30(2):111-8.
- [16] Baskart OK, Boyard M, Coketel GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;42(2):75-97.
- [17] Tan AS, Quah TC, Low PS, Chong SS. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood.* 2001;98(1):250-1.
- [18] Liu J, Jia X, Tang N, Zhang X, Wu X, Cai R, et al. Novel technique for rapid detection of α -globin gene mutations and deletions. *Transl Res.* 2010;155(3):148-55.
- [19] Goldberg MF. Retinal vaso-occlusion in sickling hemoglobinopathies. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1976;12(3):475-515.
- [20] Chen S-N, Hwang J-F, Chen Y-T. Macular thickness measurements in central retinal artery occlusion by optical coherence tomography. *Retina.* 2011;31(4):730-7.

- [21] Santilippo CJ, Klufas MA, Samaf D, Tsui I. Optical coherence tomography angiography of sickle cell maculopathy. *Retin Cases Brief Rep.* 2015;9(4):360-2.
- [22] Jung JJ, Chen MH, Frambach CR, Rotigba S, Lee SS. Spectral domain versus swept source optical coherence tomography angiography of the retinal capillary plexuses in sickle cell maculopathy. *Retin Cases Brief Rep.* 2016;1.
- [23] Fine, Petrovic, Irvine, Bhisiikul. Correction-spontaneous central retinal artery occlusion in hemoglobin SC disease(1). *Am J Ophthalmol.* 2000;130(6):906-7.
- [24] Hussain SA, Coady PA, Stoessel KM. Para-central acute middle maculopathy: Precursor to macular thinning in sickle cell retinopathy. *BMJ Case Rep.* 2017;2017:bcr-2016-216124.
- [25] Madsen-Boulerse SA, Kowluru RA. Oxidative stress and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008;9(4):315-27.

2.4.2. Etude 2 (à soumettre)

L'objectif de cette étude était de mieux caractériser la maculopathie drépanocytaire en décrivant les résultats de l'électrorétinogramme multifocal chez les patients drépanocytaires sans signe clinique de maculopathie, en fonction du génotype.

Les patients drépanocytaires SS et SC et les sujets contrôles AA ont tous bénéficié d'un examen ophtalmologique complet avec fond d'œil, d'une tomographie en cohérence optique spectral domain (SD-OCT) et d'un électrorétinogramme multifocal (mfERG).

86 patients ont été inclus : 54 drépanocytaires (107 yeux) dont 32 SS (63 yeux) et 22 SC (44 yeux) et 32 sujets contrôles (64 yeux). Le fond d'œil était normal chez tous les patients. L'analyse en SD-OCT a retrouvé une épaisseur maculaire statistiquement inférieure chez les patients drépanocytaires par rapport à celle retrouvée chez les sujets contrôles. L'analyse en mfERG a montré une réduction significative des amplitudes de N1 (déflexion négative initiale), P1 (pic positif) et de N2 (deuxième déflexion négative) chez les sujets drépanocytaires SS par rapports aux individus AA du centre ($<2^\circ$) à la périphérie ($>15^\circ$). Le temps implicite était également réduit au centre ($<2^\circ$). Les amplitudes de N1 et P1 des drépanocytaires SC étaient également réduites du centre ($<2^\circ$) à la périphérie ($>15^\circ$) par rapport à celles des AA. Les temps implicites de N1 étaient significativement réduits chez les SC par rapport aux SS.

Ainsi, notre étude est la première à mettre en évidence des altérations maculaires électrophysiologiques chez les patients drépanocytaires paraissant exempt de toute maculopathie à l'examen clinique. Par ailleurs, nous confirmons que la maculopathie drépanocytaire est aussi fréquente chez les SS que chez les SC.

Title: MULTIFOCAL ELECTRORETINOGRAM FINDINGS IN SICKLE CELL MACULOPATHY.

Laurence Beral^{1,2}, Marc Romana^{2,4}, Nathalie Lemonne³, Yoann Garnier^{2,4}, Marie Billaud³, Malik Acomat¹, Coralie Zorobabel¹, Maryse Etienne-Julan³, Thierry David^{1,8} and Philippe Connes^{2,4,6,7}

1 Service d'ophtalmologie, CHU de Pointe-à-Pitre/ Abymes, route de Chauvel, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

2 UMR Inserm 1134, Biologie Intégrée du Globule Rouge, INSERM/Université Paris Diderot - Université Sorbonne Paris Cité/INTS/Université des Antilles

3 Unité transversale de la Drépanocytose, CHU de Pointe-à-Pitre/ Abymes, route de Chauvel, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

4 Laboratoire d'Excellence GR-Ex « The red cell : from genesis to death », PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France

5 Unité Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge, France

6 Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM), EA7424, Equipe Biologie Vasculaire et du Globule Rouge, Université Claude Bernard Lyon 1, COMUE Lyon, Villeurbanne, France

7 Institut Universitaire de France, Paris, France

8 Université des Antilles, Guadeloupe (FWI), France

Corresponding author: Philippe Connes (pconnes@yahoo.fr / philippe.connes@univ-lyon1.fr)

No author has proprietary interest.

ABSTRACT BACKGROUND: The aim of the present work was to describe and compare multifocal electroretinogram findings (mfERG) in patients with sickle cell disease (SCD) without clinical sign of maculopathy according to the hemoglobin genotype. **METHODS:** HbSS (homozygous SCD), HbSC (Hemoglobin SC disease) and HbAA (controls) individuals underwent a full ophthalmologic examination (with a fundoscopy), a spectral domain ocular coherence tomography (SD-OCT) and a mfERG. **RESULTS:** A total of 86 subjects were included: 54 SCD patients (107 eyes) with 32 HbSS (63 eyes) and 22 HbSC (44 eyes) and 32 controls (64 eyes). None of the eyes showed retinal clinical abnormalities. SD-OCT analysis showed that macular thickness was statistically lower in SCD eyes than in controls. mfERG analysis demonstrated a significant reduction of N1 (initial negative deflection), P1 (positive peak) and N2 (second negative deflection) response amplitude densities of HbSS eyes compared to HbAA eyes from the center ($<2^\circ$) to the periphery ($>15^\circ$). Implicit time response was also reduced in the center ($<2^\circ$). N1 and P1 response amplitude densities of HbSC eyes were significantly lower than those of HbAA eyes from the center ($<2^\circ$) to the periphery ($>15^\circ$). N2 response amplitude densities were also significantly reduced in the center ($<2^\circ$) and in the periphery ($>10^\circ$). N1 implicit time was statistically reduced in HbSC compared to HbSS eyes. **CONCLUSION:** Our study is the first one to describe macular electrophysiological dysfunction in SCD patients. Moreover, we confirm that SCD maculopathy is equally frequent in HbSS and HbSC genotypes.

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is an autosomal recessive disease caused by a single mutation of the β -globin gene leading to the production of an abnormal hemoglobin, named hemoglobin S (HbS). While HbS results from the substitution of glutamic acid by valine at the sixth codon of the β -globin gene, hemoglobin C (HbC) is caused by the substitution of glutamic acid by lysine at the same position of the β -globin gene (Ware, de Montalembert, Tshilolo, & Abboud, 2017). Upon deoxygenation, HbS polymerizes leading to red blood cell (RBC) sickling. These sickled RBCs are more fragile and rigid than healthy RBCs. Indeed, patients with homozygous SCD (HbSS genotype) are anemic, exhibit hemorheological abnormalities and may experience frequent vaso-occlusive events (Connes et al.,

2018). In SCD patients with both HbS and HbC (HbSC genotype), HbC may form crystal upon oxygenation and promote RBC dehydration, increasing the ability of HbS to form polymers under deoxygenated condition (Brittenham, Schechter, & Noguchi, 1985; Bunn, 1997). HbSC patients are less anemic than HbSS patients but are also characterized by impaired RBC rheology (Nagel, Fabry, & Steinberg, 2003; Renoux et al., 2016). In addition, these sickled RBCs have increased adhesiveness to the vascular wall, leading to a broad range of acute and chronic clinical complications affecting various organs, including the eyes (Ballas, 2018). For instance, both retinopathy and maculopathy have been reported in HbSS and HbSC patients (Beral et al., 2018; Lu et al., 1999). It has been established that HbSC patients would be at higher risk to develop retinopathy than HbSS individuals (Elagouz, Jyothi, Gupta, & Sivaprasad, 2010a ; Lemaire et al., 2013). While extensive literature is available on sickle retinopathy, very few studies focused on maculopathy.

Recent spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) findings suggest retinal thinning of the temporal zone of the macula in SCD patients. On the OCT angiography (OCTA), this thinning corresponds to microvascular abnormalities with loss of vascular density in the superficial and deep macular vascular plexuses (Do & Rodger, 2017 ; Ghasemi Falavarjani et al., 2016 ; Han, Tadarati, Pacheco, & Scott, 2017 ; Mathew et al., 2015). In most of these reports, SCD maculopathy was asymptomatic, suggesting that OCT can display macular atrophy without any decrease in visual acuity (Lee et al., 1987; Leveziel et al., 2005). The etiology of asymptomatic macular thinning without apparent perfusion reduction remains unclear. Parafoveal acute middle maculopathy has been described in SCD patients (Hussnain, Coady, & Stoessel, 2017; Ilginis, Keane, & Tufail, 2015). In addition, it has been shown that even when the macula appears to be normal on clinical examination, angiography can reveal microvascular abnormalities (Minvielle et al., 2016). Therefore, in absence of clinical macular abnormalities, we could suspect electrophysiological dysfunction.

To our knowledge, no study has been performed using multifocal electroretinogram (mfERG) to explore the electrophysiological macular function in SCD. We therefore investigated and compared inner macular function in asymptomatic HbSS and HbSC patients and AA subjects.

PATIENTS AND METHODS

Study design This prospective monocentric study was performed in the ophthalmology department of the Pointe-à-Pitre university Hospital of Guadeloupe (FWI) between February 2014 and April 2018. All SCD patients were referred to the department for their annual funduscopy by the sickle cell unit of the academic hospital of Guadeloupe. We included 54 SCD patients (107 eyes): 32 HbSS (63 eyes), 22 HbSC (44 eyes), and 32 HbAA healthy subjects (64 eyes). All SCD patients were at steady state at the time of the study (i.e. without vaso-occlusive crisis, acute medical complication or blood transfusion/phlebotomies within the last 3 months). Any condition causing a peripheral proliferative retinopathy (i.e., diabetes, central retinal vein or artery occlusion) was exclusion criteria. Blood was sampled in EDTA tubes for hematological measurements. The study was approved by the local ethics committee of the Hospital.

Ophthalmic examinations Best corrected visual acuity (BCVA), slit lamp microscopy and biomicroscopy were performed for all patients by two independent ophthalmologists. They used a non-contact slip lamp lens (super-field, Volk Optical, Mentor, OH, USA). BCVA was measured using the Monoyer scale and vision results were quantified in logMar (Holladay & Msee, 2004).

Spectral Domain Ocular coherence tomography (SD-OCT) SD-OCT data were acquired using a Copernicus SD-OCT (Copernicus, Optopol Technologies, Zawierci, Poland) in 83 SCD eyes (47 HbSS eyes and 36 HbSC eyes). We also examined 52 HbAA eyes.

Multifocal electroretinography (mfERG) Because of the limited availability of the equipment, only 29 SCD patients (38 HbSS and 20 HbSC eyes) also underwent an mfERG test. The ERG is a diagnostic test, which measures the electric signal of neural and non-neural cells in the retina in response to a light stimulus. This light stimulus induces changes in the flux of trans-retinal ions (sodium and potassium in particular), generating an electrical response. MfERG is a non-invasive objective technique that detects functional changes in the central retina. The standard ISCEV mfERG evaluates cone system function over 103 discrete hexagonal retinal areas, within the central 40-50° of the posterior pole centered on the macula (Robson et al., 2018). MfERG values were also measured in 64 controlled eyes using a Metrovision Monpack One mfERG according to the International Society of Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV) guidelines (Donald C. Hood et al., 2012). Full pupil dilation was obtained using 1% tropicamide and 2.5% phenylephrine hydrochloride. The visual

stimulator generated a matrix of 16'217 hexagones that were stimulated with independent sequences of flashes. The global ERG was recorded via a unique electrode. Local responses were obtained by computing the inverse correlation between this global ERG response and the stimulation sequence. The typical mfERG response was a biphasic waveform with an initial negative deflection (N1) followed by a positive peak (P1), and then a second negative deflection (N2) (Donald C. Hood et al., 2012). During the examination, we recorded the local responses in real time with an automated identification of the N1, P1 and N2 peaks for each response. 2D and 3D interpolated maps of the amplitude and implicit time of the N1, P1 and N2 peaks of the local responses were obtained. Topographic (3D) response density plots displayed the overall signal strength per unit of area of retina.

Statistical analysis Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (version 6.0 c). The three groups (HbSS, HbSC and HbAA) were compared using a one-way analysis of variance (and Tukey post-hoc tests) or Kruskal-Wallis tests (and Dunn post-hoc tests). Significance level was defined as $p < 0.05$. Results are displayed as mean $\pm$ SD.

RESULTS.

Among the SCD patients, there were 27 males and 27 females. As expected, Hemoglobin level, red blood cell count (RBC), mean cell volume (MCV) and hematocrit were lower in HbSS than in HbSC patients (Table 1). BVCA of HbSS eyes was statistically lower than that of HbAA eyes (0.04 ± 0.1 log Mar vs 0.0 ± 0.0 log Mar). BVCA of HbSC eyes (0.08 ± 0.4 Log Mar) was not statistically different from HbAA eyes. At slip examination, no patient had retinopathy, nor maculopathy. On the OCT, the mean central macular thickness was lower in HbSS and HbSC eyes than in HbAA eyes (Table 2). Temporal, nasal inner and superior inner were statistically thinner in SCD groups compared to HbAA eyes (Table 2).

Serial changes in mfERG Tables 2 to 4 illustrate the changes in mfERG amplitudes densities and implicit times from the foveola ($< 2^\circ$) to the periphery. There was a significantly reduction of N1, P1 and N2 response amplitude densities of HbSS eyes compared to HbAA eyes from $< 2^\circ$ to $> 15^\circ$. Implicit time response was reduced in the center ($< 2^\circ$). N1 and P1 response amplitude densities of HbSC eyes were significantly lower than those of HbAA eyes from $< 2^\circ$ to $> 15^\circ$. N2 response amplitude densities were also significantly reduced in the center ($< 2^\circ$) and in the periphery ($> 10^\circ$). Responses in

implicit time were not reduced in the center (Tables 3-5). N1 implicit time was statistically reduced in HbSC than in HbSS eyes (table 3). We found no difference between HbSS and HbSC eyes concerning the posterior pole of the retina.

DISCUSSION

Several authors have reported global ERG alterations at the early stages of SCD retinopathy (Bottin et al., 2017; Jung, Chen, Frambach, Rofagha, & Lee, 2016; Peachey et al., 1987). Our study is the first to explore the electrophysiological function of the macula in SCD eyes. It has been previously established that SCD eyes can be affected by maculopathy, which can be demonstrated by OCT (Hoang, Chau, Shahidi, & Lim, 2011; Mathew et al., 2015). However, up to now, no information was available about the electrophysiological function of the macular cells in SCD patients with no ocular anatomical abnormalities or complications.

In the present study, BVCA was significantly reduced in HbSS eyes compared to HbAA eyes but no difference was found between HbSC and HbAA eyes. Macular thickness was lower in both HbSS and HbSC eyes compared to HbAA eyes. Therefore, in contrast to SCD retinopathy which occurs more likely in HbSC eyes, maculopathy seems to be equally frequent in both SCD genotype (Elagouz, Jyothi, Gupta, & Sivaprasad, 2010b ; Fox, Dunn, Morris, & Serjeant, 1990). In addition, our study confirms that SCD maculopathy is mainly localized in the temporal areas of the macula on the OCT as it has already been reported (Sanfilippo, Klufas, Sarraf, & Tsui, 2015).

The mfERG analysis demonstrated a reduction of N1, P1 and N2 in the central areas of HbSS and HbSC eyes when compared to controls, which may reflect a cone system dysfunction. Therefore, macular atrophy demonstrated by the OCT may correspond to electrophysiological dysfunctions. The N1 and P1 mfERG may originate from the outer and the inner retinal layer, respectively (D C Hood, 2000; Donald C. Hood et al., 2012; Donald C Hood, Odel, Chen, & Winn, 2003). Our data suggest that SCD macular dysfunction may be a global disorder as both of these peaks were reduced in SCD eyes. We also detected macular electrophysiological alterations in SCD eyes without any OCT alteration (and indeed loss of BVCA) but larger cohorts are needed to confirm this finding.

It has been reported that even though the macular seems to be normal at funduscopy, angiography may demonstrate microvascular abnormalities. Indeed, parafoveal acute middle maculopathy has

been described in SCD patients (Hussnain et al., 2017; Ilginis et al., 2015). This abnormality is characterized by an hyper-reflective band at the level of the inner nuclear layer on the SD-OCT, which could reflect ischemia in the deep capillary plexuses (Chen et al., 2015; Ilginis et al., 2015).

