

Université de Montréal

**Évaluation des désordres cardiovasculaires chez des souris
 β -thalassémiques**

par

Ekathérina Stoyanova

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en Sciences biomédicales

Décembre, 2009

© Ekathérina Stoyanova, 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Évaluation des désordres cardiovasculaires chez des souris β -
thalassémiques

présentée par :

Ekathérina Stoyanova

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis Soulières
président-rapporteur

Guy Cloutier
directeur de recherche

Marie Trudel
codirectrice

Éric Thorin
membre du jury

Pedro D'Orléans-Juste
examineur externe

Jolanta Gutkowska
représentante du doyen

RÉSUMÉ

L'hémoglobine est une protéine contenue dans les globules rouges dont la principale fonction est le transport de l'oxygène. Chaque molécule d'hémoglobine est un tétramère constitué de deux paires de globines identiques de type α et β . La β -thalassémie est une maladie génétique hématopoïétique provenant de mutations du gène encodant l'hémoglobine. Ce désordre se caractérise par une diminution ou une absence totale de la synthèse de la chaîne β -globine résultant principalement en une anémie hémolytique sévère ainsi que des complications multisystémiques, telles que la splénomégalie, des déformations osseuses et une dysfonction hépatique et rénale.

Actuellement, les transfusions sanguines chroniques représentent le traitement standard des patients β -thalassémiques. Cette thérapie nécessite l'administration conjointe d'un traitement chélateur de fer puisqu'elle entraîne une accumulation pathologique du fer, considéré à ce jour comme la source principale des complications cardiovasculaires de la β -thalassémie. Néanmoins, malgré le traitement efficace de la surcharge de fer transfusionnelle, l'insuffisance cardiaque demeure encore la principale cause de mortalité chez les patients atteints de β -thalassémie. Cette observation indique possiblement la présence d'un mécanisme complémentaire dans le développement de la physiopathologie cardiaque β -thalassémique.

L'objectif du présent projet consistait donc à étudier les altérations cardiovasculaires de la β -thalassémie indépendamment de la surcharge de fer transfusionnelle. En utilisant un modèle murin non-transfusé de la β -thalassémie majeure, nous avons d'abord évalué *in vivo*, par méthode d'imagerie novatrice échographique à haute fréquence, les propriétés hémodynamiques vasculaires. Nos résultats d'index de Pourcelot ainsi que de résistance vasculaire périphérique totale ont démontré une perturbation de l'écoulement microcirculatoire chez les souris β -thalassémiques non-transfusées. Subséquemment, nous avons étudié la fonction endothéliale de régulation du tonus vasculaire de vaisseaux mésentériques isolés. Nos résultats ont révélé un dysfonctionnement de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium chez les souris β -thalassémiques malgré une augmentation de l'expression de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote ainsi qu'un remodelage de

la carotide commune caractérisé par un épaissement de la paroi vasculaire. Finalement, notre étude échocardiographique de la fonction et la morphologie cardiaque a montré, chez les souris β -thalassémiques, le développement d'une hypertrophie et une dysfonction ventriculaire gauche en l'absence de transfusions sanguines chroniques ou de dépôts directs de fer dans le myocarde.

L'ensemble des résultats présentés dans le cadre de cette thèse indique la présence d'une pathologie cardiovasculaire chez les souris β -thalassémiques non-transfusés. Nos travaux permettent de proposer un mécanisme de la pathophysiologie cardiovasculaire β -thalassémique, indépendant de la charge de fer transfusionnelle, impliquant les effets compensatoires d'une anémie chronique combinés à une vasculopathie complexe initiée par les érythrocytes endommagés et l'hémolyse intravasculaire.

Mots clés : β -thalassémie, hémoglobine, globules rouges, surcharge de fer, fonction endothéliale vasculaire, physiologie cardiaque, échographie, hémodynamique vasculaire.

ABSTRACT

Hemoglobin is the major protein in red blood cells and is responsible of the oxygen transport. Each hemoglobin molecule is a tetramer consisting of two identical α - and β -globin subunits. β -thalassemia is a genetic hematopoietic disease caused by mutations in hemoglobin genes. This disorder is characterized by a decrease or absence of production of β -globin chain leading mainly to a severe hemolytic anemia and several systemic manifestations, including splenomegaly, skeletal deformities as well as hepatic and renal dysfunctions.

Chronic blood transfusions remain the standard treatment for β -thalassemic patients. This therapy requires iron chelating management since it leads to pathological iron accumulation which is currently considered the main cause of cardiovascular complications of β -thalassemia. However, despite adequate control of transfusional iron loading, heart failure remains the leading cause of mortality in β -thalassemia. This issue is possibly indicative of additional pathogenic mechanisms underlying the development of the β -thalassemic cardiac pathology.

The objective of the present research project was to study cardiovascular alterations of β -thalassemia independently of transfusional iron overloading. Using an untransfused murine model of β -thalassemia major, we have evaluated *in vivo*, by non-invasive high-frequency ultrasound imaging, vascular hemodynamic properties. Our results of Pourcelot indices and total peripheral vascular resistance have shown microcirculatory flow disturbances in untransfused β -thalassemic mice. Consequently, we have studied *ex vivo* the endothelial vasomotor function in isolated mesenteric arterioles. Our findings have pointed out endothelium-dependent vasodilator dysfunction in β -thalassemic mice despite increased expression of nitric oxide synthase, as well as remodeling of the common carotid artery wall. Lastly, our echocardiography studies of heart morphology and function in β -thalassemic mice have demonstrated the development of left ventricle hypertrophy and dysfunction in the absence of chronic blood transfusions or direct myocardial iron deposits.

In conclusion, findings presented in this thesis have demonstrated for the first time development of severe cardiovascular complications in untransfused β -

thalassemic mice. Based on our results, we have proposed a novel mechanism, independent of direct myocardial iron deposition, responsible for the cardiovascular complications in β -thalassemia. This model combines compensatory effects of chronic anemia with a complex vasculopathy initiated by abnormal erythrocytes and intravascular hemolysis.

Keywords: β -thalassemia, hemoglobin, red blood cells, iron overload, vascular endothelial function, cardiac physiology, ultrasonography, vascular hemodynamics.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des Tableaux.....	xiii
Liste des Figures.....	xiv
Liste des abréviations	xix
Remerciements	xxiii
Avant-propos.....	xxviii
CHAPITRE 1: Introduction	1
1.1 Notions hématologiques.....	1
1.1.1 Globules rouges	2
1.1.2 Hématopoïèse et érythropoïèse	3
1.1.3 Hémoglobine	6
1.1.4 β -thalassémie	6
1.1.4.1 Classification et génétique.....	8
1.1.4.2 Distribution mondiale et génétique des populations	9
1.1.4.3 Pathophysiologie et manifestations cliniques.....	10
1.1.4.3.1 Anémie	11
1.1.4.3.2 Modification osseuse.....	12
1.1.4.3.3 Splénomégalie	13
1.1.4.3.4 Surcharge de fer	13
1.1.4.4 Traitements	14
1.1.4.4.1 Transfusion sanguine	14
1.1.4.4.2 Traitement chélateur du fer.....	15
1.1.4.4.3 Transplantation de moelle osseuse	16
1.1.4.4.4 Approches expérimentales	16
1.1.4.5 Modèles de souris β -thalassémiques.....	17
1.2 Physiologie cardiovasculaire.....	19

1.2.1	Physiologie vasculaire.....	20
1.2.1.1	Structure artérielle	21
1.2.1.2	Hémodynamique et propriétés vasculaires mécaniques	23
1.2.1.2.1	Résistance	24
1.2.1.2.2	Pression.....	26
1.2.1.2.2.1	Contraintes et déformations circonférentielles.....	28
1.2.1.2.3	Compliance.....	31
1.2.2	Physiologie de l'endothélium vasculaire	31
1.2.2.1	Fonctions de l'endothélium vasculaire.....	32
1.2.2.1.1	Régulation du tonus vasomoteur	32
1.2.2.1.2	Contrôle de la thrombose et de l'hémostase	33
1.2.2.1.3	Régulation de l'inflammation.....	33
1.2.2.1.4	Contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses	34
1.2.2.2	Substances libérées par l'endothélium vasculaire	34
1.2.2.2.1	Monoxyde d'azote (NO)	34
1.2.2.2.2	Prostacycline.....	37
1.2.2.2.3	Facteurs hyperpolarisants d'origine endothéliale (EDHF).....	37
1.2.2.2.4	Endothéline-1	38
1.2.2.3	Endothélium et remodelage vasculaire	38
1.2.2.4	Dysfonction endothéliale	39
1.2.2.4.1	Mécanismes de dysfonction endothéliale.....	40
1.2.2.4.2	Méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale	41
1.2.3	Physiologie cardiaque	43
1.2.3.1	Débit cardiaque	44
1.2.3.1.1	Précharge	44
1.2.3.1.2	Post-charge	45
1.2.3.1.3	État inotrope	45
1.2.3.1.4	Fréquence cardiaque	46
1.2.3.2	Remodelage cardiaque	46
1.2.3.2.1	Mécanismes moléculaires de l'hypertrophie cardiaque	48
1.2.3.2.2	Transition entre l'hypertrophie cardiaque compensée et l'insuffisance cardiaque.....	50