Nevertheless, Minvielle et al showed that even if the macula appears to be normal on clinical examination, angiography can reveal microvascular abnormalities. OCTA results of the present study demonstrated microvascular changes such as rarified and dilated capillaries, foveal avascular zone enlargement, areas of capillary nonperfusion, disruption of the perifoveal anastomotic capillary arcade in all the patients. Most of the abnormalities were observed in the temporal juxtafoveal area, located in the deep capillary plexus (Minvielle et al., 2016). Therefore, in absence of clinical macular abnormalities, we could suspect that the electrophysiological dysfunction observed would reflect perifoveal microvascular changes. Further OCTA studies are warranted to assess this hypothesis.

CONCLUSION To our knowledge, our study is the first one to describe macular electrophysiological dysfunction in SCD patients. Moreover, we confirm that SCD maculopathy is equally frequent in HbSS and HbSC genotypes.

REFERENCES

- Ballas, S. K. (2018). Sick cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 68(2–3), 105–128. <https://doi.org/10.3233/CH-189002>
- Beral, L., Lemonne, N., Romana, M., Charlot, K., Billaud, M., Acomat, M., ... Connes, P. (2018). Proliferative retinopathy and maculopathy are two independent conditions in sickle cell disease: Is there a role of blood rheology?1. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 1–9. <https://doi.org/10.3233/CH-180412>
- Bottin, C., Racine, J., Robert, M. P., Cohen, S.-Y., Merle, B. M. J., Jung, C., ... Zambrowski, O. (2017). Electroretinogram Findings in Early-Stage Sickle Cell Retinopathy According to Hemoglobin Type. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(7), 3262. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20719>
- Brittenham, G. M., Schechter, A. N., & Noguchi, C. T. (1985). Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. *Blood*, 65(1), 183–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3965046>
- Bunn, H. F. (1997). Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 337(11), 762–769. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709113371107>
- Chen, X., Rahimy, E., Sergott, R. C., Nunes, R. P., Souza, E. C., Choudhry, N., ... Sarraf, D. (2015). Spectrum of Retinal Vascular Diseases Associated With Paracentral Acute Middle Maculopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 160(1), 26–34.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.04.004>
- Connes, P., Renoux, C., Romana, M., Abkarian, M., Joly, P., Martin, C., ... Ballas, S. K. (2018). Blood rheological abnormalities in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 68(2–3), 165–172. <https://doi.org/10.3233/CH-189005>
- Do, B. K., & Rodger, D. C. (2017). Sickle cell disease and the eye. *Current Opinion in Ophthalmology*, 28(6), 623–628. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000423>

Elagouz, M., Jyothi, S., Gupta, B., & Sivaprasad, S. (2010a). Sickle cell disease and the eye: old and new concepts. *Survey of Ophthalmology*, 55(4), 359–77.

<https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2009.11.004>

Elagouz, M., Jyothi, S., Gupta, B., & Sivaprasad, S. (2010b). Sickle cell disease and the eye: old and new concepts. *Survey of Ophthalmology*, 55(4), 359–

77. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2009.11.004>

Fox, P. D., Dunn, D. T., Morris, J. S., & Serjeant, G. R. (1990). Risk factors for proliferative sickle retinopathy. *The British Journal of Ophthalmology*, 74(3), 172–6. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2322516>

Ghasemi Falavarjani, K., Scott, A. W., Wang, K., Han, I. C., Chen, X., Klufas, M., .Tsui, I. (2016). Correlation of multimodal imaging in sickle cell retinopathy. *Retina*, 36, S111–S117.

<https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000001230>

Han, I. C., Tadarati, M., Pacheco, K. D. & Scott, A. W. (2017). Evaluation of Macular Vascular Abnormalities Identified by Optical Coherence Tomography Angiography in Sickle Cell Disease.

American Journal of Ophthalmology, 177, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2017.02.007>

Hoang, Q. V., Chau, F. Y., Shahidi, M., & Lim, J. I. (2011). Central Macular Splaying and Outer Retinal Thinning in Asymptomatic Sickle Cell Patients by Spectral- Domain Optical Coherence Tomography.

American Journal of Ophthalmology, 151(6), 990–994.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2010.12.010>

Holladay, J. T., & Msee. (2004). Visual acuity measurements. *Journal of Cataract & Refractive*

Surgery, 30(2), 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2004.01.014>

Hood, D. C. (2000). Assessing retinal function with the multifocal technique. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(5), 607–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10925245>

Hood, D. C., Bach, M., Brigell, M., Keating, D., Kondo, M., Lyons, J. S., ... International Society For Clinical Electrophysiology of Vision. (2012). ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Documenta Ophthalmologica*, 124(1), 1–13. [https://doi.org/10.1007/s10633-](https://doi.org/10.1007/s10633-011-9296-8)

011- 9296-8

Hood, D. C., Odel, J. G., Chen, C. S., & Winn, B. J. (2003). The multifocal electroretinogram. *Journal of Neuro-Ophthalmology : The Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 23(3), 225–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504596>

Hussnain, S. A., Coady, P. A., & Stoessel, K. M. (2017). Paracentral acute middle maculopathy: precursor to macular thinning in sickle cell retinopathy. *BMJ Case Reports*, 2017, bcr-2016-216124. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-216124>

Ilginis, T., Keane, P. A., & Tufail, A. (2015). Paracentral acute middle maculopathy in sickle cell disease. *JAMA Ophthalmology*, 133(5), 614–6. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.6098>

Jung, J. J., Chen, M. H., Frambach, C. R., Rofagha, S., & Lee, S. S. (2016). Spectral domain versus swept source optical coherence tomography angiography of the retinal capillary plexuses in sickle cell maculopathy. *Retinal Cases & Brief Reports*, 1. <https://doi.org/10.1097/ICB.0000000000000448>

Lee, C. M., Charles, H. C., Smith, R. T., Peachey, N. S., Cunha-Vaz, J. G., & Goldberg, M. F. (1987). Quantification of macular ischaemia in sickle cell retinopathy. *The British Journal of Ophthalmology*, 71(7), 540–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3651368>

Lemaire, C., Lamarre, Y., Lemonne, N., Waltz, X., Chahed, S., Cabot, F., ... Connes, P. (2013). Severe proliferative retinopathy is associated with blood hyperviscosity in sickle cell hemoglobin-C disease but not in sickle cell anemia. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 55(2), 205–12. <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1622>

Leveziel, N., Kirsch, O., Lautier-Frau, M., Driss, F., Offret, H., & Labetoulle, M. (2005). [Recovery of sickle cell disease ischemic maculopathy after erythropheresis: a clinical case study]. *Journal Francais d'ophtalmologie*, 28(6), 642–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141931>

Lu, M., Perez, V. L., Ma, N., Miyamoto, K., Peng, H. B., Liao, J. K., & Adamis, A. P. (1999). VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(8), 1808–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393052>

- Mathew, R., Bafiq, R., Ramu, J., Pearce, E., Richardson, M., Drasar, E., ... Sivaprasad, S. (2015). Spectral domain optical coherence tomography in patients with sickle cell disease. *British Journal of Ophthalmology*, 99(7), 967–972. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2014-305532>
- Minvielle, W., Caillaux, V., Cohen, S. Y., Chasset, F., Zambrowski, O., Miere, A., & Souied, E. H. (2016). Macular Microangiopathy in Sickle Cell Disease Using Optical Coherence Tomography Angiography. *American Journal of Ophthalmology*, 164, 137–44.e1. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.12.023>
- Nagel, R. L., Fabry, M. E., & Steinberg, M. H. (2003). The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews*, 17(3), 167–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818227>
- Peachey, N. S., Charles, H. C., Lee, C. M., Fishman, G. A., Cunha-Vaz, J. G., & Smith, R. T. (1987). Electroretinographic findings in sickle cell retinopathy. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 105(7), 934–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440419>
- Renoux, C., Romana, M., Joly, P., Ferdinand, S., Faes, C., Lemonne, N., ... Connes, P. (2016). Effect of Age on Blood Rheology in Sickle Cell Anaemia and Sickle Cell Haemoglobin C Disease: A Cross-Sectional Study. *PloS One*, 11(6), e0158182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158182>
- Robson, A. G., Nilsson, J., Li, S., Jalali, S., Fulton, A. B., Tormene, A. P., ... Brodie, S. E. (2018). ISCEV guide to visual electrodiagnostic procedures. *Documenta Ophthalmologica*, 136(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10633-017-9621-y>
- Sanfilippo, C. J., Klufas, M. A., Sarraf, D., & Tsui, I. (2015). Optical coherence tomography angiography of sickle cell maculopathy. *Retinal Cases & Brief Reports*, 9(4), 360–2. <https://doi.org/10.1097/ICB.0000000000000210>
- Ware, R. E., de Montalembert, M., Tshilolo, L., & Abboud, M. R. (2017). Sickle cell disease. *The Lancet*, 390(10091), 311–323. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)

TABLES

Table 1: Haematological and haemorheological parameters in our SCD patients.

	HbSS (n=32)	HbSC(n=22)
Age(years)	36.6 ± 2.3	42.9 ± 2.8
WBC (10⁹ /L)	10.84 ± 2.36	14.34 ± 4.87
RCBs (10¹² /L)	2.95 ± 0.15	4.21 ± 0.13**
Hb (g/100ml)	8.42 ± 0.22	10.76 ± 0.20**
MCV (fl)	85.5 ± 3.05	69.5 ± 3.5*
Platelets count (10⁹/L)	337.1 ± 25.1	285.5 ± 41.5
Lactate dehydrogenase (U/l)	511.2 ± 28.1	337.6 ± 29.2*
Hct (%)	24.9 ± 0.7	31.5 ± 0.6**

Statistical Difference between the two groups: *p < 0.05; **p < 0.01.

WBC: white blood cell count; RBC: red blood cell count; PLT: platelet count; Hb: haemoglobin concentration; MCV: mean cell volume; Hb: haemoglobin; LDH: lactate dehydrogenase

Table 2: Comparison of macular thickness between HbSS, HbSC and HbAA eyes.

	HbSS (n=47)	HbSC (n=36)	HbAA (n=52)
Fovea (μm)	207.4 ± 45.1**	208.2 ± 46.3**	245.6 ± 68.9
Temporal inner (μm)	267.6 ± 47.3**	267 ± 48.3**	292.9 ± 44.3
Superior inner (μm)	284 ± 43.8**	283.3 ± 44.7**	308.1 ± 34.7
Nasal inner (μm)	278.5 ± 41.2**	278.6 ± 41.2**	303.6 ± 32.8
Inferior inner (μm)	278.8 ± 45.8	278 ± 46.6*	297.3 ± 25.1
Temporal outer (μm)	266.8 ± 57.3*	267.2 ± 57.2*	300.9 ± 41.3
Superior outer (μm)	296.7 ± 23.2	297 ± 23.5	308.6 ± 28.7
Nasal outer (μm)	307.8 ± 21.9	308.2 ± 22.42	304.6 ± 20.8
Inferior outer (μm)	300.4 ± 17.2	300.4 ± 17.4	301.3 ± 24.7

Values are expressed as mean ± SD. Statistically different from HbAA (*p<0.05; **p<0.01).

Table 3: Comparison of N1 amplitude densities and implicit times between HbSS, HbSC and HbAA eyes.

	HbSS (n=38)	HbSC (n=20)	HbAA (n=64)
N1<2° (amplitude)	794.3 ± 270.9**	840.3 ± 294.2**	1121 ± 413.6
N1 2-5° (amplitude)	497 ± 71.04*	558.6 ± 136.4	636.5 ± 168.3
N1 5-10° (amplitude)	468.1 ± 80.9**	496.9 ± 110.3**	576.7 ± 145.7
N1 10-15° (amplitude)	470.2 ± 83.75**	477.8 ± 100.7*	552.4 ± 124.6
N1>15° (amplitude)	482.7 ± 74.94*	517.6 ± 139	566.9 ± 118.1
N1 <2° (implicit time)	26.41 ± 2.249*	26.85 ± 3.129	27.92 ± 2.438
N1 2-5° (implicit time)	27.2 ± 1.7	27.6 ± 1.1	27.41 ± 1.4
N1 5-10° (implicit time)	27.2 ± 1.1	27.4 ± 0.9	26.8 ± 1.1
N1 10-15° (implicit time)	29.8 ± 7.5	38.5 ± 23.3** ^d	28.8 ± 6.3
N1 >15° (implicit time)	27.3 ± 1.8	27.6 ± 1.8	26.9 ± 1.2

Values are expressed as mean ± SD. Statistically different from HbAA (*p<0.05; **p<0.01). Statistically different from HbSS (^d p<0.05)

Table 4: Comparison of P1 amplitude densities and implicit times between HbSS, HbSC and HbAA eyes.

	HbSS (n=38)	HbSC (n=20)	HbAA (n=64)
P1<2° (amplitude)	1337 ± 273.8**	1472 ± 602.8*	1991 ± 646.3
P1 2-5° (amplitude)	1013 ± 183.3**	1093 ± 253.3**	1306 ± 317.3
P1 5-10° (amplitude)	932.3 ± 155.2**	1000 ± 238.4*	1193 ± 259.6
P1 10-15°(amplitude)	969.3 ± 165**	1017 ± 234.5*	1202 ± 251.5
P1>15°(amplitude)	1071 ± 182.7**	1105 ± 321.4	1254 ± 331.1
P1 <2° (implicit time)	50.6 ± 3.1	45.4 ± 5.3	39.7 ± 48.7
P1 2-5° (implicit time)	46.8 ± 1.2	47.4 ± 1.9	46.8 ± 1.8
P1 5-10° (implicit time)	45.5 ± 1.1	45.9 ± 1.4*	45.1 ± 1.4
P1 10-15° (implicit time)	45.3 ± 1.1	45.8 ± 1.5*	44.9 ± 1.4
P1 >15° (implicit time)	45.3 ± 1.2	45.9 ± 1.5*	45 ± 1.5

Values are expressed as mean ± SD. Statistically different from HbAA (*p<0.05; **p<0.01).

Table 5: Comparison of N2 amplitude densities and implicit times between HbSS, HbSC and HbAA eyes.

	HbSS (n=38)	HbSC (=20)	HbAA (n=64)
N2<2° (amplitude)	1431 ± 378.1**	1657 ± 699.3*	2108 ± 662.3
N2 2-5° (amplitude)	943.9 ± 179**	1020 ± 227	1166 ± 397
N2 5-10° (amplitude)	842.9 ± 17.3*	897.7 ± 210.1	1048 ± 342.4
N2 10-15°(amplitude)	897.5 ± 174.9**	933.3 ± 256.1**	1116 ± 241.9
N2 >15°(amplitude)	994.2 ± 212.7**	988.6 ± 321.5*	1193 ± 311.6
N2 <2° (implicit time)	70.9 ± 2.8	73 ± 4.9	70.8 ± 3.4
N2 2-5° (implicit time)	65.8 ± 1.9	66.2 ± 3.4	65.6 ± 2.6
N2 5-10° (implicit time)	63.1 ± 1.3	64.3 ± 3.1	63.2 ± 1.8
N2 10-15° (implicit time)	63.6 ± 3.5	64.2 ± 3.03	71.9 ± 73.2
N2 >15° (implicit time)	62.8 ± 1.4	64.02 ± 2.9	62.6 ± 1.7

Values are expressed as mean ± SD. Statistically different from HbAA (*p<0.05; **p<0.01).

3.DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Si la drépanocytose reste la maladie génétique la plus fréquente au monde, sa physiopathologie reste mal comprise. Il en est de même pour ses complications ophtalmologiques et en particulier rétiniennes bien que leur première description remonte à 1956 (193).

Notre travail confirme le caractère fréquent des complications rétiniennes drépanocytaires. Cependant, elles apparaissent comme complètement indépendantes l'une de l'autre. Ainsi, s'il a été démontré depuis longtemps que la rétinopathie était plus fréquentes chez les sujets SC, cela ne paraît pas être le cas pour la maculopathie (89, 263).

La question se pose en fait de la définition même de la maculopathie drépanocytaire. La manifestation la plus souvent observée est un amincissement maculaire à l'OCT. Mais celui peut résulter de processus ischémiques aigus tels qu'une occlusion de l'artère centrale de la rétine ou plus récemment décrite une PAMM (Paracentral acute middle maculopathy) (89, 136, 214, 395). Cet amincissement maculaire peut également être observé de façon complètement fortuite sans que le patient décrive la moindre altération de la fonction visuelle (260, 267). Elle pourrait dans ce cas résulter d'un processus aigu passé inaperçu ou de phénomènes chroniques (136). Reste à savoir s'ils seraient d'origine hématologique, hémorhéologique ou inflammatoire.

Les variations biologiques, hématologiques, vasculaires et biochimiques observées chez les drépanocytaires ont permis à Gladwin et Vichinsky de classer les complications systémiques en phénotype hémolytique et visqueux (174, 231). Cependant ce modèle, tend à être dépassé et il n'a pour l'instant pas été établi que la maculopathie ou la rétinopathie drépanocytaire pouvait s'inscrire dans l'un ou l'autre groupe (200, 204).

Notre étude n'a retrouvé aucun lien entre les paramètres hématologiques et/ou hémorhéologiques et l'existence d'une rétinopathie ou d'une maculopathie drépanocytaire. De même les complications ophtalmologiques n'étaient associées à la présence d'aucune autre complication systémique pouvant suggérer l'appartenance à l'un ou l'autre groupe.

Par ailleurs, la drépanocytose est caractérisée par un état inflammatoire chronique. Ce qui participe au stress oxydatif au cœur de la physiopathologie de cette affection (117, 257, 455). Les complications oculaires de la drépanocytose et en particulier la maculopathie pourraient aussi en résulter. Notre étude n'a pas retrouvé de lien entre l'existence d'une rétinopathie ou d'une maculopathie et le taux de leucocytes (qui est classiquement augmenté dans la drépanocytose) ou la valeur de la CRP. Cependant, il conviendrait d'étudier d'autres marqueurs de l'inflammation : TNF-alpha, IL1-alpha, CD11b, VCAM-1 avant d'écarter l'hypothèse inflammatoire.

Très récemment, des équipes ont publié des cas de rétinopathie drépanocytaire compliquées d'hémorragie intravitréenne traitées par injections intravitréennes d'anti-VEGF avec des résultats positifs (23, 296, 301, 313). Leur utilisation est soutenue par le fait que le développement de néovaisseaux rétiens résulte dans la plupart des rétinopathies vasculaires proliférantes de la sécrétion de VEGF par la rétine ischémique (138). Kim et ses collaborateurs ont retrouvé en 2003 des taux élevés de pigment epithelial derived factor (PEDF) et de VEGF dans le vitré et au niveau des seaux des yeux drépanocytaires cryopréservés (244). L'administration d'anti-VEGF et/ou de PEDF pourrait peut-être permettre d'améliorer le profil évolutif de la rétinopathie drépanocytaire. En revanche, aucune étude ne s'est intéressée à l'implication de ces facteurs dans la maculopathie drépanocytaire.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. **Adeyoku AB, Olujohungbe ABK, Morris J, Yardumian A, Bareford D, Akenova A, Akinyanju O, Cinkotai K, O'Reilly PH.** Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. [Online]. *BJU Int* 90: 898–902, 2002.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460353> [30 Apr. 2018].
2. **Agapitov A V, Haynes WG.** Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 3: 1–15, 2002.
3. **Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V.** Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 359: 1311–1312, 2002.
4. **Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, Chui DHK, Steinberg MH.** Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood* 118: 19–27, 2011.
5. **Akinsheye I, Klings ES.** Sickle cell anemia and vascular dysfunction: The nitric oxide connection. *J Cell Physiol* 224: 620–625, 2010.
6. **Al-Abdulla NA, Haddock TA, Kerrison JB, Goldberg MF.** Sickle cell disease presenting with extensive peri-macular arteriolar occlusions in a nine-year-old boy. [Online]. *Am J Ophthalmol* 131: 275–6, 2001.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11228315> [23 Oct. 2017].
7. **Allison AC.** Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. [Online]. *Br Med J* 1: 290–4, 1954.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13115700> [4 Apr. 2018].
8. **Allison AC.** Observations on the sickling phenomenon and on the distribution of different haemoglobin types in erythrocyte populations. [Online]. *Clin Sci* 15: 497–510, 1956. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13374935> [9 Apr. 2018].

9. **Allon M.** Renal abnormalities in sickle cell disease. [Online]. *Arch Intern Med* 150: 501–4, 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2178577> [7 May 2018].
10. **Almeida A, Roberts I.** Bone involvement in sickle cell disease. *Br J Haematol* 129: 482–490, 2005.
11. **Alström T, Gräsbeck R, Hjelm M, Skandsen S.** Recommendations concerning the collection of reference values in clinical chemistry and activity report by the Committee on Reference Values of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology. [Online]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 144: 1–44, 1975. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1221493> [16 Apr. 2018].
12. **Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E.** Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol* 132: 108–13, 2006.
13. **Anie KA, Massaglia P.** Psychological therapies for thalassaemia. *Cochrane Database Syst Rev* : CD002890, 2014.
14. **Antonucci R, Walker R, Herion J, Orringer E.** Enhancement of sickle erythrocyte adherence to endothelium by autologous platelets. [Online]. *Am J Hematol* 34: 44–8, 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2109530> [29 Jan. 2018].
15. **Apovo M, Beuzard Y, Galacteros F, Bachir D, Giraud F.** The involvement of the Ca-dependent K channel and of the KCl co-transport in sickle cell dehydration during cyclic deoxygenation. [Online]. *Biochim Biophys Acta* 1225: 255–8, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8312370> [30 Nov. 2017].
16. **Asdourian G, Nagpal KC, Goldbaum M, Patrianakos D, Goldberg MF,**

- Rabb M.** Evolution of the retinal black sunburst in sickling haemoglobinopathies. [Online]. *Br J Ophthalmol* 59: 710–6, 1975.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1017440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [20 Sep. 2014].
17. **Asdourian GK, Nagpal KC, Busse B, Goldbaum M, Patriankos D, Rabb MF, Goldberg MF.** Macular and perimacular vascular remodelling sickling haemoglobinopathies. [Online]. *Br J Ophthalmol* 60: 431–53, 1976.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1017523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [20 Sep. 2014].
 18. **Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA, Tousson A, Gladwin MT, Patel RP, Tarpey MM, Batinic-Haberle I, White CR, Freeman BA.** Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci* 98: 15215–15220, 2001.
 19. **Assi TB, Baz E.** Current applications of therapeutic phlebotomy. *Blood Transfus* 12 Suppl 1: s75-83, 2014.
 20. **Ataga KI.** Novel therapies in sickle cell disease. *Hematol. / Educ. Progr. Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*,. .
 21. **Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, Sohler C, Hinderliter A, Parise L V, Orringer EP.** Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica* 93: 20–6, 2008.
 22. **Ayi K, Turrini F, Piga A, Arese P.** Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* 104: 3364–71, 2004.

23. **Babalola OE.** Intravitreal bevacizumab (Avastin) associated with secondary hyphaema in a case of proliferative sickle cell retinopathy. *Case Reports* 2010: bcr1120092441-bcr1120092441, 2010.
24. **Ballas SK, Talacki CA, Rao VM SR.** The prevalence of avascular necrosis in sickle cell anemia: correlation with alpha-thalassemia. *Hemoglobin* : 649–655., 1989.
25. **Ballas SK.** The sickle cell painful crisis in adults: phases and objective signs. [Online]. *Hemoglobin* 19: 323–33, 1995.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8718691> [25 Apr. 2018].
26. **Ballas SK.** Sickle cell disease: clinical management. [Online]. *Baillieres Clin Haematol* 11: 185–214, 1998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10872478> [25 Apr. 2018].
27. **Ballas SK.** Treatment of painful sickle cell leg ulcers with topical opioids. [Online]. *Blood* 99: 1096, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11822360> [25 Apr. 2018].
28. **Ballas SK.** Neurocognitive Complications of Sickle Cell Anemia in Adults. *JAMA* 303: 1862, 2010.
29. **Ballas SK.** Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clin Hemorheol Microcirc* 68: 105–128, 2018.
30. **Ballas SK, Darbari DS.** Neuropathy, neuropathic pain, and sickle cell disease. *Am J Hematol* 88: 927–9, 2013.
31. **Ballas SK, Delengowski A.** Pain measurement in hospitalized adults with sickle cell painful episodes. [Online]. *Ann Clin Lab Sci* 23: 358–61, 1993.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694538> [25 Apr. 2018].

32. **Ballas SK, Larnar J, Smith ED, Surrey S, Schwartz E, Rappaport EF.** Rheologic predictors of the severity of the painful sickle cell crisis. [Online]. *Blood* 72: 1216–23, 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3167204> [11 Apr. 2018].
33. **Ballas SK, Marcolina MJ.** Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion* 46: 105–110, 2006.
34. **Ballas SK, Mohandas N.** Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. [Online]. *Microcirculation* 11: 209–25, 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280093> [28 Mar. 2018].
35. **Ballas SK, Smith ED.** Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. [Online]. *Blood* 79: 2154–63, 1992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1562742> [11 Aug. 2017].
36. **Banerjee S, Owen C, Chopra S.** Sickle cell hepatopathy. *Hepatology* 33: 1021–8, 2001.
37. **Barabino GA, Platt MO, Kaul DK.** Sickle Cell Biomechanics. *Annu Rev Biomed Eng* 12: 345–367, 2010.
38. **Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, Liao F, Hardeman MR, Jung F, Meiselman HJ, Nash G, Nemeth N, Neu B, Sandhagen B, Shin S, Thurston G, Wautier JL, International Expert Panel for Standardization of Hemorheological Methods.** New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc* 42: 75–97, 2009.
39. **Baskurt OK, Meiselman HJ.** Blood Rheology and Hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 29: 435–450, 2003.

40. **Baskurt OK, Meiselman HJ.** RBC Aggregation: More Important than RBC Adhesion to Endothelial Cells as a Determinant of *In Vivo* Blood Flow in Health and Disease. *Microcirculation* 15: 585–590, 2008.
41. **Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ.** Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. [Online]. *Free Radic Biol Med* 24: 102–10, 1998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9436619> [16 Jul. 2018].
42. **Beet EA.** Sick cell disease in the Balovale District of Northern Rhodesia. [Online]. *East Afr Med J* 23: 75–86, 1946. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21027890> [4 Apr. 2018].
43. **Beet EA.** Sick cell disease in Northern Rhodesia. [Online]. *East Afr Med J* 24: 212–22, 1947. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20261289> [4 Apr. 2018].
44. **Beetsch JW, Park TS, Dugan LL, Shah AR, Gidday JM.** Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. [Online]. *Brain Res* 786: 89–95, 1998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554965> [8 Feb. 2018].
45. **Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G.** Heme Degradation and Vascular Injury. *Antioxid Redox Signal* 12: 233–248, 2010.
46. **Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM.** Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. [Online]. *Blood* 96: 2451–9, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001897> [1 Feb. 2018].
47. **Belcher JD, Nath KA, Vercellotti GM.** Vasculotoxic and Proinflammatory Effects of Plasma Heme: Cell Signaling and Cytoprotective Responses. *ISRN Oxidative Med* 2013: 1–9, 2013.
48. **Belcher JD, Vineyard J V, Bruzzzone CM, Chen C, Beckman JD, Nguyen J,**

- Steer CJ, Vercellotti GM.** Heme oxygenase-1 gene delivery by Sleeping Beauty inhibits vascular stasis in a murine model of sickle cell disease. *J Mol Med (Berl)* 88: 665–75, 2010.
49. **Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, Lacombe C, Galacteros F, Adnot S.** Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. [Online]. *Blood* 97: 1584–9, 2001.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238095> [14 May 2018].
50. **Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, Fay M, Vilmer E, Elion J, Gougerot-Pocidallo M-A, Elbim C.** Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. [Online]. *Blood* 99: 2297–303, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11895759> [29 Jan. 2018].
51. **Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, Chevret S, Duval M, Bertrand Y, Vannier J-P, Yakouben K, Thuret I, Bordigoni P, Fischer A, Lutz P, Stephan J-L, Dhedin N, Plouvier E, Margueritte G, Bories D, Verlhac S, Esperou H, Coic L, Vernant J-P, Gluckman E, SFGM-TC.** Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 110: 2749–56, 2007.
52. **Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Grazia Neonato M, Delacourt C.** G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood* 112: 4314–7, 2008.
53. **Bessis M.** [Erythrocyte form and deformability for normal blood and some

- hereditary hemolytic anemias (author's transl). [Online]. *Nouv Rev Fr Hematol Blood Cells* 18: 75–94, 1977. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/896459> [11 Apr. 2018].
54. **Bessis M, Bricka M, Breton-gorius J, Tabuis J.** New observations on sickle cells with special reference to their agglutinability. [Online]. *Blood* 9: 39–45, 1954. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13115470> [9 Apr. 2018].
 55. **Bhagat S, Patra PK, Thakur AS.** Association of Inflammatory Biomarker C-Reactive Protein, Lipid Peroxidation and Antioxidant Capacity Marker with HbF Level in Sickle Cell Disease Patients from Chattisgarh. *Indian J Clin Biochem* 27: 394–9, 2012.
 56. **Boggs DR, Hyde F, Srodes C.** An unusual pattern of neutrophil kinetics in sickle cell anemia. [Online]. *Blood* 41: 59–65, 1973. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4682080> [1 Feb. 2018].
 57. **Boisclair MD, Ireland H, Lane DA.** Assessment of hypercoagulable states by measurement of activation fragments and peptides. [Online]. *Blood Rev* 4: 25–40, 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2182146> [5 Feb. 2018].
 58. **Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK.** Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Circ Physiol* 284: H1577–H1584, 2003.
 59. **Bouchaïr N, Manigne P, Kanfer A, Raphalen P, de Montalembert M, Hagege I, Verschuur A, Maier-Redelsperger M, Girot R.** [Prevention of sickle cell crises with multiple phlebotomies]. [Online]. *Arch Pediatr* 7: 249–55, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10761600> [16 May 2018].
 60. **Boulanger C, Lüscher TF.** Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 85: 587–590, 1990.

61. **Bowers AS, Pepple DJ, Reid HL.** Optimal haematocrit in subjects with normal haemoglobin genotype (HbAA), sickle cell trait (HbAS), and homozygous sickle cell disease (HbSS). *Clin Hemorheol Microcirc* 47: 253–60, 2011.
62. **Brandão MM, Fontes A, Barjas-Castro ML, Barbosa LC, Costa FF, Cesar CL, Saad STO.** Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease. [Online]. *Eur J Haematol* 70: 207–11, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12656742> [9 Jan. 2018].
63. **Brasileiro F, Martins TT, Campos SB, Andrade Neto JL, Bravo-Filho VT, Araújo AS, Arantes TE.** Macular and peripapillary spectral domain optical coherence tomography changes in sickle cell retinopathy. *Retina* 35: 257–63, 2015.
64. **Brazier DJ, Gregor ZJ, Blach RK, Porter JB, Huehns ER.** Retinal detachment in patients with proliferative sickle cell retinopathy. [Online]. *Trans Ophthalmol Soc U K* 105 (Pt 1): 100–5, 1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3459293> [3 May 2018].
65. **Brittain HA, Eckman JR, Swerlick RA, Howard RJ, Wick TM.** Thrombospondin from activated platelets promotes sickle erythrocyte adherence to human microvascular endothelium under physiologic flow: a potential role for platelet activation in sickle cell vaso-occlusion. [Online]. *Blood* 81: 2137–43, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8471771> [30 Oct. 2017].
66. **Brittain JE, Han J, Ataga KI, Orringer EP, Parise L V.** Mechanism of CD47-induced alpha4beta1 integrin activation and adhesion in sickle reticulocytes. *J Biol Chem* 279: 42393–402, 2004.

67. **Brittain JE, Knoll CM, Ataga KI, Orringer EP, Parise L V.** Fibronectin bridges monocytes and reticulocytes via integrin $\alpha 4\beta 1$. *Br J Haematol* 141: 872–881, 2008.
68. **Brittain JE, Mlinar KJ, Anderson CS, Orringer EP, Parise L V.** Activation of sickle red blood cell adhesion via integrin-associated protein/CD47-induced signal transduction. *J Clin Invest* 107: 1555–62, 2001.
69. **Browne P V, Mosher DF, Steinberg MH, Hebbel RP.** Disturbance of plasma and platelet thrombospondin levels in sickle cell disease. *Am J Hematol* 51: 296–301, 1996.
70. **Brugnara C.** Erythrocyte dehydration in pathophysiology and treatment of sickle cell disease. [Online]. *Curr Opin Hematol* 2: 132–8, 1995.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371983> [23 Apr. 2018].
71. **Brugnara C.** Sickle cell dehydration: Pathophysiology and therapeutic applications. *Clin Hemorheol Microcirc* 68: 187–204, 2018.
72. **Brugnara C, Kopin AS, Bunn HF, Tosteson DC.** Electrolyte composition and equilibrium in hemoglobin CC red blood cells. [Online]. *Trans Assoc Am Physicians* 97: 104–12, 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6535334> [22 Jan. 2018].
73. **Buchanan, G., Vichinsky, E., Krishnamurti, L., & Shenoy S.** Severe sickle cell disease--pathophysiology and therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* : S64–7., 2010.
74. **Cadenas E, Davies KJ.** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. [Online]. *Free Radic Biol Med* 29: 222–30, 2000.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035250> [8 Feb. 2018].
75. **Campanella ME, Chu H, Wandersee NJ, Peters LL, Mohandas N, Gilligan**

- DM, Low PS.** Characterization of glycolytic enzyme interactions with murine erythrocyte membranes in wild-type and membrane protein knockout mice. *Blood* 112: 3900–3906, 2008.
76. **Carney MD, Jampol LM.** Epiretinal membranes in sickle cell retinopathy. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 105: 214–7, 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3813952> [23 Oct. 2017].
77. **Carney MD, Paylor RR, Cunha-Vaz JG, Jampol LM, Goldberg MF.** Ischemic choroidal neovascularization in sickle cell retinopathy. [Online]. *Ophthalmology* 93: 1163–8, 1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2433661> [2 May 2018].
78. **Cassoly R.** Quantitative analysis of the association of human hemoglobin with the cytoplasmic fragment of band 3 protein. [Online]. *J Biol Chem* 258: 3859–64, 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833235> [30 Nov. 2017].
79. **Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, Vera JC, Levy PS.** The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. [Online]. *Blood* 84: 643–9, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517723> [26 Apr. 2018].
80. **Cesquini M, Torsoni MA, Stoppa GR, Ogo SH.** t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. [Online]. *Biomed Pharmacother* 57: 124–9, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818473> [24 Apr. 2018].
81. **Chaar V, Picot J, Renaud O, Bartolucci P, Nzouakou R, Bachir D, Galacteros F, Colin Y, Le Van Kim C, El Nemer W.** Aggregation of mononuclear and red blood cells through an $\alpha_4\beta_1$ -Lu/basal cell adhesion molecule interaction in sickle cell disease. *Haematologica* 95: 1841–1848,

2010.