1.2.3.3 Anémie chronique, mécanismes compensatoires et remodelage cardiaque	51
1.3 Complications cardiovasculaires de la β -thalassémie	54
1.3.1 Occlusion vasculaire et évènements thromboemboliques	54
1.3.2 Dysfonction endothéliale.....	57
1.3.3 Pathologie cardiaque.....	58
1.4 Objectifs et descriptif de la thèse	60
CHAPITRE 2: Article 1.....	62
Characterization of circulatory disorders in β -thalassemic mice by non-invasive ultrasound biomicroscopy.....	62
2.1 Avant-propos	62
2.2 Abstract.....	63
2.3 Introduction	64
2.4 Methods	66
2.4.1 Mouse strains.....	66
2.4.2 Fetal liver transplantation	66
2.4.3 Animal preparation.....	67
2.4.4 Echographic examinations	67
2.4.5 Hemodynamic variables measured non-invasively	68
2.4.5.1 Pourcelot index (PI).....	68
2.4.5.2 Stroke volume, cardiac output and cardiac index.....	68
2.4.5.3 Total peripheral vascular resistance (TPVR).....	69
2.4.6 Variability analyses.....	69
2.4.7 Statistical analyses	70
2.5 Results	70
2.5.1 Production of homo- β thal mice by fetal liver cell transplants	70
2.5.2 Increase of global vascular resistance in β -thalassemic mice.....	72
2.5.3 Impairment of vascular properties in homo- β thal mice	73
2.5.4 PI measurements are reproducible with low interpretive variabilities	75

2.6 Discussion	76
2.7 Appendix	79
2.7.1 PI: Theoretical Background	79
2.8 Acknowledgements	80
CHAPITRE 3: Article 2.....	81
Endothelial dysfunction and vascular remodeling in β -thalassemic mice.....	81
3.1 Avant-propos	81
3.2 Abstract.....	84
3.3 Introduction	84
3.4 Methods	86
3.4.1 Experimental animals.....	86
3.4.2 Functional studies of resistance arteries	87
3.4.3 Mechanical studies of carotid arteries	88
3.4.4 Protein expression analysis.....	88
3.4.5 Histopathology analysis	89
3.4.6 Statistical analyses	90
3.5 Results	90
3.5.1 Vasomotor responses in mesenteric arteries.....	91
3.5.2 Aortic eNOS protein expression.....	92
3.5.3 Carotid artery vascular mechanics	93
3.5.4 Carotid artery composition.....	96
3.6 Discussion	96
CHAPITRE 4: Article 3.....	101
β -thalassemia induces cardiac dysfunction and remodeling independently of myocardial iron loading.....	101
4.1 Avant-propos	101
4.2 Abstract.....	103
4.3 Introduction	103

4.4 Design and Methods	105
4.4.1 Mouse strains.....	105
4.4.2 Production of bone marrow transplanted mice	106
4.4.3 Echocardiography examinations	106
4.4.4 Hematological analysis	108
4.4.5 Histopathological examinations.....	108
4.4.6 Statistical analyses	108
4.5 Results	109
4.5.1 Homo- β thal mouse model phenotype.....	109
4.5.2 Distinct histopathology in homo- β thal organs.....	110
4.5.3 Early onset of left ventricle structural alterations in homo- β thal mice.....	114
4.5.4 Progressive cardiovascular impairment in homo- β thal mice.....	116
4.6 Discussion	118
4.7 Acknowledgements	121
4.8 Supplemental results	122
CHAPITRE 5: Article 4.....	124
Irradiation-induced long-term cardiovascular complications in mice: insights on hematopoietic transplantation	124
5.1 Avant-propos	124
5.2 Abstract.....	126
5.3 Introduction	127
5.4 Methods	128
5.4.1 Mouse strains.....	128
5.4.2 Production of irradiated mice	128
5.4.3 Non invasive echocardiography examinations of cardiac morphology and function.....	129
5.4.3.1 Cardiac structural and functional M-mode measurements	129
5.4.3.2 Doppler measurements of cardiac output and vascular hemodynamics	130
5.4.4 <i>Ex vivo</i> vascular function studies of resistance arterioles	131

5.4.5 <i>Ex vivo</i> mechanical studies of carotid arteries.....	132
5.4.6 Hematological analysis	133
5.4.7 Histopathological examinations.....	133
5.4.8 Statistical analysis	134
5.5 Results	134
5.5.1 Generation of irradiated mice.....	134
5.5.2 Echocardiographic assessment of cardiac structure and function.....	135
5.5.3 Echographic assessment of vascular hemodynamics	137
5.5.4 Histopathology analysis	139
5.5.5 Vascular function studies in mesenteric resistance arterioles.....	141
5.5.6 Carotid artery structure and mechanical properties.....	143
5.6 Discussion	146
5.7 Supplemental results	150
CHAPITRE 6: Discussion	151
6.1 Effets cardiovasculaires tardifs de l'irradiation corporelle totale	152
6.1.1 β -thalassémie : une condition favorisant des effets protecteurs contre les dommages tissulaires de l'irradiation?	154
6.2 Complications vasculaires de la β -thalassémie	157
6.2.1 Dysfonctions endothéliales dans la β -thalassémie	159
6.2.2 Désordres circulatoires dans la β -thalassémie.....	160
6.3 β -thalassémie et pathologie cardiaque	163
6.4 Perspectives et conclusions.....	166
Références.....	169
Annexe I.....	xxx
Pertinence du modèle murin homo- β thal	xxx
Annexe II	xxxiii
Résultats comparatifs entre groupes de souris non-irradiées et irradiées	xxxiii

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau I-I</i> : Principales substances synthétisées par l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie (traduit de De Caterina <i>et al.</i> , 2007 ⁽⁵⁷⁾).....	35
<i>Table II-I</i> : Physiological and echographic parameters.....	72
<i>Table II-II</i> : Intra- and inter-observer variabilities of echographic measurements.....	76
<i>Table II-III</i> : Intersession variability of the echographic parameters.....	78
<i>Table III-I</i> : Characteristics of 14-month old animals.....	91
<i>Table IV-I</i> : Hematologic parameters in 15-month old mice.....	110
<i>Table IV-II</i> : (A) Organ-to-body weight ratios in 15 month-old control and homo- β thal mice (B) Semiquantification of iron deposits and collagen content in 15 month-old control, homo- β thal and Hbbth-1/th-1 mice.....	111
<i>Tableau IV-III, Supplementary Table SI</i> : Hematologic parameters in C57Bl6J and Hbb ^{th-1/th-1} mice.....	122
<i>Table V-I</i> : Hematologic parameters in 15-month old non-irradiated and irradiated mice.....	135
<i>Table V-II</i> : Body weight and organ weights in 15 month-old non-irradiated and irradiated mice.....	139
<i>Table V-III</i> : Histopathologic assessment in 15 month-old non-irradiated and irradiated mice.....	141
<i>Supplementary Table V-IV</i> : Echocardiographic results in 6, 10 and 14 month-old non-irradiated and irradiated mice.....	150
<i>Tableau A-I</i> : Comparaison des paramètres cardiovasculaires de souris Hbb ^{th-1/th-1} (non-transplantées, n = 3) et homo- β thal (transplantées, n = 17).	xxxix
<i>Tableau A-II</i> : Comparaison des résultats histopathologiques obtenus chez des souris Hbb ^{th-1/th-1} (non-transplantées) et homo- β thal (transplantées).	xxxix
<i>Tableau A-III</i> : Comparaison des résultats histopathologiques obtenus chez des souris contrôles et β -thalassémiques ayant ou non subi l'irradiation corporelle totale.....	xxxix

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1:** A) Microscopie électronique du sang, montrant des érythrocytes (rouge), des plaquettes (jaune) et des leucocytes (bleu) (adapté d'une photographie publique provenant du National Cancer Institute, photo : Bruce Wetzel), B) Organisation du sang en couches dans un échantillon additionné d'anticoagulant et centrifugé.....2
- Figure 1.2:** Photographie d'un érythrocyte montrant en microscopie optique (gauche) et électronique (droite) la morphologie cellulaire de profil et de face (extrait de Young *et al.*, 2006 ⁽³⁾).....3
- Figure 1.3:** Sites d'érythropoïèse durant le développement humain (adapté de Weatherall, 2001 ⁽⁵⁾).....3
- Figure 1.4:** Différenciation des cellules hématopoïétiques (adapté de Kumar *et al.*, 2005 ⁽⁷⁾). Les CFU (« colony forming unit ») ou cellules progénitrices d'une lignée particulière sont des cellules souches spécialisées pouvant donner naissance à des colonies de cellules différenciées. BFU-E, « burst forming unit erythrocyte ».....5
- Figure 1.5:** Molécule d'hémoglobine (adapté de Sherwood 1997 ⁽²⁾).6
- Figure 1.6:** A) Chaînes de globine produites au cours du développement de l'homme, de la conception à l'âge adulte (adapté de Giardina *et al.*, 2008 ⁽¹¹⁾). B) Composition des hémoglobines selon le stade de développement.7
- Figure 1.7:** Morphologie des globules rouges chez un individu sain (A) et chez un patient atteint de thalassémie majeure (B).(extrait de Young *et al.*, 2006 ⁽³⁾).....9
- Figure 1.8:** Distribution mondiale de la β -thalassémie (extrait de Weatherall *et al.*, 2001 ⁽⁹⁾).10
- Figure 1.9:** Résumé des conséquences de production excessive de chaînes d' α -globine (adapté de Olivieri, 1999 ⁽¹⁵⁾)11
- Figure 1.10:** Probabilité de survie, après la première décennie de vie, (A) et de survie sans complications (C), par cohorte de date de naissance, chez des patients italiens atteints de β -thalassémie majeure (adapté de Borgna-Pignatti *et al.*, 2004 ⁽²⁴⁾). B) Comparaison de l'espérance de vie chez des patients britanniques atteints de β -thalassémie majeure étant en vie au début des années 1970, 1980, 1990 et 2000 (adapté de Modell *et al.*, 2008 ⁽²⁵⁾).....14
- Figure 1.11:** Représentation schématique simplifiée du locus de la β -globine chez la souris. A) Haplotype Hbb^s. B) Haplotype Hbb^d.18
- Figure 1.12:** Structure cardiaque et direction de la circulation sanguine dans les chambres cardiaques (figure adaptée provenant de <http://www.nhlbi.nih.gov>).....19
- Figure 1.13:** Schéma de l'organisation du système cardiovasculaire (adapté de Guyton *et al.*, 2001 ⁽¹⁾).....20