82. **Champion HC, Bivalacqua TJ, Takimoto E, Kass DA, Burnett AL.** Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1661–6, 2005.
83. **Chang J, Shi PA, Chiang EY, Frenette PS.** Intravenous immunoglobulins reverse acute vaso-occlusive crises in sickle cell mice through rapid inhibition of neutrophil adhesion. *Blood* 111: 915–23, 2008.
84. **Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR, Dover GJ.** An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. [Online]. *Blood* 85: 1111–7, 1995.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531513> [17 Jan. 2018].
85. **Charache S, Barton FB, Moore RD, Terrin ML, Steinberg MH, Dover GJ, Ballas SK, McMahon RP, Castro O, Orringer EP.** Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive “switching” agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. [Online]. *Medicine (Baltimore)* 75: 300–26, 1996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982148> [25 Apr. 2018].
86. **Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, Milner PF, Orringer EP, Phillips G, Platt OS.** Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. [Online]. *Blood* 79: 2555–65, 1992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375104> [5 Mar. 2018].
87. **Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert S V., McMahon RP, Bonds DR.** Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 332: 1317–1322, 1995.

88. **Charlot K, Romana M, Moeckesch B, Jumet S, Waltz X, Divialle-Doumbo L, Hardy-Dessources M-D, Petras M, Tressières B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Antoine-Jonville S, Connes P.** Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: Blood viscosity or microvascular dysfunction? *Blood Cells, Mol Dis* 56: 41–45, 2016.
89. **Chen S-N, Hwang J-F, Chen Y-T.** Macular thickness measurements in central retinal artery occlusion by optical coherence tomography. *Retina* 31: 730–7, 2011.
90. **Chiang EY, Frenette PS.** Sickle Cell Vaso-Occlusion. *Hematol Oncol Clin North Am* 19: 771–784, 2005.
91. **Chiang EY, Hidalgo A, Chang J, Frenette PS.** Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. *Nat Methods* 4: 219–22, 2007.
92. **Chien S, Usami S, Bertles JF.** Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 49: 623–34, 1970.
93. **Chies JA, Nardi NB.** Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 57: 46–50, 2001.
94. **Chintagari NR, Nguyen J, Belcher JD, Vercellotti GM, Alayash AI.** Haptoglobin attenuates hemoglobin-induced heme oxygenase-1 in renal proximal tubule cells and kidneys of a mouse model of sickle cell disease. *Blood Cells, Mol Dis* 54: 302–306, 2015.
95. **Chirico EN, Pialoux V.** Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life* 64: 72–80, 2012.
96. **Chiu D, Lubin B, Roelofsen B, van Deenen LL.** Sickled erythrocytes accelerate clotting in vitro: an effect of abnormal membrane lipid asymmetry.

- [Online]. *Blood* 58: 398–401, 1981.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7248527> [9 Apr. 2018].
97. **Cholera R, Brittain NJ, Gillrie MR, Lopera-Mesa TM, Diakite SAS, Arie T, Krause MA, Guindo A, Tubman A, Fujioka H, Diallo DA, Doumbo OK, Ho M, Wellems TE, Fairhurst RM.** Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci* 105: 991–996, 2008.
 98. **Chu H, Breite A, Ciraolo P, Franco RS, Low PS.** Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties. *Blood* 111: 932–8, 2008.
 99. **Cita K-C, Brureau L, Lemonne N, Billaud M, Connes P, Ferdinand S, Tressières B, Tarer V, Etienne-Julan M, Blanchet P, Elion J, Romana M.** Men with Sickle Cell Anemia and Priapism Exhibit Increased Hemolytic Rate, Decreased Red Blood Cell Deformability and Increased Red Blood Cell Aggregate Strength. *PLoS One* 11: e0154866, 2016.
 100. **Clark MR.** Mean corpuscular hemoglobin concentration and cell deformability. [Online]. *Ann N Y Acad Sci* 565: 284–94, 1989.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2672965> [16 Apr. 2018].
 101. **Clark MR, Mohandas N, Shohet SB.** Deformability of oxygenated irreversibly sickled cells. *J Clin Invest* 65: 189–196, 1980.
 102. **Clark MR, Shohet SB.** The effect of abnormal hemoglobins on the membrane regulation of cell hydration. [Online]. *Tex Rep Biol Med* 40: 417–29, [date unknown]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7034277> [22 Jan. 2018].
 103. **Clarke WN, Vomiero G, Leonard BC.** Bilateral simultaneous retinal arteriolar obstruction in a child with hemoglobin SS sickle cell disease. *J AAPOS Off*

- Publ Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus* 5: 126–8, 2001.
104. **Cogan DG.** Ophthalmic manifestations of systemic vascular disease. [Online]. *Major Probl Intern Med* 3: 1–187, 1974.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4606873> [2 May 2018].
 105. **Cohen SB, Fletcher ME, Goldberg MF, Jednock NJ.** Diagnosis and management of ocular complications of sickle hemoglobinopathies: Part V. [Online]. *Ophthalmic Surg* 17: 369–74, 1986.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2426644> [3 May 2018].
 106. **Condon P, Jampol LM, Farber MD, Rabb M, Serjeant G.** A randomized clinical trial of feeder vessel photocoagulation of proliferative sickle cell retinopathy. II. Update and analysis of risk factors. [Online]. *Ophthalmology* 91: 1496–8, 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6084217> [2 May 2018].
 107. **Condon PI, Serjeant GR.** Ocular findings in homozygous sickle cell anemia in Jamaica. [Online]. *Am J Ophthalmol* 73: 533–43, 1972.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5020172> [1 May 2018].
 108. **Condon PI, Serjeant GR.** Ocular findings in hemoglobin SC disease in Jamaica. [Online]. *Am J Ophthalmol* 74: 921–31, 1972.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4644739> [20 Sep. 2014].
 109. **Condon PI, Serjeant GR.** Ocular findings in sickle cell thalassemia in Jamaica. [Online]. *Am J Ophthalmol* 74: 1105–9, 1972.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4646713> [1 May 2018].
 110. **Condon PI, Serjeant GR.** Behaviour of untreated proliferative sickle retinopathy. [Online]. *Br J Ophthalmol* 64: 404–11, 1980.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7387965> [18 Sep. 2017].
 111. **Condon PI, Serjeant GR, Ikeda H.** Unusual chorioretinal degeneration in

- sickle cell disease. Possible sequelae of posterior ciliary vessel occlusion. [Online]. *Br J Ophthalmol* 57: 81–8, 1973.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4694396> [2 May 2018].
112. **Connes P, Alexy T, Detterich J, Romana M, Hardy-Dessources M-D, Ballas SK.** The role of blood rheology in sickle cell disease. *Blood Rev* 30: 111–118, 2016.
 113. **Connes P, Lamarre Y, Hardy-Dessources M-D, Lemonne N, Waltz X, Mougénel D, Mukisi-Mukaza M, Lalanne-Mistrih M-L, Tarer V, Tressières B, Etienne-Julan M, Romana M.** Decreased Hematocrit-To-Viscosity Ratio and Increased Lactate Dehydrogenase Level in Patients with Sickle Cell Anemia and Recurrent Leg Ulcers. *PLoS One* 8: e79680, 2013.
 114. **Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, Hue O, Hardy-Dessources M-D, Romana M.** Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 165: 564–72, 2014.
 115. **Connes P, Renoux C, Romana M, Abkarian M, Joly P, Martin C, Hardy-Dessources M-D, Ballas SK.** Blood rheological abnormalities in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 68: 165–172, 2018.
 116. **Connes P, Verlhac S, Bernaudin F.** Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 161: 484–498, 2013.
 117. **Conran N, Belcher JD.** Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 68: 263–299, 2018.
 118. **Croizat H.** Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. [Online]. *Br J Haematol* 87: 592–7, 1994.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527647> [1 Feb. 2018].

119. **Das SK, Nair RC.** Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. [Online]. *Br J Haematol* 44: 87–92, 1980. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7378296> [19 Feb. 2018].
120. **Dasgupta T, Fabry ME, Kaul DK.** Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 298: R394–R402, 2010.
121. **Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK.** Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med* 41: 1771–80, 2006.
122. **Dash S, Das KC.** Haemoglobinopathies in Punjab. I. Study of abnormal haemoglobins. [Online]. *Indian J Pathol Microbiol* 21: 246–51, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/750459> [23 May 2018].
123. **DeBaun MR, Armstrong FD, McKinstry RC, Ware RE, Vichinsky E, Kirkham FJ.** Silent cerebral infarcts: a review on a prevalent and progressive cause of neurologic injury in sickle cell anemia. *Blood* 119: 4587–96, 2012.
124. **Deutsch TA, Weinreb RN, Goldberg MF.** Indications for surgical management of hyphema in patients with sickle cell trait. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 102: 566–9, 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6704013> [30 Apr. 2018].
125. **Dias-Da-Motta P, Arruda VR, Muscará MN, Saad ST, De Nucci G, Costa FF, Condino-Neto A.** The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. [Online]. *Br J Haematol* 93: 333–40, 1996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639425> [23 Apr. 2018].

126. **Dizon-Moore R V, Jampol LM, Goldberg MF.** Choriorretinal and choriovitreal neovascularization. Their presence after photocoagulation of proliferative sickle cell retinopathy. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 99: 842–9, 1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6165344> [2 May 2018].
127. **Dizon R V, Jampol LM, Goldberg MF, Juarez C.** Choroidal occlusive disease in sickle cell hemoglobinopathies. [Online]. *Surv Ophthalmol* 23: 297–306, 1979. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/462363> [2 May 2018].
128. **Dobbe JGG, Streekstra GJ, Hardeman MR, Ince C, Grimbergen CA.** Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry* 50: 313–325, 2002.
129. **Dobbe JGG, Streekstra GJ, Strackee J, Rutten MCM, Stijnen JMA, Grimbergen CA.** Syllectometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation. *IEEE Trans Biomed Eng* 50: 97–106, 2003.
130. **Dobson SR, Holden KR, Nietert PJ, Cure JK, Laver JH, Disco D, Abboud MR.** Moyamoya syndrome in childhood sickle cell disease: a predictive factor for recurrent cerebrovascular events. [Online]. *Blood* 99: 3144–50, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11964276> [26 Apr. 2018].
131. **Dover GJ, Charache S.** Hydroxyurea induction of fetal hemoglobin synthesis in sickle-cell disease. [Online]. *Semin Oncol* 19: 61–6, 1992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379374> [16 Nov. 2017].
132. **Downes SM, Hambleton IR, Chuang EL, Lois N, Serjeant GR, Bird AC.** Incidence and natural history of proliferative sickle cell retinopathy: observations from a cohort study. *Ophthalmology* 112: 1869–75, 2005.
133. **Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI.** Nitric

- oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. [Online]. *Circ Res* 80: 557–64, 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9118487> [23 Apr. 2018].
134. **Eaton WA, Hofrichter J.** Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. [Online]. *Blood* 70: 1245–66, 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3311198> [28 Mar. 2018].
 135. **Eaton WA, Hofrichter J, Ross PD.** Editorial: Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease. [Online]. *Blood* 47: 621–7, 1976. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1260125> [13 Mar. 2018].
 136. **Elagouz M, Jyothi S, Gupta B, Sivaprasad S.** Sickle cell disease and the eye: old and new concepts. *Surv Ophthalmol* 55: 359–77, 2010.
 137. **Embury SH, Clark MR, Monroy G, Mohandas N.** Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *J Clin Invest* 73: 116–123, 1984.
 138. **Emerson GG, Luty GA.** Effects of sickle cell disease on the eye: clinical features and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am* 19: 957–73, ix, 2005.
 139. **Emond AM, Holman R, Hayes RJ, Serjeant GR.** Priapism and impotence in homozygous sickle cell disease. [Online]. *Arch Intern Med* 140: 1434–7, 1980. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6159833> [30 Apr. 2018].
 140. **Epstein FH, Moncada S, Higgs A.** The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 329: 2002–2012, 1993.
 141. **Evans E, Mohandas N, Leung A.** Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes. Major influence of cell hemoglobin concentration. *J Clin Invest* 73: 477–88, 1984.
 142. **Evans EA.** Structure and deformation properties of red blood cells: concepts

- and quantitative methods. [Online]. *Methods Enzymol* 173: 3–35, 1989.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2674613> [11 Apr. 2018].
143. **Evans EA, La Celle PL.** Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. [Online]. *Blood* 45: 29–43, 1975. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/803108> [11 Apr. 2018].
 144. **F. J. Neumann, H. Schmid-Schonbein and HO.** Temperature-dependence of red cell aggregation. *Eur J Physiol* 408: 524–530, 1987.
 145. **Fabry ME, Fine E, Rajanayagam V, Factor SM, Gore J, Sylla M, Nagel RL.** Demonstration of endothelial adhesion of sickle cells in vivo: a distinct role for deformable sickle cell discocytes. [Online]. *Blood* 79: 1602–11, 1992.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1547349> [27 Aug. 2018].
 146. **Fabry ME, Nagel RL.** Heterogeneity of red cells in the sickler: a characteristic with practical clinical and pathophysiological implications. [Online]. *Blood Cells* 8: 9–15, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7115982> [30 Oct. 2017].
 147. **Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, Fishlock K, Brown KA.** Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. [Online]. *Blood* 91: 266–74, 1998.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414294> [29 Jan. 2018].
 148. **Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM.** The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 5: 551–562, 1998.
 149. **Fadok VA, Bratton DL, Henson PM.** Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108: 957–62, 2001.