Figure 1.14: Paroi vasculaire. A) Représentation schématique d’une coupe transverse de paroi artérielle. B) Coupe histologique montrant une portion d’artère (A) et d’une veine adjacente (V) (adapté de Kumar *et al.*, 2005 ⁽⁷⁾).22

Figure 1.15: Proportions d’élastine, de muscle lisse et de collagène selon le type de vaisseau sanguin (adapté de Li, 2000 et Burton, 1954 ^(44; 45)).23

Figure 1.16: Viscosité sanguine apparente (η_r) en fonction du taux de cisaillement (γ_0) (adapté de Chien, 1975 ⁽⁴⁷⁾).26

Figure 1.17: Pression artérielle dans la circulation systémique (adapté de résultats de Burton, 1951 ⁽⁵⁰⁾ ; figure tirée de Porth, 2002 ⁽⁵¹⁾).27

Figure 1.18: Contrainte pariétale et pression dans un vaisseau sanguin cylindrique (adapté de Levick, 2003 ⁽⁴²⁾).29

Figure 1.19: Modification de la morphologie des cellules endothéliales en fonction des forces de cisaillement exercées par l’écoulement sanguin (extrait de Malek *et al.*, 1999 ⁽⁵⁸⁾).32

Figure 1.20: Représentation schématique des voies de signalisation du monoxyde d’azote (NO).36

Figure 1.21: Remodelage vasculaire en fonction du stimuli appliqué (adapté de Gibbons *et al.*, 1994 ⁽⁷⁴⁾).39

Figure 1.22: Artériographie pour l’évaluation de la fonction endothéliale de vaisseaux sanguins pressurisés.43

Figure 1.23: Structure du sarcomère (adapté de Fuster *et al.*, 2008 ⁽⁴¹⁾).44

Figure 1.24: Hypertrophie cardiaque et morphologie des cardiomyocytes (A) (adapté de Hunter *et al.*, 1999 ⁽⁸⁷⁾) ainsi que de l’ensemble de la paroi ventriculaire (B) (adapté de Jessup *et al.*, 2003 ⁽⁸⁹⁾).48

Figure 1.25: Voies de signalisation impliquées dans l’hypertrophie cardiaque (adapté de Olson, 2004 ⁽⁹³⁾).50

Figure 1.26: Figure illustrant la relation entre le taux d’hémoglobine et l’index cardiaque au repos chez des patients atteints d’anémie ferriprive (carence en fer) ou perniciose (ligne continue) ou d’anémie falciforme (ligne discontinue) (adapté de Varat *et al.* 1972 ⁽¹⁰²⁾).52

Figure 1.27: Relation schématisée entre la masse du ventricule gauche et l’hématocrite dans la population saine (adapté de Schunkert *et al.* ⁽¹⁰⁶⁾).53

Figure 1.28: Modèle du processus d’obstruction vasculaire thalassémique (adapté de Eldor *et al.*, 2002 ⁽¹¹³⁾).55

Figure 1.29: Agrégats érythrocytaires observées chez des sujets témoins (I) et des patients β -thalassémiques (II) à grossissement élevé (A) ou faible (B) (extrait de Chen *et al.*, 1996 ⁽⁴⁸⁾).56

Figure 1.30: Comparaison des valeurs de débit cardiaque chez des patients atteints de β -thalassémie majeure (\circ) ^(124; 129; 131; 132; 138-141) ou intermédiaire (\blacksquare) ^(129; 138; 140) avec celles obtenues chez des patients atteints d’anémie ferriprive (carence en fer) ou perniciose

(ligne continue) ou d'anémie falciforme (ligne discontinue) (adapté de Varat <i>et al.</i> 1972 ⁽¹⁰²⁾)	59
Figure 2.1: Analysis of engraftment of fetal liver transplanted mice	71
Figure 2.2: Tail-cuff blood pressure (TCP, mmHg; A), heart rate (HR, beat/min; B), normalized cardiac output (CI, ml min ⁻¹ g ⁻¹ ; C), and total peripheral vascular resistance (TPVR, mmHg min ml ⁻¹ ; D) in homo- β thal (n = 17, hatched bars) and control (n = 19, open bars) mice.....	73
Figure 2.3: Doppler display of common carotid artery velocity waveforms of a wildtype mouse showing the systolic (S) and end-diastolic (D) velocities	74
Figure 2.4: Ultrasonographic imaging of the carotid artery. A: B-mode image showing the common carotid artery (CC) and the internal (IC) and external (EC) carotid arteries in longitudinal view. The Doppler sample volume (white arrow) is positioned within the CC artery before the bifurcation. B and C: Doppler flow velocity waveforms recorded in the CC artery of a β -thalassemic mouse (B) and same measures in a wildtype control mouse (C)	75
Figure 2.5: Doppler Pourcelot indexes (PI, no units) in the common carotid artery and abdominal aorta of homo- β thal (n = 17, shaded bars) and control (n = 19, open bars) mice	77
Figure 3.1: Vasoconstrictive response of mesenteric resistance arterioles to norepinephrine (NE) in 14-month old BMT control (○; n = 10) and homo- β thal (●; n = 9) mice.....	91
Figure 3.2: Vasodilatory responses of mesenteric resistance arterioles to acetylcholine (ACh) in the absence (A) or presence of L-NAME (B), or to sodium nitroprusside (SNP, C) in BMT control (○; n = 10) and homo- β thal (●; n = 9) mice.....	92
Figure 3.3: eNOS protein expression in aortas of BMT control and homo- β thal mice. (A) Representative Western blot and (B) densitometric analysis of the eNOS protein expression (n = 6 mice per group)	93
Figure 3.4: Intraluminal diameter (A), external diameter (B), circumferential strain (C), circumferential stress (D), stress-strain relationship (E) and incremental distensibility in BMT control (○; n = 13) and homo- β thal (●; n = 11) mice. The wall cross-sectional area (CSA) at 80 mmHg is presented as an insert in panel B.....	94
Figure 3.5: Composition of left common carotid arteries in BMT control (open bars) and homo- β thal mice (closed bars, n = 8 per group).....	95
Figure 4.1: Histopathologic analysis of iron deposition in kidney (A) and spleen (B) tissue sections of control and homo- β thal mice stained with Prussian blue and a nuclear fast red counterstain.	112
Figure 4.2: Histological analysis of control (A, C, E) and homo- β thal mouse hearts (B, D, F). Representative sections were stained hematoxylin-eosin for macroscopic morphological phenotype (A, B), Sirius red for collagen evaluation (C, D) and with Prussian blue with counterstaining of nuclear fast red for iron analysis (E, F)	113
Figure 4.3: Longitudinal measurements in control (open bars) and homo- β thal mice (filled bars). Body weight (A) and echocardiographic evaluation of LV mass (B), and	