150. **Falk RJ, Jennette JC.** Sick cell nephropathy. [Online]. *Adv Nephrol Necker Hosp* 23: 133–47, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8154349> [7 May 2018].
151. **Farber MD, Jampol LM, Fox P, Moriarty BJ, Acheson RW, Rabb MF, Serjeant GR.** A randomized clinical trial of scatter photocoagulation of proliferative sickle cell retinopathy. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 109: 363–7, 1991. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2003796> [14 Mar. 2018].
152. **Fine, Petrovic, Irvine, Bhisitkul.** Correction-spontaneous central retinal artery occlusion in hemoglobin SC disease(1) [Online]. *Am J Ophthalmol* 130: 906–7, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124334> [23 Oct. 2017].
153. **Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, Nagasubramanian R, Mortier NA, Kimble AC, Aygun B, Adams RJ, Helms RW, Ware RE.** Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 117: 6681–4, 2011.
154. **Fortier N, Snyder LM, Garver F, Kiefer C, McKenney J, Mohandas N.** The relationship between in vivo generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. [Online]. *Blood* 71: 1427–31, 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3359048> [11 Apr. 2018].
155. **Fox PD, Acheson RW, Serjeant GR.** Outcome of iatrogenic choroidal neovascularisation in sickle cell disease. [Online]. *Br J Ophthalmol* 74: 417–20, 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696123> [2 May 2018].
156. **Fox PD, Vessey SJ, Forshaw ML, Serjeant GR.** Influence of genotype on the natural history of untreated proliferative sickle retinopathy--an angiographic study. [Online]. *Br J Ophthalmol* 75: 229–31, 1991.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2021592> [28 Feb. 2018].
157. **De Franceschi L, Fumagalli L, Olivieri O, Corrocher R, Lowell CA, Berton G.** Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport. *J Clin Invest* 99: 220–7, 1997.
 158. **Francis RB, Haywood LJ.** Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. [Online]. *J Natl Med Assoc* 84: 611–5, 1992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629925> [1 Feb. 2018].
 159. **Friedman MJ.** Erythrocytic mechanism of sickle cell resistance to malaria. [Online]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 1994–7, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/347452> [4 Apr. 2018].
 160. **G R BS, Serjeant.** Sickle cell disease. *Oxford Med Publ* 3rd editio, 2001.
 161. **Gaine S.** Pulmonary hypertension. [Online]. *JAMA* 284: 3160–8, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11135781> [26 Apr. 2018].
 162. **Galinos SO, Asdourian GK, Woolf MB, Goldberg MF, Busse BJ.** Choroido-vitreal neovascularization after argon laser photocoagulation. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 93: 524–30, 1975. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1169934> [2 May 2018].
 163. **Gardos G.** The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. [Online]. *Biochim Biophys Acta* 30: 653–4, 1958. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13618284> [30 Nov. 2017].
 164. **Garty I, Koren A, Garzosi H.** Frontal and orbital bone infarctions causing periorbital swelling in patients with sickle cell anemia. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 102: 1486–8, 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6237632> [23 Oct. 2017].
 165. **Gaston MH, Verter JI, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G,**

- Zarkowsky H, Vichinsky E, Iyer R, Lobel JS, Diamond S, Holbrook CT, Gill FM, Ritchey K, Falletta JM.** Prophylaxis with Oral Penicillin in Children with Sick Cell Anemia. *N Engl J Med* 314: 1593–1599, 1986.
166. **Gee BE, Platt OS.** Sick cell reticulocytes adhere to VCAM-1. [Online]. *Blood* 85: 268–74, 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528569> [30 Oct. 2017].
167. **Ghasemi Falavarjani K, Scott AW, Wang K, Han IC, Chen X, Klufas M, Hubschman J-P, Schwartz SD, Sadda SR, Sarraf D, Tsui I.** Correlation of multimodal imaging in sick cell retinopathy. *Retina* 36: S111–S117, 2016.
168. **Ghosh K, Colah R, Choudhry V, Das R, Manglani M, Madan N, Saxena R, Jain D, Marwaha N, Mohanty D, Ghosh M, Ross C, Verma I, Agarwal S, Choudhary R.** Guidelines for screening, diagnosis and management of hemoglobinopathies. *Indian J Hum Genet* 20: 101, 2014.
169. **Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, Pegelow CH, Vichinsky E.** Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sick cell disease. Cooperative Study of Sick Cell Disease. [Online]. *Blood* 86: 776–83, 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7606007> [19 Jul. 2018].
170. **Giroto R, Galactéros F, Lena-Russo D, M.-R. M., & Bardakdjian-Michau J MM.** Dépistage Néonatal de la Drépanocytose en France Métropolitaine. .
171. **Giroto R.** *La drépanocytose*. 2003.
172. **Gizi A, Papassotiriou I, Apostolakou F, Lazaropoulou C, Papastamataki M, Kanavaki I, Kalotychou V, Goussetis E, Kattamis A, Rombos I, Kanavakis E.** Assessment of oxidative stress in patients with sick cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cells Mol Dis* 46: 220–5, 2011.

173. **Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP.** Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med* 350: 886–95, 2004.
174. **Gladwin MT, Vichinsky E.** Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 359: 2254–2265, 2008.
175. **Goldbaum MH.** Retinal depression sign indicating a small retinal infarct. [Online]. *Am J Ophthalmol* 86: 45–55, 1978.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/677232> [2 May 2018].
176. **Goldbaum MH, Galinos SO, Apple D, Asdourian GK, Nagpal K, Jampol L, Woolf MB, Busse B.** Acute choroidal ischemia as a complication of photocoagulation. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 94: 1025–35, 1976. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/938279> [2 May 2018].
177. **Goldbaum MH, Peyman GA, Nagpal KC, Goldberg MF, Asdourian GK.** Vitrectomy in sickling retinopathy: report of five cases. [Online]. *Ophthalmic Surg* 7: 92–102, 1976. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1004814> [3 May 2018].
178. **Goldberg MF.** Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. [Online]. *Am J Ophthalmol* 71: 649–65, 1971.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5546311> [11 Aug. 2017].
179. **Goldberg MF.** Retinal vaso-occlusion in sickling hemoglobinopathies. [Online]. *Birth Defects Orig Artic Ser* 12: 475–515, 1976.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/782601> [14 Aug. 2017].
180. **Goldberg MF.** The diagnosis and treatment of secondary glaucoma after

- hyphema in sickle cell patients. [Online]. *Am J Ophthalmol* 87: 43–9, 1979.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/434052> [30 Apr. 2018].
181. **Gomperts E, Belcher JD, Otterbein LE, Coates TD, Wood J, Skolnick BE, Levy H, Vercellotti GM.** The role of carbon monoxide and heme oxygenase in the prevention of sickle cell disease vaso-occlusive crises. *Am J Hematol* 92: 569–582, 2017.
 182. **Gong L, Parikh S, Rosenthal PJ, Greenhouse B.** Biochemical and immunological mechanisms by which sickle cell trait protects against malaria. *Malar J* 12: 317, 2013.
 183. **Gozzelino R, Jeney V, Soares MP.** Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 323–354, 2010.
 184. **Grau M, Mozar A, Charlot K, Lamarre Y, Weyel L, Suhr F, Collins B, Jumet S, Hardy-Dessources M-D, Romana M, Lemonne N, Etienne-Julan M, Antoine-Jonville S, Bloch W, Connes P.** High red blood cell nitric oxide synthase activation is not associated with improved vascular function and red blood cell deformability in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 168: 728–736, 2015.
 185. **Grau M, Pauly S, Ali J, Walpurgis K, Thevis M, Bloch W, Suhr F.** RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PLoS One* 8: e56759, 2013.
 186. **Green NS, Fabry ME, Kaptue-Noche L, Nagel RL.** Senegal haplotype is associated with higher HbF than Benin and Cameroon haplotypes in African children with sickle cell anemia. [Online]. *Am J Hematol* 44: 145–6, 1993.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505527> [17 Jan. 2018].
 187. **Hahn E.** Sickle cell anemia: report of a case greatly improved by splenectomy;

- experimental study of sickle cell formation. *Arch Int Med* 39: 233–57, 1927.
188. **Haldane J.** The rate of mutation of human genes. *Hereditas* : 267–73, 1949.
 189. **Haldane J.** Disease and evolution. *Ric Sci Suppl* 19: 68–76, 1949.
 190. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. [Online]. *Lancet (London, England)* 1: 1396–7, 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6145845> [8 Feb. 2018].
 191. **Hamasaki N.** [Band 3 protein as a metabolic sensor--CO₂ regulates the amount of oxygen delivered to tissues from red blood cells]. [Online]. *Rinsho Byori* 54: 263–9, 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16637575> [22 Jan. 2018].
 192. **Han IC, Tadarati M, Scott AW.** Macular Vascular Abnormalities Identified by Optical Coherence Tomographic Angiography in Patients With Sickle Cell Disease. *JAMA Ophthalmol* 133: 1337–40, 2015.
 193. **Hannon JF.** Vitreous hemorrhages associated with sickle cell-hemoglobin C disease. [Online]. *Am J Ophthalmol* 42: 707–12, 1956. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13372691> [23 Aug. 2018].
 194. **Harkness DR.** Sickle cell trait revisited. [Online]. *Am J Med* 87: 30N–34N, 1989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2486530> [24 Apr. 2018].
 195. **Harris JW.** Studies on the destruction of red blood cells. VIII. Molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions. [Online]. *Proc Soc Exp Biol Med* 75: 197–201, 1950. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14797780> [28 Mar. 2018].
 196. **Hassell KL, Eckman JR, Lane PA.** Acute multiorgan failure syndrome: a potentially catastrophic complication of severe sickle cell pain episodes. [Online]. *Am J Med* 96: 155–62, 1994.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8109600> [30 Apr. 2018].
197. **Hatton CS, Bunch C, Weatherall DJ.** Hepatic sequestration in sickle cell anaemia. [Online]. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290: 744–5, 1985. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3918737> [30 Apr. 2018].
198. **Havell TC, Hillman D, Lessin LS.** Deformability characteristics of sickle cells by microelastimetry. [Online]. *Am J Hematol* 4: 9–16, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/655160> [11 Apr. 2018].
199. **Hayes RJ, Condon PI, Serjeant GR.** Haematological factors associated with proliferative retinopathy in sickle cell-haemoglobin C disease. [Online]. *Br J Ophthalmol* 65: 712–7, 1981. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7317324> [11 Aug. 2017].
200. **Hebbel RP.** Reconstructing sickle cell disease: A data-based analysis of the “hyperhemolysis paradigm” for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *Am J Hematol* 86: 123–154, 2011.
201. **Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH.** Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. [Online]. *J Clin Invest* 70: 1253–9, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6294138> [12 Apr. 2018].
202. **Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, Hedlund BE.** Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. [Online]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 237–41, 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3422420> [8 Feb. 2018].
203. **Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D.** The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. [Online]. *Microcirculation* 11: 129–51, 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280088> [31 Jan. 2018].

204. **Hebbel RP, Vercellotti G, Nath KA.** A systems biology consideration of the vasculopathy of sickle cell anemia: the need for multi-modality chemoprophylaxis. [Online]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 9: 271–92, 2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751187> [17 May 2018].
205. **Herrick JB.** Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia [Online]. *Yale J Biol Med* 74: 179–84, 1910. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11501714> [12 Mar. 2018].
206. **Hierso R, Waltz X, Mora P, Romana M, Lemonne N, Connes P, Hardy-Dessources M-D.** Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. *Br J Haematol* 166: 601–6, 2014.
207. **Hill A V, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM.** Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352: 595–600, 1991.
208. **Hillery CA, Panepinto JA.** Pathophysiology of stroke in sickle cell disease. [Online]. *Microcirculation* 11: 195–208, 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15280092> [23 Apr. 2018].
209. **Hirsch RE, Raventos-Suarez C, Olson JA, Nagel RL.** Ligand state of intraerythrocytic circulating HbC crystals in homozygote CC patients. [Online]. *Blood* 66: 775–7, 1985. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2412615> [27 Aug. 2018].
210. **Hoang Q V., Chau FY, Shahidi M, Lim JI.** Central Macular Splaying and Outer Retinal Thinning in Asymptomatic Sickle Cell Patients by Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Am J Ophthalmol* 151: 990–994.e1, 2011.

211. **Hofstra TC, Kalra VK, Meiselman HJ, Coates TD.** Sickie erythrocytes adhere to polymorphonuclear neutrophils and activate the neutrophil respiratory burst. [Online]. *Blood* 87: 4440–7, 1996.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8639806> [29 Jan. 2018].
212. **Hood DC, Bach M, Brigell M, Keating D, Kondo M, Lyons JS, Marmor MF, McCulloch DL, Palmowski-Wolfe AM, International Society For Clinical Electrophysiology of Vision.** ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition). *Doc Ophthalmol* 124: 1–13, 2012.
213. **Hunter MJ.** Human erythrocyte anion permeabilities measured under conditions of net charge transfer. [Online]. *J Physiol* 268: 35–49, 1977.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/874904> [22 Jan. 2018].
214. **Hussnain SA, Coady PA, Stoessel KM.** Paracentral acute middle maculopathy: precursor to macular thinning in sickle cell retinopathy. *BMJ Case Rep* 2017: bcr-2016-216124, 2017.
215. **Ingram VM.** Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. [Online]. *Nature* 180: 326–8, 1957. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13464827> [25 Aug. 2017].
216. **Isbey EK, Clifford GO, Tanaka KR.** Vitreous hemorrhage associated with sickle-cell trait and sickle-cell hemoglobin-C disease. [Online]. *Am J Ophthalmol* 45: 870–9, 1958. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13533498> [2 May 2018].
217. **Jacobson MS, Gagliano DA, Cohen SB, Rabb MF, Jampol LM, Farber MD, Goldberg MF.** A randomized clinical trial of feeder vessel photocoagulation of sickle cell retinopathy. A long-term follow-up. [Online]. *Ophthalmology* 98: 581–5, 1991. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2062489> [2 May 2018].

218. **Jampol LM.** Arteriolar occlusive diseases of the macula. [Online].
Ophthalmology 90: 534–9, 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6192380>
[23 Oct. 2017].
219. **Jampol LM, Acheson R, Eagle RC, Serjeant G, O’Grady R.** Calcification of
Bruch’s membrane in angioid streaks with homozygous sickle cell disease.
[Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 105: 93–8, 1987.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3800752> [23 Oct. 2017].
220. **Jampol LM, Farber M, Rabb MF, Serjeant G.** An update on techniques of
photocoagulation treatment of proliferative sickle cell retinopathy. *Eye* 5: 260–
263, 1991.
221. **Jampol LM, Green JL, Goldberg MF, Peyman GA.** An update on vitrectomy
surgery and retinal detachment repair in sickle cell disease. [Online]. *Arch*
Ophthalmol 100: 591–3, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7073571>
[20 Sep. 2014].
222. **Jison ML, Gladwin MT.** Hemolytic Anemia–associated Pulmonary
Hypertension of Sickle Cell Disease and the Nitric Oxide/Arginine Pathway. *Am*
J Respir Crit Care Med 168: 3–4, 2003.
223. **Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, Suffredini AF, Talwar S, Logun C,**
Raghavachari N, Beigel JH, Shelhamer JH, Danner RL, Gladwin MT. Blood
mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic,
and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood* 104: 270–80, 2004.
224. **Joiner CH.** Gardos pathway to sickle cell therapies? [Online]. *Blood* 111:
3918–9, 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18434967> [10 Apr. 2018].
225. **Joly P, Garnier N, Kebaili K, Renoux C, Dony A, Cheikh N, Renard C,**
Ceraulo A, Cuzzubbo D, Pondarré C, Martin C, Pialoux V, Francina A,

- Bertrand Y, Connes P.** G6PD deficiency and absence of α -thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Eur J Haematol* 96: 404–408, 2016.
226. **Joneckis CC, Ackley RL, Orringer EP, Wayner EA, Parise L V.** Integrin alpha 4 beta 1 and glycoprotein IV (CD36) are expressed on circulating reticulocytes in sickle cell anemia. [Online]. *Blood* 82: 3548–55, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7505118> [30 Oct. 2017].
227. **Kan, Y. W., Trecartin, R. F., & Dozy AM.** Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Prenat diagnosis hemoglobinopathies Ann New York Acad Sci* : 141–150, 1980.
228. **Kan YW, Dozy AM.** Polymorphism of DNA sequence adjacent to human beta-globin structural gene: relationship to sickle mutation. [Online]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5631–5, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/281713> [25 Aug. 2017].
229. **Karlsson S, Nienhuis AW.** Developmental Regulation of Human Globin Genes. *Annu Rev Biochem* 54: 1071–1108, 1985.
230. **Kasschau MR, Barabino GA, Bridges KR, Golan DE.** Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. [Online]. *Blood* 87: 771–80, 1996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555502> [19 Apr. 2018].
231. **Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH.** Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 21: 37–47, 2007.
232. **Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA, Brennan M-L, Hazen SL, Gladwin MT.** Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with

- pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol* 130: 943–53, 2005.
233. **Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP.** Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Prim* 4: 18010, 2018.
 234. **Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT.** Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *J Clin Invest* 127: 750–760, 2017.
 235. **Kaul DK, Fabry ME, Windisch P, Baez S, Nagel RL.** Erythrocytes in sickle cell anemia are heterogeneous in their rheological and hemodynamic characteristics. [Online]. *J Clin Invest* 72: 22–31, 1983.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6874947> [10 Jan. 2018].
 236. **Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA.** Sickle red cell-endothelium interactions. *Microcirculation* 16: 97–111, 2009.
 237. **Kaul DK, Finnegan E, Barabino GA.** Sickle red cell–Endothelium Interactions. *Microcirculation* 16: 97–111, 2009.
 238. **Kaul DK, Hebbel RP.** Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 106: 411–420, 2000.
 239. **Kaul DK, Liu X, Chang H-Y, Nagel RL, Fabry ME.** Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. *J Clin Invest* 114: 1136–1145, 2004.
 240. **Kaul DK, Liu XD, Fabry ME, Nagel RL.** Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1799-806, 2000.
 241. **Kayanoki Y, Kawata S, Yamasaki E, Kiso S, Inoue S, Tamura S, Taniguchi**

- N, Matsuzawa Y.** Reduced nitric oxide production by L-arginine deficiency in lysinuric protein intolerance exacerbates intravascular coagulation. [Online]. *Metabolism* 48: 1136–40, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484053> [7 Feb. 2018].
242. **Kearney WF.** Sick cell ophthalmopathy. [Online]. *N Y State J Med* 65: 2677–81, 1965. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5318463> [2 May 2018].
243. **Kim KH, Oh KY.** Clinical applications of therapeutic phlebotomy. *J Blood Med* 7: 139–44, 2016.
244. **Kim SY, Mocanu C, Mcleod DS, Bhutto IA, Merges C, Eid M, Tong P, Luttly GA.** Expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroid. [Online]. *Exp Eye Res* 77: 433–45, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957143> [11 Aug. 2017].
245. **Kimmel AS, Magargal LE, Tasman WS.** Proliferative sickle retinopathy and neovascularization of the disc: regression following treatment with peripheral retinal scatter laser photocoagulation. [Online]. *Ophthalmic Surg* 17: 20–2, 1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2419814> [23 Oct. 2017].
246. **Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyan B, Schnürch H-G, Gödecke A, Weber A-A, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M.** Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107: 2943–2951, 2006.
247. **Kodama M, Kanaide H, Abe S, Hirano K, Kai H, Nakamura M.** Endothelin-induced Ca-independent contraction of the porcine coronary artery. [Online]. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 1302–8, 1989.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499331> [23 Apr. 2018].