detailed echocardiographic measurements (C) at ages 6, 10 and 14 months in homo- β thal (n=23, 22, 19) and control (n=18) mice.....	115
Figure 4.4: Longitudinal measurements of cardiac index (CI) (A), tail-cuff evaluated mean arterial pressure (MAP) (B), left ventricle fractional shortening (FS) (C), left ventricle ejection fraction (EF) (D) and Doppler Pourcelot indices (PI, no units) in the common carotid artery (E) in 6, 10 and 14 month-old control (open bars) and homo- β thal mice (filled bars).....	117
Figure 4.5: Supplementary Figure S1: Representative transthoracic M-mode tracings of the left ventricle in 14 month-old BMT control (left) and homo- β thal (right) mice. LVD is the left ventricular diameter in diastole (white line).	122
Figure 4.6: Longitudinal measurements of total peripheral vascular resistance (TPVR) in 6, 10 and 14 month-old BMT control (open bars) and homo- β thal mice (filled bars).	123
Figure 5.1: Longitudinal measurements of body weight (A), and echocardiographic evaluation of left ventricle (LV) mass (B) and LV mass normalized to BW (C) in non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice	136
Figure 5.2: Longitudinal measurements of cardiac function in non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice.....	137
Figure 5.3: Longitudinal hemodynamic measurements of tail-cuff evaluated mean arterial pressure (MAP) (A) and echocardiographic assessment of total peripheral vascular resistance (TPVR) (B) and Doppler Pourcelot index (PI, no units) in 6, 10 and 14 month-old non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice.....	138
Figure 5.4: Histological analysis of non-irradiated and irradiated mouse.....	140
Figure 5.5: Vasoconstrictive response of mesenteric resistance arterioles to norepinephrine (NE) in 14-month old non-irradiated (\blacklozenge ; n = 8) and irradiated (\circ ; n = 10) mice.	142
Figure 5.6: Vasodilatory responses of mesenteric resistance arterioles to acetylcholine (ACh) in the absence (A) or presence of L-NAME (B), or to sodium nitroprusside (SNP) (C) in non-irradiated (\blacklozenge ; n = 8) and irradiated (\circ ; n = 10) mice.....	142
Figure 5.7: Intraluminal diameter (A), external diameter (B), circumferential strain-intraluminal pressure (C) circumferential stress-intraluminal pressure (D) stress-strain (E) and incremental distensibility-intraluminal pressure curves in non-irradiated (\blacklozenge ; n = 9) and irradiated (\circ ; n = 13) mice.....	144
Figure 5.8: Composition of common carotid arteries in non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice (n=8 for both groups).	145
Figure 6.1: Schéma modélisant le développement des lésions radio-induites atrophiques tissulaires (A) et l'effet possiblement radio-protecteur des tissus lors de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) β -thalassémiques (β -thal) (B)....	156
Figure 6.2: Résumé des complications vasculaires de la β -thalassémie.....	162
Figure 6.3: Modèle récapitulatif du développement des désordres cardiaques de la β -thalassémie	165

Annexe II:

Figure 6.4: Comparaison de la résistance périphérique totale (TPVR) chez des souris contrôles non-irradiées (C57Bl/6J, n = 19), irradiées (n = 18) et homo- β thal (β -thalassémiques provenant d'une greffe de CSH combinée à l'irradiation) (n = 19) âgées de 14 mois xxxiv

Figure 6.5: Comparaison de l'index de résistance de Pourcelot (PI) chez des souris contrôles non-irradiées (C57Bl/6J, n = 19), irradiées (n = 18) et homo- β thal (β -thalassémiques provenant d'une greffe de CSH combinée à l'irradiation) (n = 19) âgées de 14 mois. xxxiv

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ACh	acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , analyse de la variance
AoD	diamètre aortique
AP-1	<i>activator protein-1</i> , protéine activatrice 1
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
β	<i>slope of ET-to-stress relationship</i>
BAEC	<i>bovine aortic endothelial cells</i> , cellules endothéliales aortiques bovines
BFU-E	<i>burst forming unit erythrocyte</i>
BH ₄	tétrahydrobioptérine
BM	<i>bone marrow</i> , moelle osseuse
BMT	<i>bone marrow transplanted control mouse</i> , souris contrôle générée par greffe de cellules souche hématopoïétiques
BW	<i>body weight</i> , poids corporel
C	compliance vasculaire
°C	degré Celsius
CaCl ₂	chlorure de calcium
CFU	<i>colony forming unit</i>
cGy	centi-Gray
CI	<i>cardiac index</i> , index cardiaque
cm	centimètres
CSA	<i>cross-sectional area</i> , surface de section transversale
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CO	<i>cardiac output</i> , débit cardiaque
CO ₂	dioxyde de carbone
D	diamètre vasculaire interne observé
D ₀	diamètre du vaisseau rétracté
2,3-DPG	2, 3-diphosphoglycérate
ε	déformation de la paroi vasculaire
E	module élastique de Young
E _{inc}	module élastique incrémental
EC	<i>effect concentration</i> , concentration effective
ECG	électrocardiogramme
EDHF	facteur hyperpolarisant d'origine endothéliale
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
EGTA	acide éthylène glycol tétraacétique
eNOS	NO synthase endothéliale
EPO	érythropoïétine
ERK	<i>extracellular signal regulated kinases</i>
ET	<i>tangential elastic modulus</i>

ET-1	endothéline-1
Fe ³⁺	fer ferrique
fL	femtolitre
FS	<i>fractional shortening</i> , fraction de raccourcissement
g	gramme
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
<i>Gpi1</i>	<i>glucose phosphate isomerase isotype 1</i>
GR	globule rouge
Gy	Gray
<i>b</i>	épaisseur de la paroi
Hb	hémoglobine
HbF	hémoglobine fœtale
HCl	acide chlorhydrique
Hct	hématocrite
HLA	système majeur d'histocompatibilité humain
Homo-βthal	modèle de souris β-thalassémique homozygote généré par transplantation de CSH
HR	heart rate
HSC	<i>hematopoietic stem cells</i> , cellules souches hématopoïétiques
Hz	hertz
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> , molécule d'adhésion intercellulaire
IL	interleukine
IVS	<i>interventricular septum</i> , septum interventriculaire
ΔP	variation de pression transmurale
ΔV	variation de volume sanguin
dl	décilitre
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> , facteur de croissance semblable à l'insuline
IgG	immunoglobulines G
KCl	chlorure de potassium
kg	kilogramme
KH ₂ PO ₄	dihydrogénophosphate de potassium
L	litre
<i>L</i>	longueur du vaisseau
L-NAME	L-nitro-arginine méthylester
L-NMMA	N-monométhyl L-arginine
LPS	lipopolysaccharides
LV	<i>left ventricle</i> , ventricule gauche
LVDd	<i>diastolic left ventricle internal diameter</i> , diamètre diastolique interne du ventricule gauche
LVDs	<i>systolic left ventricle internal diameter</i> , diamètre systolique interne du ventricule gauche
MAP	<i>mean aortic pressure</i> , pression aortique moyenne
MAP kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBP	<i>mean aortic blood pressure</i> , pression sanguine aortique moyenne
MCH	<i>mean corpuscular hemoglobin</i> , teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>

MCSA	<i>media CSA</i> , surface de section transversale de la média
MCV	<i>mean corpuscular volume</i> , volume globulaire moyen
mg	milligramme
MgSO ₄	sulfate de magnésium
MHz	mégahertz
min	minute
mL	millilitre
μm	micromètre
mm	millimètre
mmHg	millimètre de mercure
mo	<i>month</i> , mois
η	viscosité sanguine
N ₂	azote moléculaire
NaCl	chlorure de sodium
NADH	nicotinamide-adénine-dinucléotide-hydrogéné
NADPH	nicotinamide adénine diphosphate
NaHCO ₃	hydrogénocarbonate de sodium
NE	noradrénaline
NO	monoxyde d'azote
NO ₃	nitrate
NOS	NO synthase
NFκB	nuclear factor kappa B
O ₂	dioxygène
O ₂ ⁻	anion superoxyde
<i>P</i>	pression
<i>P_e</i>	pression à l'extérieur du vaisseau
<i>P_i</i>	pression intraluminale
<i>P_T</i>	pression transmurale
PAI	inhibiteur des activateurs du plasminogène
PBST	<i>phosphate buffered saline with 0.1% Tween 20</i>
PC	phosphatidylcholine
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> , facteur de croissance dérivé des plaquettes
PE	phosphatidyléthanolamine
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i> , molécule d'adhésion cellulaire plaquette–cellule endothéliale
PGI ₂	Prostacycline
PI	index de Pourcelot
PI3	phosphoinositide-3
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PS	phosphatidylsérine
PSS	<i>physiological saline solution</i> , solution saline physiologique
PW	<i>posterior wall</i> , paroi postérieure
Q	débit
<i>r</i>	rayon du vaisseau
R	résistance
RBC	red blood cells
Retics	réticulocytes

ROS	<i>reactive oxygen species</i> , espèce réactive de l'oxygène
s	seconde
σ	contrainte circonférentielle pariétale
SDS-PAGE	électrophorèse de polyacrylamide en présence de sulfate de sodium dodécylque
SE	<i>standard error</i> , erreur-type
SEM	<i>standard error of the mean</i> , erreur-type
SNP	nitroprussiate de sodium
SOD	superoxydes dismutases
SV	<i>stroke volume</i> , volume d'éjection systolique
TBI	<i>total body irradiation</i> , irradiation corporelle totale
TCP	<i>tail-cuff pressure</i>
TFPI	inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
TGF- β	facteur de croissance transformant bêta
TNF- α	facteur de nécrose tumorale alpha
tPA	activateur du plasminogène tissulaire
TPVR	<i>total peripheral vascular resistance</i> , résistance vasculaire périphérique totale
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i> , molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VTI	<i>velocity-time integral</i> , intégrale temps-vitesse
W	<i>wall thickness</i> , épaisseur de la paroi vasculaire
wk	<i>week</i> , semaine
WT	<i>wildtype</i>
XO	xanthine oxydase

REMERCIEMENTS

Il n'y a rien comme la douleur du 21^e km de course d'un demi-marathon pour faire oublier celle de l'écriture des dernières pages d'une thèse de doctorat.

Je pourrais commencer cette section par vous donner une métaphore un peu banale comme « Les études doctorales sont comme les montagnes russes... des hauts, des bas, etc. », mais je crois que vous vous en doutiez certainement déjà.

Je commencerai plutôt par partager un des moments les plus marquants de mon doctorat. C'était un moment où rien n'allait plus, découragée et désespérée, j'allais voir mon directeur de recherches, Guy Cloutier. Ce dernier, ne pouvant pas toujours apporter de solution à mes problèmes, m'a alors fortement suggéré de me ressaisir et de trouver une solution par moi-même, de me débrouiller en quelque sorte toute seule... Moment marquant et je m'en souviendrai longtemps, moment marquant non parce que je n'avais jamais pensé à cette possibilité, non parce que je n'avais jamais fait auparavant preuve de débrouillardise, uniquement parce qu'à ce moment-là ces paroles venant de la bouche de mon directeur de recherches, bien qu'étant franches et bienveillantes, étaient probablement les dernières que j'aurais voulu entendre. Pourtant ces paroles reflètent certainement l'aventure qui m'a permis d'arriver à l'écriture de cette thèse. Mais dans ce souci de la débrouillardise, il en va de soi que plusieurs personnes m'ont donné un sacré coup de main (et parfois de pied). C'est à eux que je dédie cette section de remerciements.



Je ne pourrais faire autrement que de commencer par remercier mes chers parents, Nadia et Latchesar. Je leur dois non seulement le fait d'être ici, sur cette terre, mais également ici, au Québec, au Canada, en Amérique du Nord, et puis aussi ici, devant cet ordinateur... Mes parents qui m'ont toujours supporté de leurs encouragements, de leurs conseils, qui m'ont transmis cette envie de me surpasser, de voir plus loin... « Sky is the limit »... Je remercie mon père de m'avoir transmis l'amour de la course à pied, de m'avoir appris à jouer de la guitare, de m'avoir mis en contact avec notre premier ordinateur en 1988, de tous les voyages de la Bulgarie au mont Fuji en passant par la Californie et bien sûr Hawaii... Je remercie ma mère de m'avoir appris à aimer l'école, du support psychologique ... 1-800-maman..., de

m'avoir transmis une partie de son savoir faire culinaire, de toutes les bouteilles de vin partagées, de m'avoir offert la table d'ordinateur qui a permis la rédaction d'une partie de cette thèse dans mon sofa... Ce n'est que la pointe de l'iceberg de ma reconnaissance envers vous, un morceau de cette thèse vous revient.



Je suis sincèrement reconnaissante envers Guy Cloutier qui m'a offert cette opportunité de ce spectaculaire casse-tête qu'est le doctorat. M'ayant d'abord accueilli au sein du Laboratoire de biorhéologie et d'ultrasonographie médicale (LBUM) pour des études de maîtrise, Guy m'a laissé plonger dans l'aventure doctorale sans me prévenir des soucis et inquiétudes qui pouvaient me guetter et je ne peux que lui en être reconnaissante. J'admire sa patience, son ouverture d'esprit et sa capacité d'initier aisément des projets de recherche traitant de thématiques multidisciplinaires pouvant sortir du champ d'expertise de son laboratoire, comme en témoigne le sujet de ma thèse. Je le remercie de ses encouragements mais aussi de m'avoir fait confiance et donné la chance de présenter dans le cadre de plusieurs conférences internationales ainsi que de m'avoir permis d'effectuer un stage d'été au Japon, au cours de mes études doctorales. Je le remercie également de sa générosité et de son support financier. Se débrouiller, m'a permis de grandir non seulement sur le plan scientifique, mais également sur le plan personnel.



Je suis également reconnaissante envers Marie Trudel, ma co-directrice, qui m'a généreusement partagé non seulement la richesse de ses connaissances scientifiques mais également toutes les ressources disponibles au sein de son laboratoire. Je remercie Marie de m'avoir transmis sa passion pour la science et son désir constant d'approfondir les connaissances des sujets de recherche de son laboratoire. J'ai grandement bénéficié de sa rigueur, de son souci pour le travail bien fait, de son souci du détail tel que trouver le mot juste. Je la remercie également pour ses encouragements ainsi que le dévouement qu'elle porte au succès de ses étudiants, sa capacité de toujours trouver un moment pour réviser leurs travaux même s'il s'agit d'un jour de fin de semaine ou de congé.



Merci à Louis-Gilles Durand de m'avoir accueilli chaleureusement dans les locaux de son laboratoire à l'IRCM afin de me permettre d'y effectuer une grande partie de mes expérimentations. Merci pour sa patience et sa compréhension.



Je tiens à exprimer ma gratitude envers Yoshifumi Saijo qui m'a offert la chance d'effectuer un stage d'été mémorable au sein de son extraordinaire équipe de recherche de l'Université de Tohoku au Japon. Merci pour sa cordialité et sa générosité.



Je remercie Daniel Charpentier d'être entré dans ma vie à un moment très difficile de la fin de ce doctorat et d'y être resté depuis, de m'avoir patiemment écoutée des centaines d'heures durant, d'avoir bravement lu et corrigé la totalité de cette thèse, de son amour et son encouragement, de m'avoir supporté, de m'avoir fait découvrir 'Dexter', de m'avoir nourri, de m'avoir permis de guérir mes ailes pour finalement, finalement réussir à déposer cette thèse...



Je remercie Eric Raymond Beaubien d'avoir partagé ma vie durant plus de 7 ans, de m'avoir encouragé à développer mon côté « geek », d'avoir sauvé cet ordinateur portable d'une mort quasi-certaine par noyade dans le milkshake, d'avoir trouvé une solution pour contourner les problèmes d'incompatibilité entre Reference Manager et Visa x64 qui empoisonnaient sérieusement les débuts de la rédaction de cette thèse, de m'avoir appris à conduire, ...



Je remercie ma sœur, ma grande sœur qui, malgré nos différences, demeure sans aucun doute ma meilleure amie. Merci pour tout. Merci également à tous mes amis d'avoir été là, d'avoir partagé mes joies et mes peines et de tous ces beaux moments en leur compagnie.



Puis il y eut toutes ces personnes rencontrées au LBUM et dans les deux centres de recherche...

Comment oublier Boris Chayer, qui m'a sauvé la vie à de multiples occasions. Il m'a encouragé à vivre pleinement ma dépendance au chocolat tout en m'apprenant à pratiquer des activités aussi inusitées qu'utiles telles que le verre plié à la flamme d'un brûleur au gaz du laboratoire (pour fabriquer un échangeur de chaleur)... tous

les restos sur l'heure du lunch, les séances de soleil au parc Jeanne-Mance à les regarder, lui et Damien, escalader le mur de brique des 'bonnes sœurs'... Boris qui m'a aidé considérablement dans l'élaboration de mes montages expérimentaux faisant preuve d'une ingéniosité incomparable. Merci pour tout.



J'ai fait connaissance avec Damien Garcia durant mes années de maîtrise. Je pourrais sans doute dire que Damien était un mentor pour moi durant une partie de mes études supérieures. En plus de me permettre de comprendre de nombreux concepts scientifiques essentiels à l'avancement de mes projets, Damien m'a appris que la science pouvait se réaliser tout en restant 'cool'... les articles scientifiques accrochés à l'entrée du laboratoire de Génie biomédical de l'IRCM où il travaillait jadis, en témoignent : 'Techniques optimisées pour lacer les chaussures', 'L'effet positif des siestes sur la cognition', 'Les effets bénéfiques de la consommation du chocolat noir sur la fonction endothéliale vasculaire'... quelques thèmes d'intérêt scientifique et personnel... Je le remercie pour toutes les heures qu'il m'a accordées afin de m'aider dans l'interprétation de mes résultats, pour toutes les discussions et échanges scientifiques et ludiques, sans oublier, d'avoir été mon entraîneur occasionnel de course à pied.



À ma consœur biologiste, Julie Vanier, qui aimait tant me présenter aux gens comme sa 'supérieure immédiate', j'aimerais dire encore une fois merci pour son admiration. J'aimerais particulièrement la remercier d'avoir remis la confiance en moi lorsque le château de cartes qu'était ce doctorat s'écroulait pour la n^{ième} fois... Je ne crois pas que je sois digne d'être 'son idole', malgré ce qu'elle me dit souvent, mais je ne peux oublier les aventures que nous avons partagées, moments teintés d'une gamme de couleurs d'assez large spectre, passant du gris au rosé (surtout l'été)...



Je ne peux passer sous silence le support de nombreux étudiants au laboratoire de Marie Trudel. Je n'aurais certainement pas été en mesure de réaliser mes travaux de recherche sans la participation de Hady Felfy, Wafaa Lemsaddek, Olivier Côté, Almira Kurbegovic et Martin Couillard. Ils m'ont tous généreusement offert leur aide à différents moments de ces études doctorales en faisant preuve d'une remarquable gentillesse.



Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers toute la ‘gang’ des services du 1^{er} étage de l’IRCM, non seulement pour leur expertise et leur dévotion, mais également pour leur amitié (et tous les 5 à 7) : Annie Vallée pour les lames et colorations histologiques impeccables mais aussi pour le lien amical qui nous unit, Richard Cimon pour toutes ses réparations miraculeuses toujours urgentes mais aussi pour son humour, Dominic Fillion pour son expertise et son support microscopique ainsi que les programmes d’analyse d’images, Eric et Martine pour leur support dans l’utilisation de l’Advia.