248. **Koehl B, Nivoit P, El Nemer W, Lenoir O, Hermand P, Pereira C, Brousse V, Guyonnet L, Ghinatti G, Benkerrou M, Colin Y, Le Van Kim C, Tharaux P-L.** The endothelin B receptor plays a crucial role in the adhesion of neutrophils to the endothelium in sickle cell disease. *Haematologica* 102: 1161–1172, 2017.
249. **Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, Flournoy-Gill Z, Levy P.** Leg ulcers in patients with sickle cell disease. [Online]. *Blood* 74: 1403–8, 1989.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2475188> [12 Mar. 2018].
250. **Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman H-J, Law SKA, Moestrup SK.** Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409: 198–201, 2001.
251. **Kunz Mathews M, McLeod DS, Merges C, Cao J, Luty GA.** Neutrophils and leucocyte adhesion molecules in sickle cell retinopathy. [Online]. *Br J Ophthalmol* 86: 684–90, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12034693> [26 Oct. 2017].
252. **Kwiatkowski JL, Granger S, Brambilla DJ, Brown RC, Miller ST, Adams RJ, STOP Trial Investigators.** Elevated blood flow velocity in the anterior cerebral artery and stroke risk in sickle cell disease: extended analysis from the STOP trial. *Br J Haematol* 134: 333–9, 2006.
253. **Labie D.** The complex relations between haemoglobinopathies and malaria. *Médecine Sci M/S* : 685–687, 2010.
254. **Lamarre Y, Romana M, Lemonne N, Hardy-Dessources M-D, Tarer V, Mougénel D, Waltz X, Tressières B, Lalanne-Mistrih M-L, Etienne-Julan M,**

- Connes P.** Alpha thalassemia protects sickle cell anemia patients from macro-albuminuria through its effects on red blood cell rheological properties. *Clin Hemorheol Microcirc* 57: 63–72, 2014.
255. **Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih M-L, Tressières B, Divialle-Doumido L, Hardy-Dessources M-D, Vent-Schmidt J, Petras M, Broquere C, Maillard F, Tarer V, Etienne-Julan M, Connes P.** Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica* 97: 1641–7, 2012.
256. **Lange RD, Minnich V, Moore C V.** Effect of oxygen tension and of pH on the sickling and mechanical fragility of erythrocytes from patients with sickle cell anemia and the sickle cell trait. [Online]. *J Lab Clin Med* 37: 789–802, 1951. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14841422> [9 Apr. 2018].
257. **Lard LR, Mul FP, de Haas M, Roos D, Duits AJ.** Neutrophil activation in sickle cell disease. [Online]. *J Leukoc Biol* 66: 411–5, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10496310> [31 Jan. 2018].
258. **Lawn RM, Fritsch EF, Parker RC, Blake G, Maniatis T.** The isolation and characterization of linked delta- and beta-globin genes from a cloned library of human DNA. [Online]. *Cell* 15: 1157–74, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/728996> [13 Mar. 2018].
259. **Lederberg J.** J. B. S. Haldane (1949) on infectious disease and evolution. [Online]. *Genetics* 153: 1–3, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471694> [16 Jan. 2018].
260. **Lee CM, Charles HC, Smith RT, Peachey NS, Cunha-Vaz JG, Goldberg MF.** Quantification of macular ischaemia in sickle cell retinopathy. [Online]. *Br J*

- Ophthalmol* 71: 540–5, 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3651368> [23 Oct. 2017].
261. **Leen JS, Ratnakaram R, Del Priore L V, Bhagat N, Zarbin MA.** Anterior segment ischemia after vitrectomy in sickle cell disease. [Online]. *Retina* 22: 216–9, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927857> [14 Mar. 2018].
 262. **Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W.** Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. [Online]. *Pediatrics* 84: 500–8, 1989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2671914> [14 Mar. 2018].
 263. **Lemaire C, Lamarre Y, Lemonne N, Waltz X, Chahed S, Cabot F, Botez I, Tressieres B, Lalanne-Mistrih M-L, Etienne-Julan M, Connes P.** Severe proliferative retinopathy is associated with blood hyperviscosity in sickle cell hemoglobin-C disease but not in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 55: 205–12, 2013.
 264. **Lemonne N, Connes P, Romana M, Vent-Schmidt J, Bourhis V, Lamarre Y, Etienne-Julan M.** Increased blood viscosity and red blood cell aggregation in a patient with sickle cell anemia and smoldering myeloma. *Am J Hematol* 87: E129, 2012.
 265. **Lemonne N, Lamarre Y, Romana M, Mukisi-Mukaza M, Hardy-Dessources M-D, Tarer V, Mougengel D, Waltz X, Tressieres B, Lalanne-Mistrih M-L, Etienne-Julan M, Connes P.** Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle cell anemia? *Blood* 121: 3054–3056, 2013.
 266. **Leveziel N, Bastuji-Garin S, Lalloum F, Querques G, Benlian P, Binaghi M, Coscas G, Soubrane G, Bachir D, Galactéros F, Souied EH.** Clinical and laboratory factors associated with the severity of proliferative sickle cell

- retinopathy in patients with sickle cell hemoglobin C (SC) and homozygous sickle cell (SS) disease. *Medicine (Baltimore)* 90: 372–8, 2011.
267. **Leveziel N, Kirsch O, Lautier-Frau M, Driss F, Offret H, Labetoulle M.** [Recovery of sickle cell disease ischemic maculopathy after erythropheresis: a clinical case study]. [Online]. *J Fr Ophtalmol* 28: 642–5, 2005.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141931> [23 Oct. 2017].
 268. **Lim MY, Ataga KI, Key NS.** Hemostatic abnormalities in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 20: 472–477, 2013.
 269. **Lin EE, Rodgers GP, Gladwin MT.** Hemolytic anemia-associated pulmonary hypertension in sickle cell disease. [Online]. *Curr Hematol Rep* 4: 117–25, 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15720960> [21 Feb. 2018].
 270. **Lionnet F, Hammoudi N, Stojanovic KS, Avellino V, Grateau G, Girot R, Haymann J-P.** Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica* 97: 1136–41, 2012.
 271. **Lippman SM, Abergel RP, Ginzton LE, Uitto J, Tanaka KR, Miyamoto EK, Laks MM.** Mitral valve prolapse in sickle cell disease: manifestation of a generalized connective tissue disorder. [Online]. *Am J Hematol* 19: 1–12, 1985.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3985003> [26 Apr. 2018].
 272. **Low PS.** Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. [Online]. *Biochim Biophys Acta* 864: 145–67, 1986.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2943319> [30 Nov. 2017].
 273. **Low PS, Waugh SM, Zinke K, Drenckhahn D.** The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. [Online]. *Science* 227: 531–3, 1985. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578228> [30 Nov.

- 2017].
274. **Lubin B, Kuypers F, Chiu D.** Lipid alterations and cellular properties of sickle red cells. [Online]. *Ann N Y Acad Sci* 565: 86–95, 1989.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2672973> [9 Apr. 2018].
 275. **Lutty GA, Merges C, Crone S, McLeod DS.** Immunohistochemical insights into sickle cell retinopathy. [Online]. *Curr Eye Res* 13: 125–38, 1994.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194359> [2 May 2018].
 276. **Maher AD, Kuchel PW.** The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes. [Online]. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1182–97, 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757756> [6 Feb. 2018].
 277. **Mahfoudhi E, Lecluse Y, Driss F, Abbes S, Flaujac C, Garçon L.** Red cells exchanges in sickle cells disease lead to a selective reduction of erythrocytes-derived blood microparticles. *Br J Haematol* 156: 545–547, 2012.
 278. **Maître B, Savale L, Bachir D, Simonneau G, Parent F, Galactéros F.** Hypertension pulmonaire et drépanocytose Pulmonary hypertension and sickle cell disease [Online]. <http://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/19054.pdf> [16 Jul. 2018].
 279. **Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH, Santin AP, Brandão VDM, Wagner S, Castro SM, Peralba M do CR, Benfato MS.** Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. [Online]. *J Natl Med Assoc* 100: 897–902, 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18717139> [19 Feb. 2018].
 280. **Manodori AB, Barabino GA, Lubin BH, Kuypers FA.** Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. [Online]. *Blood* 95: 1293–300, 2000.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666202> [30 Nov. 2017].
281. **Mansi IA, Alkhunaizi AM, Al-Khatti AA.** Bilateral central retinal artery occlusion secondary to sickle cell disease. [Online]. *Am J Hematol* 64: 79–80, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815797> [23 Oct. 2017].
282. **Markham MJ, Lottenberg R, Zumberg M.** Role of phlebotomy in the management of hemoglobin SC disease: case report and review of the literature. *Am J Hematol* 73: 121–5, 2003.
283. **Marotta CA, Wilson JT, Forget BG, Weissman SM.** Human beta-globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. [Online]. *J Biol Chem* 252: 5040–53, 1977. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/68958> [28 Mar. 2018].
284. **Marsh K, Otoo L, Hayes RJ, Carson DC, Greenwood BM.** Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. [Online]. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83: 293–303, [date unknown]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2694458> [4 Apr. 2018].
285. **Marsh RJ, Ford SM, Rabb MF, Hayes RJ, Serjeant GR.** Macular vasculature, visual acuity, and irreversibly sickled cells in homozygous sickle cell disease. [Online]. *Br J Ophthalmol* 66: 155–60, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7066265> [2 May 2018].
286. **Martin CR, Cobb C, Tatter D, Johnson C, Haywood LJ.** Acute myocardial infarction in sickle cell anemia. [Online]. *Arch Intern Med* 143: 830–1, 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6838304> [26 Apr. 2018].
287. **Martin GC, Dénier C, Zambrowski O, Grévent D, Bruère L, Brousse V, de Montalembert M, Brémond-Gignac D, Robert MP.** Visual Function in

- Asymptomatic Patients With Homozygous Sickle Cell Disease and Temporal Macular Atrophy. *JAMA Ophthalmol* 135: 1100–1105, 2017.
288. **Mason VR.** Sickle cell anemia. *J Am Med Ass* 79: 1318–1320, 1922.
 289. **Mathew R, Bafiq R, Ramu J, Pearce E, Richardson M, Drasar E, Thein SL, Sivaprasad S.** Spectral domain optical coherence tomography in patients with sickle cell disease. *Br J Ophthalmol* 99: 967–972, 2015.
 290. **May J, Evans JA, Timmann C, Ehmen C, Busch W, Thye T, Agbenyega T, Horstmann RD.** Hemoglobin Variants and Disease Manifestations in Severe Falciparum Malaria. *JAMA* 297: 2220, 2007.
 291. **Mc Curdy, PR, Mahmood L SA.** Red cell life span in sickle cell-hemoglobin C disease with a note about sickle cell-hemoglobin O ARAB. *Blood* 45: 273–279, 1975.
 292. **Mc Curdy PR and SA.** Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: a study with both DF32P and 51CR. *Am J Med* 64: 253–258, 1978.
 293. **McLeod DS, Goldberg MF, Luttj GA.** Dual-perspective analysis of vascular formations in sickle cell retinopathy. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 111: 1234–45, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8363467> [2 May 2018].
 294. **Meiselman OKB and HJ.** Determination of red blood cell shape recovery time constant in a couette system by the analysis of light reflectance and ektacytometry. *Biorheology* 33: 489–503, 1996.
 295. **Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ.** Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related

- vasodilators. [Online]. *Blood* 57: 946–55, 1981.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6111365> [5 Feb. 2018].
296. **Menaa F, Khan BA, Uzair B, Menaa A.** Sick cell retinopathy: improving care with a multidisciplinary approach. *J Multidiscip Healthc* Volume 10: 335–346, 2017.
 297. **Messmann R, Gannon S, Sarnaik S, Johnson RM.** Mechanical properties of sick cell membranes. [Online]. *Blood* 75: 1711–7, 1990.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2328320> [11 Apr. 2018].
 298. **Miller ST, Milton J, Steinberg MH.** G6PD deficiency and stroke in the CSSCD. *Am J Hematol* 86: 331, 2011.
 299. **Milner, P F, Kraus AP, Sebes JI, Sleeper LA, Dukes KA, Embury SH et al.** Sick cell disease as a cause of osteonecrosis of the femoral head. *N Engl J Med* : 1476–1481., 1991.
 300. **Minvielle W, Caillaux V, Cohen SY, Chasset F, Zambrowski O, Miere A, Souied EH.** Macular Microangiopathy in Sick Cell Disease Using Optical Coherence Tomography Angiography. *Am J Ophthalmol* 164: 137–44.e1, 2016.
 301. **Mitropoulos PG, Chatziralli IP, Parikakis EA, Peponis VG, Amariotakis GA, Moschos MM.** Intravitreal Ranibizumab for Stage IV Proliferative Sick Cell Retinopathy: A First Case Report. *Case Rep Ophthalmol Med* 2014: 1–6, 2014.
 302. **Miyauchi T, Masaki T.** PATHOPHYSIOLOGY OF ENDOTHELIN IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM. *Annu Rev Physiol* 61: 391–415, 1999.
 303. **Möckesch B, Connes P, Charlot K, Skinner S, Hardy-Dessources M-D, Romana M, Jumet S, Petras M, Divialle-Doumido L, Martin C, Tressières B,**

- Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Antoine S, Pialoux V.** Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease. *Br J Haematol* 178: 468–475, 2017.
304. **Mohandas N, Chasis JA.** Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. [Online]. *Semin Hematol* 30: 171–92, 1993.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8211222> [10 Jan. 2018].
305. **Mohandas N, Evans E.** Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors. [Online]. *Blood* 64: 282–7, 1984.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6733278> [11 Apr. 2018].
306. **Mohandas N, Evans E.** Sickle erythrocyte adherence to vascular endothelium. Morphologic correlates and the requirement for divalent cations and collagen-binding plasma proteins. *J Clin Invest* 76: 1605–1612, 1985.
307. **Mohandas N, Evans E.** Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23: 787–818, 1994.
308. **Monplaisir N, Merault G, Poyart C, Rhoda MD, Craescu C, Vidaud M, Galacteros F, Blouquit Y, Rosa J.** Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. [Online]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9363–7, 1986.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3467311> [17 Jan. 2018].
309. **de Montalembert M, Brousse V, Zahar J-R.** Pneumococcal prophylaxis for children with sickle cell disease in Africa. [Online]. *Arch Dis Child* 93: 715–6,

2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644941> [14 Mar. 2018].
310. **Morel O, Toti F, Freyssinet J-M.** [Markers of thrombotic disease: procoagulant microparticles]. [Online]. *Ann Pharm Fr* 65: 75–84, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404540> [5 Feb. 2018].
 311. **Moriarty BJ, Acheson RW, Condon PI, Serjeant GR.** Patterns of visual loss in untreated sickle cell retinopathy. *Eye (Lond)* 2 (Pt 3): 330–5, 1988.
 312. **Morris CR, Morris SM, Hagar W, Van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, Machado L, Kuypers FA, Vichinsky EP.** Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med* 168: 63–9, 2003.
 313. **Moshiri A, Ha NK, Ko FS, Scott AW.** Bevacizumab presurgical treatment for proliferative sickle-cell retinopathy-related retinal detachment. *Retin Cases Brief Rep* 7: 204–5, 2013.
 314. **Mozar A, Grau M, Lamarre Y, Weyel L, Suhr F, Collins B, Hardy-Dessources M-D, Romana M, Lemonne N, Etienne-Julan M, Bloch W, Connes P.** Red blood cell nitric oxide synthase activation is increased in patients with sickle cell hemoglobin C disease. *Am J Hematol* 90: E30-2, 2015.
 315. **Mozzarelli A, Hofrichter J, Eaton WA.** Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. [Online]. *Science* 237: 500–6, 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3603036> [30 Oct. 2017].
 316. **Muller-Eberhard U, Javid J, Liem HH, Hanstein A, Hanna M.** Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. [Online]. *Blood* 32: 811–5, 1968. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5687939> [24 Apr. 2018].
 317. **Murayama M.** Tertiary structure of sickle cell hemoglobin and its functional

- significance. [Online]. *J Cell Physiol* 67: Suppl 1:21-32, 1966.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5964887> [20 Nov. 2017].
318. **Murphy JR.** Hemoglobin CC erythrocytes: decreased intracellular pH and decreased O₂ affinity--anemia. [Online]. *Semin Hematol* 13: 177–80, 1976.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7017> [22 Jan. 2018].
319. **Myint KT, Sahoo S, Thein AW, Moe S, Ni H.** Laser therapy for retinopathy in sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* : CD010790, 2015.
320. **Nader E, Connes P, Lamarre Y, Renoux C, Joly P, Hardy-Dessources M-D, Cannas G, Lemonne N, Ballas SK.** Plasmapheresis may improve clinical condition in sickle cell disease through its effects on red blood cell rheology. *Am J Hematol* 92: E629–E630, 2017.
321. **Naeije R, Gerges M, Vachiery J-L, Caravita S, Gerges C, Lang IM.** Hemodynamic Phenotyping of Pulmonary Hypertension in Left Heart Failure. *Circ Hear Fail* 10: e004082, 2017.
322. **Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH.** The paradox of hemoglobin SC disease. [Online]. *Blood Rev* 17: 167–78, 2003.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818227> [22 Jan. 2018].
323. **Nagel RL, Fleming AF.** Genetic epidemiology of the beta s gene. [Online]. *Baillieres Clin Haematol* 5: 331–65, 1992.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511179> [5 Apr. 2018].
324. **Nagel RL, Labie D.** DNA haplotypes and the beta s globin gene. [Online]. *Prog Clin Biol Res* 316B: 371–93, 1989.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2575756> [17 Jan. 2018].
325. **Nagel RL, Rao SK, Dunda-Belkhodja O, Connolly MM, Fabry ME, Georges A, Krishnamoorthy R, Labie D.** The hematologic characteristics of sickle cell

- anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between G gamma and HbF level. [Online]. *Blood* 69: 1026–30, 1987.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2435339> [17 Jan. 2018].
326. **Nagpal KC, Goldberg MF, Rabb MF.** Ocular manifestations of sickle hemoglobinopathies. [Online]. *Surv Ophthalmol* 21: 391–411, 1977.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/559355> [20 Sep. 2014].
327. **Nagpal KC, Patrianakos D, Asdourian GK, Goldberg MF, Rabb M, Jampol L.** Spontaneous regression (autoinfarction) of proliferative sickle retinopathy. [Online]. *Am J Ophthalmol* 80: 885–92, 1975.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1190280> [23 Oct. 2017].
328. **Nash GB, Johnson CS, Meiselman HJ.** Mechanical properties of oxygenated red blood cells in sickle cell (HbSS) disease. [Online]. *Blood* 63: 73–82, 1984.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6689955> [11 Apr. 2018].
329. **Nash GB, Johnson CS, Meiselman HJ.** Influence of oxygen tension on the viscoelastic behavior of red blood cells in sickle cell disease. [Online]. *Blood* 67: 110–8, 1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3940541> [11 Apr. 2018].
330. **Natta CL, Chen LC, Chow CK.** Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol* 83: 130–2, 1990.
331. **Naumann HN, Diggs LW, Barreras L, Williams BJ.** Plasma hemoglobin and hemoglobin fractions in sickle cell crisis. [Online]. *Am J Clin Pathol* 56: 137–47, 1971. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5567718> [7 Feb. 2018].
332. **Nebor D, Bowers A, Connes P, Hardy-Dessources M-D, Knight-Madden J, Cumming V, Reid M, Romana M.** Plasma concentration of platelet-derived microparticles is related to painful vaso-occlusive phenotype severity in sickle cell anemia. *PLoS One* 9: e87243, 2014.

333. **Nebor D, Bowers A, Hardy-Dessources M-D, Knight-Madden J, Romana M, Reid H, Barthélémy J-C, Cumming V, Hue O, Elion J, Reid M, Connes P, CAREST Study Group.** Frequency of pain crises in sickle cell anemia and its relationship with the sympatho-vagal balance, blood viscosity and inflammation. *Haematologica* 96: 1589–94, 2011.
334. **Nebor D, Broquere C, Brudey K, Mougengel D, Tarer V, Connes P, Elion J, Romana M.** Alpha-thalassemia is associated with a decreased occurrence and a delayed age-at-onset of albuminuria in sickle cell anemia patients. *Blood Cells, Mol Dis* 45: 154–158, 2010.
335. **Neel J V.** The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science (80-)* 110: 64–66, 1949.
336. **El Nemer W, Gauthier É, Wautier M-P, Rahuel C, Gane P, Galactéros F, Wautier J-L, Cartron J-P, Colin Y, Le Van Kim C.** Role of Lu/BCAM in abnormal adhesion of sickle red blood cells to vascular endothelium. *Transfus Clin Biol* 15: 29–33, 2008.
337. **El Nemer W, Wautier M-P, Rahuel C, Gane P, Hermand P, Galactéros F, Wautier J-L, Cartron J-P, Colin Y, Le Van Kim C.** Endothelial Lu/BCAM glycoproteins are novel ligands for red blood cell $\alpha_4\beta_1$ integrin: role in adhesion of sickle red blood cells to endothelial cells. *Blood* 109: 3544–51, 2007.
338. **Neu B, Armstrong JK, Fisher TC, Meiselman HJ.** Aggregation of human RBC in binary dextran-PEG polymer mixtures. [Online]. *Biorheology* 38: 53–68, 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11381165> [12 Jul. 2018].
339. **Neu B, Meiselman HJ.** Depletion-Mediated Red Blood Cell Aggregation in Polymer Solutions. *Biophys J* 83: 2482–2490, 2002.

340. **Neu B, Sowemimo-Coker SO, Meiselman HJ.** Cell-Cell Affinity of Senescent Human Erythrocytes. *Biophys J* 85: 75–84, 2003.
341. **Ngo DA, Aygun B, Akinsheye I, Hankins JS, Bhan I, Luo HY, Steinberg MH, Chui DHK.** Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *Br J Haematol* 156: 259–264, 2012.
342. **Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Sebastiani P, Farrer LA, Steinberg MH.** Sick cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol* 133: 570–8, 2006.
343. **Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH.** Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood* 106: 3264–3267, 2005.
344. **Nur E, Biemond BJ, Otten H-M, Brandjes DP, Schnog J-JB, CURAMA Study Group.** Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol* 86: 484–489, 2011.
345. **Nur E, Brandjes DP, Schnog J-JB, Otten H-M, Fijnvandraat K, Schalkwijk CG, Biemond BJ, CURAMA Study Group.** Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. *Br J Haematol* 151: 62–9, 2010.
346. **O'Donnell S, Mandaro R, Schuster TM, Arnone A.** X-ray diffraction and solution studies of specifically carbamylated human hemoglobin A. Evidence for the location of a proton- and oxygen-linked chloride binding site at valine 1 alpha. [Online]. *J Biol Chem* 254: 12204–8, 1979.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/40992> [30 Nov. 2017].

347. **Ockenhouse CF, Tandon NN, Magowan C, Jamieson GA, Chulay JD.** Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. [Online]. *Science* 243: 1469–71, 1989.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2467377> [4 Apr. 2018].
348. **Odièvre M-H, Verger E, Silva-Pinto AC, Elion J.** Pathophysiological insights in sickle cell disease. [Online]. *Indian J Med Res* 134: 532–7, 2011.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22089617> [19 Apr. 2018].
349. **Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, Wethers DL, Pegelow CH, Gill FM.** Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. [Online]. *Blood* 91: 288–94, 1998.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414296> [26 Apr. 2018].
350. **Okpala I, Daniel Y, Haynes R, Odoemene D, Goldman J.** Relationship between the clinical manifestations of sickle cell disease and the expression of adhesion molecules on white blood cells. [Online]. *Eur J Haematol* 69: 135–44, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406006> [29 Jan. 2018].
351. **Okpala I, Westerdale N, Jegede T, Cheung B.** Etilefrine for the prevention of priapism in adult sickle cell disease. [Online]. *Br J Haematol* 118: 918–21, 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181066> [30 Apr. 2018].
352. **Olujohungbe AB, Adeyoju A, Yardumian A, Akinyanju O, Morris J, Westerdale N, Akenova Y, Kehinde MO, Anie K, Howard J, Brooks A, Davis VA, Khoriatry AI.** A Prospective Diary Study of Stuttering Priapism in Adolescents and Young Men With Sickle Cell Anemia: Report of an International Randomized Control Trial--The Priapism in Sickle Cell Study. *J Androl* 32: 375–382, 2011.
353. **Origa R.** Beta-Thalassemia [Online].

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301599> [5 Apr. 2018].
354. **Owens AP, Mackman N.** Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 108: 1284–97, 2011.
 355. **Parent F, Bachir D, Inamo J, Lionnet F, Driss F, Loko G, Habibi A, Bennani S, Savale L, Adnot S, Maitre B, Yaïci A, Hajji L, O’Callaghan DS, Clerson P, Girot R, Galacteros F, Simonneau G.** A hemodynamic study of pulmonary hypertension in sickle cell disease. *N Engl J Med* 365: 44–53, 2011.
 356. **Parise L V, Telen MJ.** Erythrocyte adhesion in sickle cell disease. [Online]. *Curr Hematol Rep* 2: 102–8, 2003.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12901140> [18 Apr. 2018].
 357. **Pasvol G, Weatherall DJ, Wilson RJ.** Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. [Online]. *Nature* 274: 701–3, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/353566> [4 Apr. 2018].
 358. **Pauling L, Itano HA.** Sickle cell anemia, a molecular disease. [Online]. *Science* 109: 443, 1949. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18213804> [24 Aug. 2017].
 359. **Piel FB.** Distribution géographique de la drépanocytose en 2010. *médecine/sciences* 29: 965–967, 2013.
 360. **Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, Temperley WH, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI.** Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet (London, England)* 381: 142–51, 2013.
 361. **Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI.** Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun* 1: 104,

- 2010.
362. **Piel FB, Steinberg MH, Rees DC.** Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 377: 302–305, 2017.
 363. **Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinney TR.** Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 325: 11–6, 1991.
 364. **Potoka KP, Gladwin MT.** Vasculopathy and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 308: L314–L324, 2015.
 365. **Powars D, Chan LS, Schroeder WA.** The variable expression of sickle cell disease is genetically determined. [Online]. *Semin Hematol* 27: 360–76, 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2255920> [25 Apr. 2018].
 366. **Powars DR.** Beta s-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. [Online]. *Hematol Oncol Clin North Am* 5: 475–93, 1991. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1713910> [5 Apr. 2018].
 367. **Qari MH, Dier U, Mousa SA.** Biomarkers of Inflammation, Growth Factor, and Coagulation Activation in Patients With Sickle Cell Disease. *Clin Appl Thromb* 18: 195–200, 2012.
 368. **Quinn CT, Rogers ZR, Buchanan GR.** Survival of children with sickle cell disease. *Blood* 103: 4023–4027, 2004.
 369. **R. M. Bauersachs, R. B. Wenby and HJM.** *Determination of specific red blood cell aggregation indices via an automated system.* 1989.
 370. **Radomski MW, Moncada S.** Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. [Online]. *Thromb Haemost* 70: 36–41, 1993. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694388> [5 Feb. 2018].
 371. **Ragusa A, Lombardo M, Sortino G, Lombardo T, Nagel RL, Labie D.** Beta

- S gene in Sicily is in linkage disequilibrium with the Benin haplotype: implications for gene flow. [Online]. *Am J Hematol* 27: 139–41, 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2893541> [17 Jan. 2018].
372. **Raichand M, Dizon R V, Nagpal KC, Goldberg MF, Rabb MF, Goldbaum MH.** Macular holes associated with proliferative sickle cell retinopathy. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 96: 1592–6, 1978. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/687199> [23 Oct. 2017].
373. **Raichand M, Goldberg MF, Nagpal KC, Goldbaum MH, Asdourian GK.** Evolution of neovascularization in sickle cell retinopathy. A prospective fluorescein angiographic study. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 95: 1543–52, 1977. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/561589> [23 Oct. 2017].
374. **Rampling MW, Meiselman HJ, Neu B, Baskurt OK.** Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. [Online]. *Biorheology* 41: 91–112, 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090679> [12 Apr. 2018].
375. **Rednam KR, Jampol LM, Goldberg MF.** Scatter retinal photocoagulation for proliferative sickle cell retinopathy. [Online]. *Am J Ophthalmol* 93: 594–9, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6177246> [2 May 2018].
376. **Rees DC, Williams TN, Gladwin MT.** Sickle-cell disease. *Lancet* 376: 2018–31, 2010.
377. **Reid M, Badaloo A, Forrester T, Jahoor F.** In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E73-9, 2006.
378. **Reinhart WH, Singh A.** Erythrocyte aggregation: the roles of cell deformability and geometry. [Online]. *Eur J Clin Invest* 20: 458–62, 1990.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121506> [10 Jan. 2018].

379. **Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT.** Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 8: 1383–1389, 2002.
380. **Relevy H, Koshkaryev A, Manny N, Yedgar S, Barshtein G.** Blood banking-induced alteration of red blood cell flow properties. *Transfusion* 48: 136–46, 2008.
381. **Renoux C, Joly P, Faes C, Mury P, Eglenen B, Turkay M, Yavas G, Yalcin O, Bertrand Y, Garnier N, Cuzzubbo D, Gauthier A, Romana M, Möckesch B, Cannas G, Antoine-Jonville S, Pialoux V, Connes P.** Association between Oxidative Stress, Genetic Factors, and Clinical Severity in Children with Sickle Cell Anemia. *J Pediatr* 195: 228–235, 2018.
382. **Renoux C, Parrow N, Faes C, Joly P, Hardeman M, Tisdale J, Levine M, Garnier N, Bertrand Y, Kebaili K, Cuzzubbo D, Cannas G, Martin C, Connes P.** Importance of methodological standardization for the ektacytometric measures of red blood cell deformability in sickle cell anemia. *Clin Hemorheol Microcirc* 62: 173–179, 2016.
383. **Ribeil J-A, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, Caccavelli L, Neven B, Bourget P, El Nemer W, Bartolucci P, Weber L, Puy H, Meritet J-F, Grevent D, Beuzard Y, Chrétien S, Lefebvre T, Ross RW, Negre O, Veres G, Sandler L, Soni S, de Montalembert M, Blanche S, Leboulch P, Cavazzana M.** Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 376: 848–855, 2017.
384. **Richard V, Dodson GG, Mauguén Y.** Human deoxyhaemoglobin-2,3-diphosphoglycerate complex low-salt structure at 2.5 Å resolution. *J Mol Biol*

- 233: 270–4, 1993.
385. **Rivera A, Jarolim P, Brugnara C.** Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. [Online]. *Blood* 99: 357–603, 2002.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756192> [6 Feb. 2018].
386. **Rivera A, Rotter MA, Brugnara C.** Endothelins activate Ca(2+)-gated K(+) channels via endothelin B receptors in CD-1 mouse erythrocytes. [Online]. *Am J Physiol* 277: C746-54, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516105> [16 Jul. 2018].
387. **Roberts I, de Montalembert M.** Sickle cell disease as a paradigm of immigration hematology: new challenges for hematologists in Europe. [Online]. *Haematologica* 92: 865–71, 2007.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17606434> [13 Mar. 2018].
388. **Romayanada N, Goldberg MF, Green WR.** Histopathology of sickle cell retinopathy. [Online]. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 77: OP652-76, 1973. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4784908> [15 Mar. 2018].
389. **Roth EF, Friedman M, Ueda Y, Tellez I, Trager W, Nagel RL.** Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with *Plasmodium falciparum* malaria. [Online]. *Science* 202: 650–2, 1978.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/360396> [4 Apr. 2018].
390. **Rubanyi GM, Polokoff MA.** Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. [Online]. *Pharmacol Rev* 46: 325–415, 1994. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831383> [6 Feb. 2018].
391. **Ryan SJ.** Role of the vitreous in the haemoglobinopathies. [Online]. *Trans Ophthalmol Soc U K* 95: 403–6, 1975.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1066859> [3 May 2018].