Bien sûr, je n’ai pas oublié les étudiants et les autres membres du LBUM qui ont régulièrement permis d’alléger la lourdeur des études doctorales avec de nombreuses discussions de sujets variés passant de l’actualité aux croyances religieuses en maintenant toujours un minimum d’humour.



J’aimerais exprimer ma reconnaissance envers Daniel Lajeunesse, directeur du programme de Sciences biomédicales, pour toute son aide et son support durant la dernière année de mes études doctorales.



Je remercie également Denis Soulières, Éric Thorin et Pedro D’Orléans-Juste d’avoir accepté de faire partie du jury d’évaluation de cette thèse.



Il aurait été impossible de réaliser ces travaux sans le support des organismes subventionnaires, incluant les Instituts de recherche en santé du Canada, la Fondation des maladies du Cœur du Canada et les National Institutes of Health des États-Unis.



Finalement, si vous avez tenu le coup jusqu’à ces dernières lignes, je pourrais vous raconter quelques anecdotes farfelues ... mais les lignes me manquent... Je vous demanderais plutôt une seule chose : je vous prierai simplement de ne pas considérer cette section de remerciements comme une liste exhaustive... il est possible que j’aie fait preuve d’omissions, je remercie donc cordialement toutes les personnes m’ayant aidé et supporté et ce pour l’ensemble de leurs contributions. J’espère ainsi que vous trouverez cette thèse agréable à lire.

AVANT-PROPOS

Les thalassémies représentent le groupe de maladies monogéniques le plus répandu dans le monde. Pourtant, ces maladies ne figurent pas au rang des thématiques de recherche les plus populaires. Une simple comparaison du nombre de publications scientifiques biomédicales répertoriés dans la base de données Medline révèle que des maladies telles que l'hypertension, le diabète ou l'obésité affichent de 6 à 11 fois plus de publications que les thalassémies. Ces dernières furent décrites pour la première fois en 1925 par Thomas Cooley et Pearl Lee suite à leurs observations faites chez des enfants de la région méditerranéenne. Néanmoins, malgré que ces maladies soient connues depuis plus de 80 ans, l'espérance de vie des patients atteints de β -thalassémie, une des formes les plus sévères de ces pathologies, demeure encore, à ce jour, limitée à la quarantaine. Je ne pourrais dire exactement les motivations qui m'ont poussé à choisir spécifiquement ce sujet afin d'effectuer les recherches décrites dans cette thèse. Peut-être étaient-ce mes origines méditerranéennes qui ont suscité mon intérêt ou peut-être était-ce le simple fait que derrière ce mot à l'apparence complexe, *thalassémie*, derrière la description méthodique des symptômes cliniques qu'il représente, derrière les subventions de recherche qui permettent de stimuler l'économie scientifique, il y a des patients. Des êtres vivants pour lesquels chaque symptôme représente bien plus qu'un simple mot. Des individus qui espèrent célébrer un jour leur 50^e anniversaire.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Ce premier chapitre représente une introduction aux notions nécessaires pour la compréhension du sujet faisant l'objet de cette thèse. Ainsi, cette revue de la littérature comprend trois principales sections. D'abord, un bref rappel de notions hématologiques sera suivi d'une description de la pathologie β -thalassémique. Ensuite, une section détaillera des concepts de physiologie cardiovasculaire notamment l'hémodynamique vasculaire et la physiologie cardiaque, ainsi que la physiologie de l'endothélium vasculaire. La dernière section permettra d'introduire la problématique des désordres cardiovasculaires de la β -thalassémie pour finalement énoncer les objectifs et le plan de cette thèse.

1.1 NOTIONS HEMATOLOGIQUES

Le sang représente environ 8% du volume corporel total, c'est-à-dire 4 à 6 L. Les principaux rôles du sang sont le transport d'oxygène et de substances nutritives aux différents tissus du corps, l'évacuation des déchets et du dioxyde de carbone et la défense de l'organisme contre les infections. Il est composé de trois types d'éléments cellulaires spécialisés suspendus dans un liquide appelé plasma : les érythrocytes ou globules rouges, responsables du transport d'oxygène et de dioxyde de carbone; les leucocytes ou globules blancs, dédiés à la protection de l'hôte contre les infections et blessures; les thrombocytes ou plaquettes permettant de préserver l'intégrité vasculaire par l'intermédiaire de la coagulation sanguine (Fig. 1.1A). L'hématocrite représente le volume qu'occupent les globules rouges dans un échantillon sanguin total (Fig. 1.1B).

En plus des cellules, un grand nombre de substances organiques et inorganiques se retrouvent dissoutes dans le plasma. Les principales substances organiques sont les protéines plasmatiques telles que l'albumine, les globulines et le fibrinogène. Les constituants inorganiques sont des électrolytes tels que le sodium, le potassium ou encore le chlore.

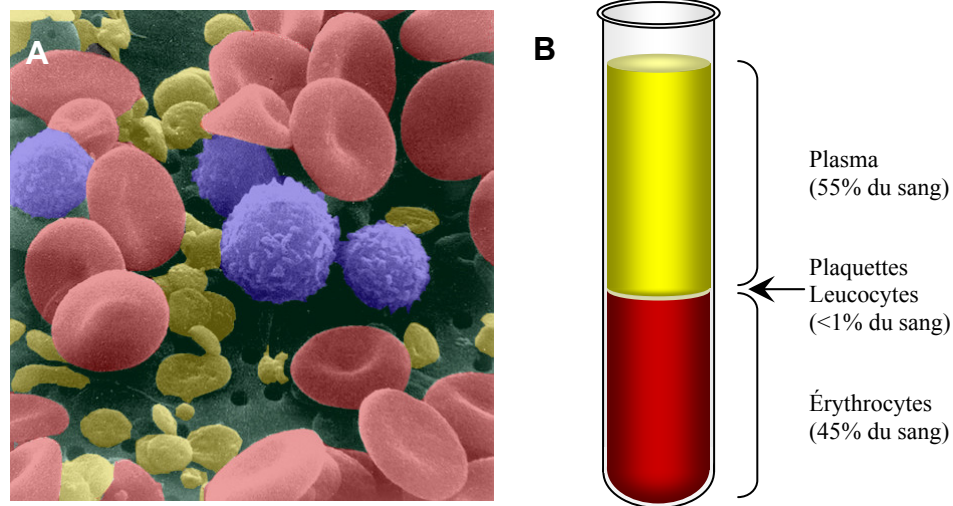


Figure 1.1: A) Microscopie électronique du sang, montrant des érythrocytes (rouge), des plaquettes (jaune) et des leucocytes (bleu) (adapté d'une photographie publique provenant du National Cancer Institute, photo : Bruce Wetzel), B) Organisation du sang en couches dans un échantillon additionné d'anticoagulant et centrifugé.

1.1.1 Globules rouges

Les globules rouges sont des cellules anucléées ayant la forme d'un disque biconcave de diamètre de $7,8 \mu\text{m}$ et d'épaisseur de $2,5 \mu\text{m}$ sur les côtés et de $1 \mu\text{m}$ au centre⁽¹⁾ (Fig. 1.2). Chez l'homme normal, le nombre moyen de globules rouges est de $5,2 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ et chez la femme normale ce nombre est de $4,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ ⁽²⁾. La fonction principale des érythrocytes est la protection et le transport de l'hémoglobine qui à son tour permet de transporter l'oxygène des poumons aux tissus ainsi que d'évacuer le dioxyde de carbone des tissus vers les poumons. La biconcavité érythrocytaire contribue à l'efficacité de leur fonction première en procurant une surface de contact optimale pour la diffusion de l'oxygène à travers la membrane cellulaire. Une autre caractéristique érythrocytaire importante est leur grande déformabilité qui facilite leur transport à travers des capillaires étroits et tortueux de diamètre aussi petit que $3 \mu\text{m}$.

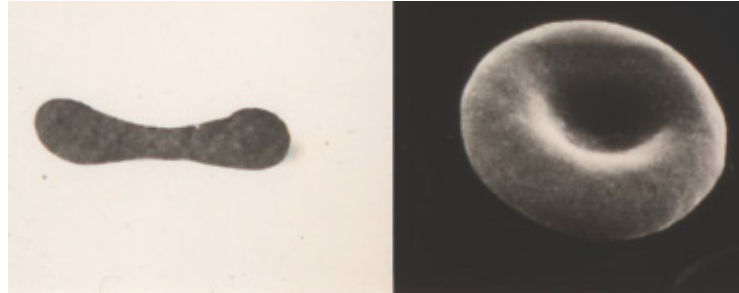


Figure 1.2: Photographie d'un érythrocyte montrant en microscopie optique (gauche) et électronique (droite) la morphologie cellulaire de profil et de face (extrait de Young *et al.*, 2006 ⁽³⁾).

Les globules rouges sont exempts de noyau, organelles et ribosomes afin de maximiser le contenu en hémoglobine qui peut atteindre une concentration de 34 g/dL de cellules. À hématoците normale, les concentrations moyennes normales d'hémoglobine, chez un individu en santé, sont de 16 grammes par décilitre de sang chez l'homme et de 14 g/dL chez la femme⁽¹⁾. Cependant la concentration en hémoglobine varie selon l'âge, le sexe et les origines ethniques⁽⁴⁾.

1.1.2 Hématopoïèse et érythro-poïèse

L'hématopoïèse désigne le processus de production des cellules sanguines à partir de cellules souches pluripotentes. Le lieu de synthèse des cellules sanguines change durant le développement embryonnaire passant du sac vitellin¹ au foie, à la rate et pour enfin prendre place dans la moelle osseuse, lieu exclusif de la production après la naissance (Fig. 1.3).

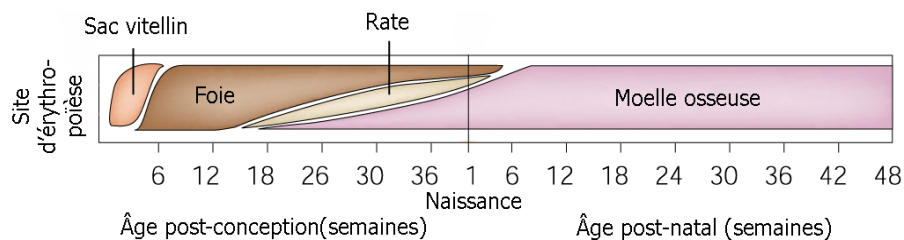


Figure 1.3: Sites d'érythro-poïèse durant le développement humain (adapté de Weatherall, 2001 ⁽⁵⁾).

¹ Vésicule, très réduite dans l'espèce humaine, appendue à la partie ventrale de l'intestin et reliée à l'intestin par le canal vitellin.

Le site actif d'hématopoïèse de la moelle est surnommé la moelle osseuse rouge puisqu'il contient un grand nombre de globules rouges immatures. La moelle osseuse renferme également des cellules graisseuses, mais ces dernières sont inactives en termes d'hématopoïèse. La partie de la moelle composée majoritairement de cellules graisseuses se nomme moelle jaune. Durant la croissance, la moelle rouge est graduellement remplacée par de la moelle jaune dans les os longs tels que le tibia et le fémur, ce qui restreint les sites d'hématopoïèse aux os membraneux tels que les vertèbres, le sternum ou encore les côtes⁽¹⁾. La moelle rouge est également le site de différenciation des leucocytes et des plaquettes.

Toutes les cellules sanguines circulantes dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes, c'est-à-dire des cellules souches non différenciées capables de produire diverses cellules différenciées. À partir de la cellule souche pluripotente, plusieurs étapes de différenciation sont nécessaires afin de former la première cellule appartenant à la lignée des globules rouges, le proérythroblaste (Fig. 1.4). Ce précurseur subit une série de divisions produisant chacune des cellules de plus en plus petites.

La synthèse d'hémoglobine débute durant le stade d'érythroblaste et continue jusqu'à la maturation érythrocytaire. Durant sa transformation, l'érythrocyte accumule une grande quantité d'hémoglobine jusqu'à la condensation et l'extrusion du noyau cellulaire. Les cellules entrent dans la circulation sanguine par diapédèse sous forme de réticulocytes et finissent leur maturation en 24 à 48 heures en évacuant les organelles cellulaires telles que les mitochondries ou les ribosomes. Elles perdent par conséquent leur capacité de synthétiser l'hémoglobine⁽⁶⁾.

Le nombre total de globules rouges est hautement régulé pour permettre un transport adéquat de l'oxygène des poumons aux tissus sans toutefois devenir trop nombreux et entraver la circulation sanguine. L'érythropoïèse est régulée par les besoins des tissus en oxygène. Une diminution de la quantité d'oxygène transportée peut être captée par des cellules spécialisées au niveau du rein. Ces dernières produisent un facteur de croissance appelé l'érythropoïétine qui stimule la prolifération et la maturation des précurseurs des globules rouges ainsi que la libération des réticulocytes (Fig. 1.4).

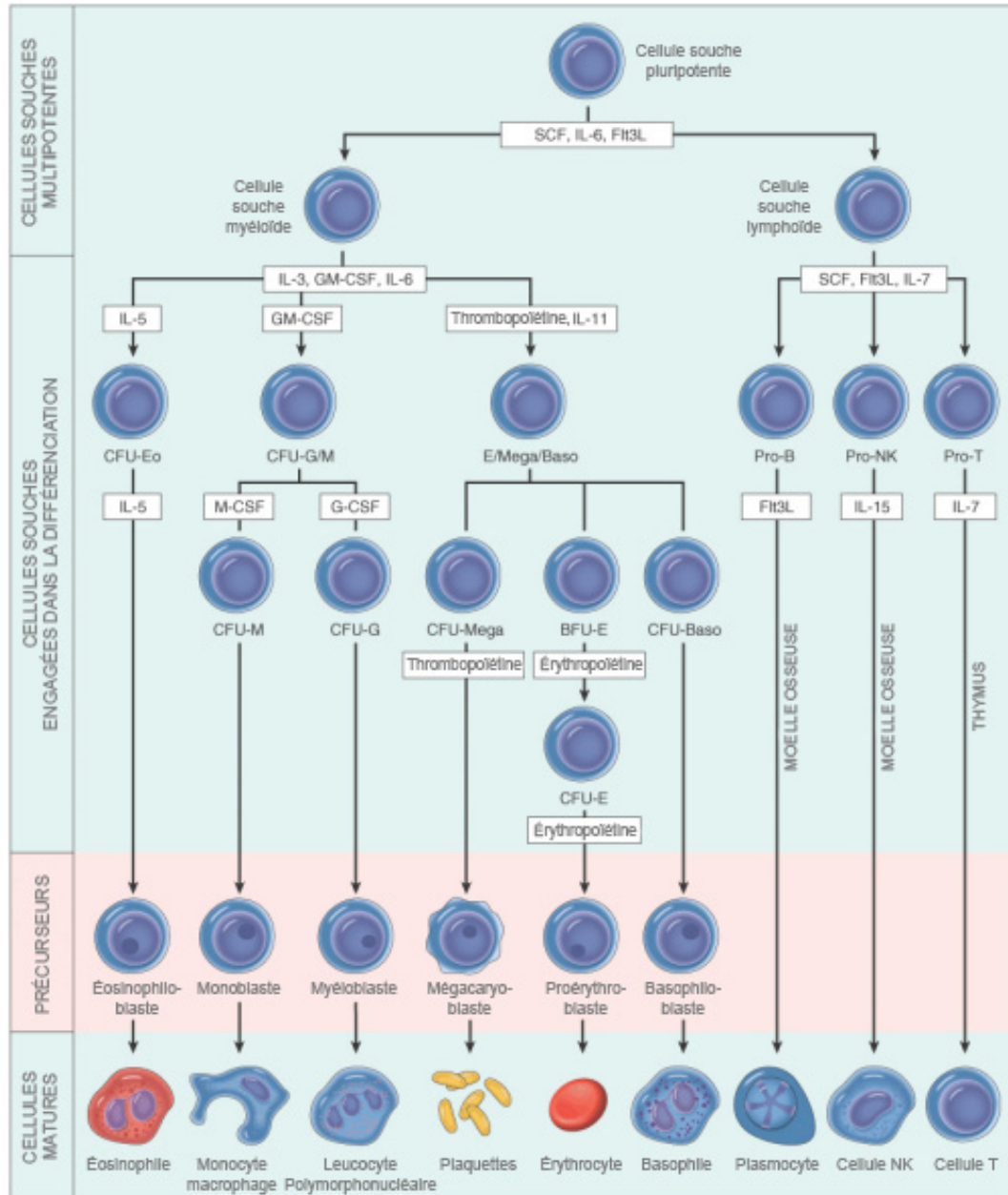


Figure 1.4: Différenciation des cellules hématopoïétiques (adapté de Kumar *et al.*, 2005⁽⁷⁾). Les CFU (« colony forming unit ») ou cellules progénitrices d'une lignée particulière sont des cellules souches spécialisées pouvant donner naissance à des colonies de cellules différenciées. BFU-E, « burst forming unit erythrocyte »

1.1.3 Hémoglobine

L'hémoglobine est la protéine globulaire permettant le transport de l'oxygène ainsi que du dioxyde de carbone et certains autres gaz tels que le monoxyde d'azote (NO). L'érythrocyte humain contient environ 280 millions de molécules d'hémoglobine⁽³⁾. La structure de l'hémoglobine humaine change durant le développement. Ainsi chaque type d'hémoglobine est un tétramère constitué de deux différentes paires de chaînes polypeptidiques nommées globines et contenant chacune un groupe hème (Fig. 1.5). Chaque hème contient un ion de fer capable de lier de façon réversible l'oxygène. Les gènes de ces globines de type α et β sont encodés, chez l'humain, sur les chromosomes 16 et 11 respectivement. Au cours des stades du développement, différentes globines de type α et β sont produites (Fig. 1.6A) pour former différentes hémoglobines (Fig. 1.6B).

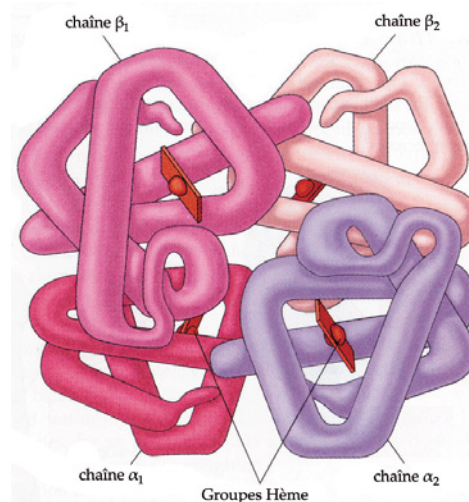


Figure 1.5: Molécule d'hémoglobine (adapté de Sherwood 1997 ⁽²⁾).