392. **Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, Castier Y, Malpeli G, Debbabi H, Galaup A, Maier-Redelsperger M, Vandermeersch S, Scarpa A, Janin A, Levy B, Girot R, Beuzard Y, Leboeuf C, Henri A, Germain S, Dussaule J-C, Tharaux P-L.** Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J Clin Invest* 118: 1924–33, 2008.
393. **Saint-Martin C, Romana M, Bibrac A, Brudey K, Tarer V, Divialle-Doumbo L, Petras M, Keclard-Christophe L, Lamothe S, Broquere C, Etienne-Julan M.** Universal newborn screening for haemoglobinopathies in Guadeloupe (French West Indies): a 27-year experience. *J Med Screen* 20: 177–82, 2013.
394. **Salomao M, Zhang X, Yang Y, Lee S, Hartwig JH, Chasis JA, Mohandas N, An X.** Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8026–31, 2008.
395. **Sanfilippo CJ, Klufas MA, Sarraf D, Tsui I.** Optical coherence tomography angiography of sickle cell maculopathy. *Retin Cases Brief Rep* 9: 360–2, 2015.
396. **Sanghvi C, Laude A, Smith A, Dodd CL.** Superior macular sparing in central retinal artery occlusion due to sickle cell anaemia. *Eye (Lond)* 18: 442–3, 2004.
397. **Schacter L, Warth JA, Gordon EM, Prasad A, Klein BL.** Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. [Online]. *FASEB J* 2: 237–43, 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3350236> [19 Feb. 2018].
398. **Schaer DJ, Buehler PW.** Cell-Free Hemoglobin and Its Scavenger Proteins: New Disease Models Leading the Way to Targeted Therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a013433–a013433, 2013.
399. **Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM.** Hemolysis

- and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood* 121: 1276–1284, 2013.
400. **Schlüter K, Drenckhahn D.** Co-clustering of denatured hemoglobin with band 3: its role in binding of autoantibodies against band 3 to abnormal and aged erythrocytes. [Online]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6137–41, 1986.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3461480> [30 Nov. 2017].
 401. **Schmalzer EA, Lee JO, Brown AK, Usami S, Chien S.** Viscosity of mixtures of sickle and normal red cells at varying hematocrit levels. Implications for transfusion. [Online]. *Transfusion* 27: 228–33, 1987.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3590284> [14 Mar. 2018].
 402. **Schmalzer EA, Manning RS, Chien S.** Filtration of sickle cells: recruitment into a rigid fraction as a function of density and oxygen tension. [Online]. *J Lab Clin Med* 113: 727–34, 1989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2732619> [11 Apr. 2018].
 403. **Schubert HD.** Schisis in sickle cell retinopathy. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 123: 1607–9, 2005.
 404. **Schwartz RS, Tanaka Y, Fidler IJ, Chiu DT, Lubin B, Schroit AJ.** Increased adherence of sickled and phosphatidylserine-enriched human erythrocytes to cultured human peripheral blood monocytes. *J Clin Invest* 75: 1965–1972, 1985.
 405. **Sebastiani P, Wang L, Nolan VG, Melista E, Ma Q, Baldwin CT, Steinberg MH.** Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Bayesian modeling of genetic associations. *Am J Hematol* 83: 189–95, 2008.
 406. **Serjeant BE, Mason KP, Condon PI, Hayes RJ, Kenny MW, Stuart J, Serjeant GR.** Blood rheology and proliferative retinopathy in sickle cell-

- haemoglobin C disease. [Online]. *Br J Ophthalmol* 68: 325–8, 1984.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6712910> [11 Aug. 2017].
407. **Serjeant GR**. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a011783, 2013.
408. **Setty BNY, Betal SG**. Microvascular endothelial cells express a phosphatidylserine receptor: a functionally active receptor for phosphatidylserine-positive erythrocytes. *Blood* 111: 905–914, 2008.
409. **Setty BNY, Key NS, Rao AK, Gayen-Betal S, Krishnan S, Dampier CD, Stuart MJ**. Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of haemolysis. *Br J Haematol* 157: 370–80, 2012.
410. **Shao J, Miyata T, Yamada K, Hanafusa N, Wada T, Gordon KL, Inagi R, Kurokawa K, Fujita T, Johnson RJ, Nangaku M**. Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats. [Online]. *J Am Soc Nephrol* 12: 2088–97, 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562407> [7 Feb. 2018].
411. **Shao SH, Orringer EP**. Sickle cell intrahepatic cholestasis: approach to a difficult problem. [Online]. *Am J Gastroenterol* 90: 2048–50, 1995.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7485022> [30 Apr. 2018].
412. **Sharpsteen JR, Powars D, Johnson C, Rogers ZR, Williams WD, Posch RJ**. Multisystem damage associated with tricephalic priapism in sickle cell disease. [Online]. *Am J Med* 94: 289–95, 1993.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8452153> [30 Apr. 2018].
413. **Sheng K, Shariff M, Hebbel RP**. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. [Online]. *Blood* 91: 3467–70, 1998.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9558406> [8 Feb. 2018].

414. **Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP.** Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 102: 2678–83, 2003.
415. **Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Hebbel RP.** Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 102: 2678–83, 2003.
416. **Shields GS, Lichtman HC, Messite J, Watson RJ.** Studies in sickle cell disease. I. Quantitative aspects of sickling in the newborn period. [Online]. *Pediatrics* 22: 309–18, 1958. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13578517> [24 Aug. 2017].
417. **Silva DGH, Belini Junior E, de Almeida EA, Bonini-Domingos CR.** Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radic Biol Med* 65: 1101–1109, 2013.
418. **Simon MC.** The Hypoxia Response Pathways - Hats Off! *N Engl J Med* 375: 1687–1689, 2016.
419. **Siqueira WC, Figueiredo MS, Cruz AA, Costa FF, Zago MA.** Conjunctival vessel abnormalities in sickle cell diseases: the influence of age and genotype. [Online]. *Acta Ophthalmol* 68: 515–8, 1990. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2275343> [23 Oct. 2017].
420. **Slavin ML, Barondes MJ.** Ischemic optic neuropathy in sickle cell disease. [Online]. *Am J Ophthalmol* 105: 212–3, 1988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3341439> [23 Oct. 2017].
421. **Sokolova A, Mararenko A, Rozin A, Podrumar A, Gotlieb V.** Hereditary

- persistence of hemoglobin F is protective against red cell sickling. A case report and brief review. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* (October 16, 2017). doi: 10.1016/j.hemonc.2017.09.003.
422. **Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP.** Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 101: 1899–1904, 1998.
 423. **Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP.** Circulating Activated Endothelial Cells in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med* 337: 1584–1590, 1997.
 424. **Somjee SS, Warriar RP, Thomson JL, Ory-Ascani J, Hempe JM.** Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 128: 112–118, 2005.
 425. **Sorette MP, Lavenant MG, Clark MR.** Ektacytometric measurement of sickle cell deformability as a continuous function of oxygen tension. [Online]. *Blood* 69: 316–23, 1987. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3790727> [11 Apr. 2018].
 426. **Spring FA, Parsons SF, Ortlepp S, Olsson ML, Sessions R, Brady RL, Anstee DJ.** Inter cellular adhesion molecule-4 binds alpha(4)beta(1) and alpha(V)-family integrins through novel integrin-binding mechanisms. [Online]. *Blood* 98: 458–66, 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435317> [19 Apr. 2018].
 427. **Sprinkle RH, Cole T, Smith S, Buchanan GR.** Acute chest syndrome in children with sickle cell disease. A retrospective analysis of 100 hospitalized cases. [Online]. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 8: 105–10, 1986. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3740365> [26 Apr. 2018].
 428. **Stein MR, Gay AJ.** Acute chorioretinal infarction in sickle cell trait. Report of a

- case. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 84: 485–90, 1970.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5492456> [2 May 2018].
429. **Steinberg MH, McCarthy WF, Castro O, Ballas SK, Armstrong FD, Smith W, Ataga K, Swerdlow P, Kutlar A, DeCastro L, Waclawiw MA, Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sick Cell Anemia and MSH Patients' Follow-Up.** The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. *Am J Hematol* 85: NA-NA, 2010.
430. **Steinberg MH NR.** Hemoglobins of the embryo, fetus, and adult. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall D, editors. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management (2nd ed). *Cambridge, United Kingdom Cambridge Univ. Press.* .
431. **Stevens TS, Busse B, Lee CB, Woolf MB, Galinos SO, Goldberg MF.** Sickling hemoglobinopathies; macular and perimacular vascular abnormalities. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 92: 455–63, 1974.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4433266> [2 May 2018].
432. **Stockman JA, Nigro MA, Mishkin MM, Oski FA.** Occlusion of large cerebral vessels in sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 287: 846–9, 1972.
433. **Streekstra GJ, Dobbe JGG, Hoekstra AG.** Quantification of the fraction poorly deformable red blood cells using ektacytometry. [Online]. *Opt Express* 18: 14173–82, 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20588551> [15 Mar. 2018].
434. **Strong H, Mitchell MJ, Goldstein-Leever A, Shook L, Malik P, Crosby LE.** Patient Perspectives on Gene Transfer Therapy for Sickle Cell Disease. *Adv Ther* 34: 2007–2021, 2017.

435. **Strouse JJ, Lanzkron S, Beach MC, Haywood C, Park H, Witkop C, Wilson RF, Bass EB, Segal JB.** Hydroxyurea for Sickle Cell Disease: A Systematic Review for Efficacy and Toxicity in Children. *Pediatrics* 122: 1332–1342, 2008.
436. **Stuart MJ, Nagel RL.** Sickle-cell disease. *Lancet* 364: 1343–1360, 2004.
437. **Styles LA, Vichinsky E.** Effects of a long-term transfusion regimen on sickle cell-related illnesses. [Online]. *J Pediatr* 125: 909–11, 1994.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996363> [14 Mar. 2018].
438. **Sugihara K, Sugihara T, Mohandas N, Hebbel RP.** Thrombospondin mediates adherence of CD36+ sickle reticulocytes to endothelial cells. [Online]. *Blood* 80: 2634–42, 1992. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384794> [30 Oct. 2017].
439. **Summarell CCG, Sheehan VA.** Original Research: Use of hydroxyurea and phlebotomy in pediatric patients with hemoglobin SC disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 241: 737–44, 2016.
440. **Swerlick RA, Eckman JR, Kumar A, Jeitler M, Wick TM.** Alpha 4 beta 1-integrin expression on sickle reticulocytes: vascular cell adhesion molecule-1-dependent binding to endothelium. [Online]. *Blood* 82: 1891–9, 1993.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7691241> [30 Oct. 2017].
441. **Sydenstricked VP, Mulherin WA, Houseal RW.** The AJDC archives. August 1923. Sickle cell anemia. Report of two cases in children, with necropsy in one case. By V. P. Sydenstricked [sic], W. A. Mulherin and R. W. Houseal. [Online]. *Am J Dis Child* 141: 612–5, 1987.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3321974> [9 Apr. 2018].
442. **Takada Y, Huang C, Hemler ME.** Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers. *Nature* 326: 607–9, 1987.

443. **Taylor JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH.** Chronic Hyper-Hemolysis in Sickle Cell Anemia: Association of Vascular Complications and Mortality with Less Frequent Vasoocclusive Pain. *PLoS One* 3: e2095, 2008.
444. **Telen MJ.** Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. [Online]. *Semin Hematol* 37: 130–42, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791882> [30 Oct. 2017].
445. **Thomas AN, Pattison C, Serjeant GR.** Causes of death in sickle-cell disease in Jamaica. [Online]. *Br Med J (Clin Res Ed)* 285: 633–5, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6819042> [14 Mar. 2018].
446. **Thomas JJ, Kutlar A, Scott DF, Lanclos KD.** Inhibition of gene expression by the Ggamma 5' flanking region of the Bantu beta(s) chromosome. [Online]. *Am J Hematol* 59: 51–6, 1998. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9723577> [17 Jan. 2018].
447. **Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources M-D, Mougénel D, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Etienne-Julan M, Hue O, Meiselman HJ, Connes P.** Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. *Haematologica* 94: 1060–5, 2009.
448. **Udani M, Zen Q, Cottman M, Leonard N, Jefferson S, Daymont C, Truskey G, Telen MJ.** Basal cell adhesion molecule/lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *J Clin Invest* 101: 2550–8, 1998.
449. **Usami S, Chien S, Bertles JF.** Deformability of sickle cells as studied by microsieving. [Online]. *J Lab Clin Med* 86: 274–9, 1975. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1151150> [11 Apr. 2018].

450. **Usmani A, Machado RF.** Vascular complications of sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc* 68: 205–221, 2018.
451. **Vekilov PG.** Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *Br J Haematol* 139: 173–184, 2007.
452. **Vichinsky E.** Consensus document for transfusion-related iron overload. [Online]. *Semin Hematol* 38: 2–4, 2001.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11206957> [14 Mar. 2018].
453. **Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, Abboud M, Moncino M, Ballas S, Ware R, Mancini EA.** Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 342: 1855–1865, 2000.
454. **Vichinsky EP, Neumayr LD, Gold JI, Weiner MW, Rule RR, Truran D, Kasten J, Eggleston B, Kesler K, McMahon L, Orringer EP, Harrington T, Kalinyak K, De Castro LM, Kutlar A, Rutherford CJ, Johnson C, Bessman JD, Jordan LB, Armstrong FD, Neuropsychological Dysfunction and Neuroimaging Adult Sickle Cell Anemia Study Group.** Neuropsychological dysfunction and neuroimaging abnormalities in neurologically intact adults with sickle cell anemia. *JAMA* 303: 1823–31, 2010.
455. **Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG.** Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. [Online]. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 456–63, 1997.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9402154> [8 Feb. 2018].
456. **Walder JA, Chatterjee R, Steck TL, Low PS, Musso GF, Kaiser ET, Rogers PH, Arnone A.** The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of band 3 of the human erythrocyte membrane. [Online]. *J Biol Chem* 259:

- 10238–46, 1984. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6469962> [30 Nov. 2017].
457. **Wali Y.** Sickie Cell Disease in Oman and HbS Oman: A Brief Review. *Hematol Transfus Int J* 4, 2017.
 458. **Wang WC.** The pathophysiology, prevention, and treatment of stroke in sickle cell disease. *Curr Opin Hematol* 14: 191–197, 2007.
 459. **Weatherall DJ.** No Title. *Nat Rev Genet* : 245–255, 2001.
 460. **Weber RE, Voelter W, Fago A, Echner H, Campanella E, Low PS.**
Modulation of red cell glycolysis: interactions between vertebrate hemoglobins and cytoplasmic domains of band 3 red cell membrane proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R454-64, 2004.
 461. **Welch RB, Goldberg MF.** Sickie-cell hemoglobin and its relation to fundus abnormality. [Online]. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 75: 353–62, 1966.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5903820> [2 May 2018].
 462. **West MS, Wethers D, Smith J, Steinberg M.** Laboratory profile of sickle cell disease: a cross-sectional analysis. The Cooperative Study of Sickie Cell Disease. [Online]. *J Clin Epidemiol* 45: 893–909, 1992.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624972> [29 Aug. 2018].
 463. **Westerman MP, Green D, Gilman-Sachs A, Beaman K, Freels S, Boggio L, Allen S, Zuckerman L, Schlegel R, Williamson P.** Antiphospholipid antibodies, proteins C and S, and coagulation changes in sickle cell disease. [Online]. *J Lab Clin Med* 134: 352–62, 1999.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521081> [5 Feb. 2018].
 464. **Willcox M, Björkman A, Brohult J, Pehrson PO, Rombo L, Bengtsson E.** A case-control study in northern Liberia of Plasmodium falciparum malaria in haemoglobin S and beta-thalassaemia traits. [Online]. *Ann Trop Med Parasitol*

- 77: 239–46, 1983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6354114> [17 Jan. 2018].
465. **Witkin AJ, Rogers AH, Ko TH, Fujimoto JG, Schuman JS, Duker JS.** Optical coherence tomography demonstration of macular infarction in sickle cell retinopathy. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* 124: 746–7, 2006.
 466. **Wood K, Russell J, Hebbel RP, Grange DN.** Differential Expression of E- and P-Selectin in the Microvasculature of Sickle Cell Transgenic Mice. *Microcirculation* 11: 377–385, 2004.
 467. **Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT.** Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 44: 1506–1528, 2008.
 468. **Wun T.** The Role of Inflammation and Leukocytes in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. *Hematology* 5: 403–412, 2000.
 469. **Wun T, Paglieroni T, Field CL, Welborn J, Cheung A, Walker NJ, Tablin F.** Platelet-erythrocyte adhesion in sickle cell disease. [Online]. *J Investig Med* 47: 121–7, 1999. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10198567> [29 Jan. 2018].
 470. **Wun T, Paglieroni T, Tablin F, Welborn J, Nelson K, Cheung A.** Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. [Online]. *J Lab Clin Med* 129: 507–16, 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9142047> [29 Jan. 2018].
 471. **Wyszynski DF, Baldwin CT, Cleves MA, Amirault Y, Nolan VG, Farrell JJ, Bisbee A, Kutlar A, Farrer LA, Steinberg MH.** Polymorphisms near a chromosome 6q QTL area are associated with modulation of fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia. [Online]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50: 23–33, 2004. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040424> [10 Jul. 2018].
 472. **Yung GL, Channick RN, Fedullo PF, Auger WR, Kerr KM, Jamieson SW,**

- Kapelanski DP, Moser KM.** Successful pulmonary thromboendarterectomy in two patients with sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1690–3, 1998.
473. **Zennadi R, Moeller BJ, Whalen EJ, Batchvarova M, Xu K, Shan S, Delahunty M, Dewhirst MW, Telen MJ.** Epinephrine-induced activation of LW-mediated sickle cell adhesion and vaso-occlusion in vivo. *Blood* 110: 2708–17, 2007.
474. **Zghal I, Zgolli H, Fekih O, Chebbi A, Bouguila H, Nacef L.** Analyse de la macula par OCT spectral domain dans la chirurgie du décollement de rétine rhégmato-gène. *J Fr Ophtalmol* 38: 181–192, 2015.