À l'âge adulte, la totalité des hémoglobines est constituée d'environ 97% d'hémoglobine A (HbA), 2% d'hémoglobine A₂ (HbA₂) et 1% d'hémoglobine fœtale (HbF)⁽⁸⁾.

1.1.4 β -thalassémie

Les hémoglobinopathies sont des désordres héréditaires entraînant des variations structurelles de l'hémoglobine dont les plus fréquentes sont les thalassémies et les désordres drépanocytaires (ou anémie falciforme). En 1925, Thomas Cooley et

Pearl Lee ont identifié une forme d'anémie sévère présente dès l'enfance, associée à une splénomégalie (augmentation anormale du volume de la rate) et à des changements osseux caractéristiques⁽⁹⁾. En 1932, George H. Whipple donne à ce désordre le nom *thalassémie*, venant de *thalassa* signifiant « la mer », puisque les patients qu'il avait étudiés venaient de la région Méditerranéenne⁽¹⁰⁾.

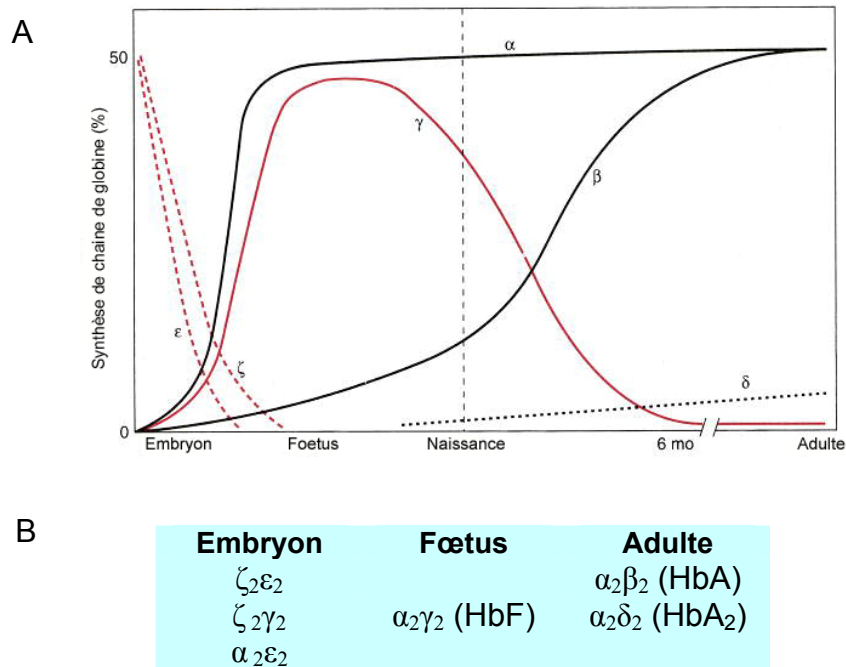


Figure 1.6: A) Chaînes de globine produites au cours du développement de l'homme, de la conception à l'âge adulte (adapté de Giardina *et al.*, 2008⁽¹¹⁾). B) Composition des hémoglobines selon le stade de développement. La lettre en grec désigne le nom de la globine et l'indice indique le nombre de chaînes. L'indication entre parenthèses est le nom de l'hémoglobine résultante.

Les thalassémies sont un groupe de maladies héréditaires diversifiées caractérisées par une diminution ou une absence totale de la synthèse d'une ou plusieurs chaînes de globines. Elles sont classifiées dépendamment de la chaîne de globine impliquée, les plus courantes étant l' α -thalassémie et la β -thalassémie⁽¹²⁾. Ainsi la β -thalassémie résulte de la réduction (β^+ -thalassémie) ou de l'absence (β^0 -thalassémie) de production de la chaîne β -globine⁽¹³⁾.

1.1.4.1 Classification et génétique

La β -thalassémie est extrêmement hétérogène au niveau moléculaire, puisque plus de 200 différentes mutations entraînent ce phénotype⁽¹⁰⁾. Brièvement, ce sont soit des délétions² au niveau du gène de la β -globine ou des mutations très souvent ponctuelles affectant la transcription de l'ADN en ARNm, la stabilité de l'ARNm ou la traduction de l'ARNm en β -globine⁽¹³⁾. Les β -thalassémies peuvent être séparés en trois catégories selon la sévérité des symptômes cliniques: la thalassémie majeure, la thalassémie intermédiaire et le trait thalassémique.

La thalassémie majeure consiste en une anémie sévère symptomatique. Elle se présente chez des individus homozygotes³ pour une mutation thalassémique ou des individus hétérozygotes⁴ présentant une combinaison de plusieurs mutations thalassémiques. Chez ces individus, l'anémie s'accompagne généralement d'une diminution sévère de la teneur en hémoglobine des érythrocytes (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine ou MCH) et une diminution du volume érythrocytaire moyen (volume globulaire moyen ou MCV) se reflétant, respectivement, par une hypochromie et une microcytose (Fig. 1.7). Le niveau d'hémoglobine décroît progressivement durant les premiers mois de vie et peut atteindre des concentrations aussi basses que 3 à 4 g/dL de sang⁽¹¹⁾. Les patients présentent des symptômes de pâleur cutanée, fatigue généralisée, hyperplasie des os, splénomégalie progressive pouvant déformer l'abdomen ainsi qu'un retard de croissance⁽⁹⁾. En l'absence de transfusions sanguines, les patients risquent la mort dès les premiers mois suivant leur naissance.

² Processus entraînant la perte de matériel chromosomique sur un segment d'ADN.

³ Individus portant la même mutation sur chacun des deux allèles de la même paire de chromosomes.

⁴ La mutation est contenue sur un seul allèle de la même paire de chromosomes

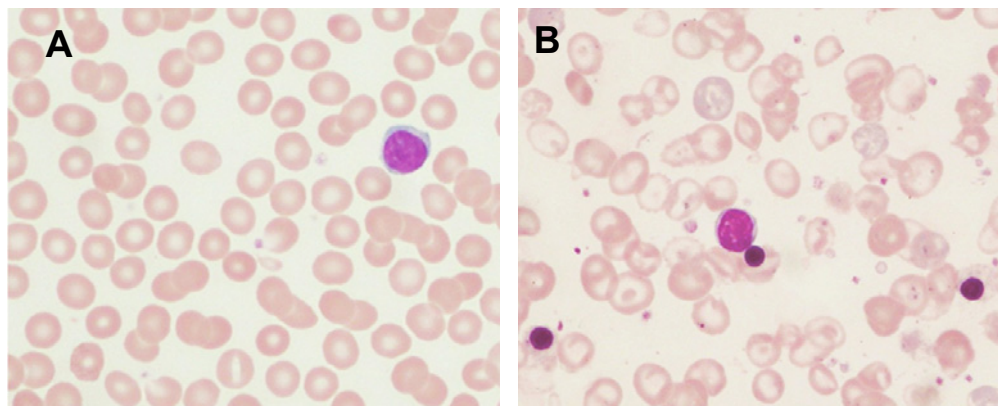


Figure 1.7: Morphologie des globules rouges chez un individu sain (A) et chez un patient atteint de thalassémie majeure (B). (extrait de Young *et al.*, 2006 ⁽³⁾)

Environ 10% des individus β -thalassémiques homozygotes expriment un phénotype de sévérité hématologique intermédiaire⁽¹¹⁾. Ces patients présentent une réduction modérée de la synthèse de la β -globine et survivent généralement jusqu'à l'âge adulte sans traitements. Par ailleurs, cette forme de β -thalassémie est cliniquement hétérogène et les patients atteints peuvent présenter des concentrations d'hémoglobine variant de 6 à 10 g/dL⁽¹⁰⁾. Ainsi, la gamme de symptômes cliniques chez les patients atteints de β -thalassémie intermédiaire s'étend d'un état complètement asymptomatique jusqu'à l'âge adulte à un phénotype de complications similaires à celles de la β -thalassémie majeure.

Le trait thalassémique ou la β -thalassémie mineure est un état de porteur généralement asymptomatique présent chez des patients hétérozygotes pour une mutation thalassémique⁽⁹⁾. Certains patients peuvent présenter une anémie discrète ainsi qu'une microcytose. L'anomalie est habituellement révélée lors de la présence d'une autre situation clinique telle qu'une grossesse ou une infection majeure⁽¹⁰⁾.

1.1.4.2 Distribution mondiale et génétique des populations

Tel que montré à la figure 1.8, la β -thalassémie se distribue en grande partie à travers les populations d'Afrique, la région Méditerranéenne, le Moyen-Orient, l'Inde et en Asie du Sud-est⁽⁹⁾.



Figure 1.8: Distribution mondiale de la β -thalassémie (extrait de Weatherall *et al.*, 2001 ⁽⁹⁾).

Dans ces populations, l'incidence de la thalassémie est estimée entre 2.5 et 15%⁽¹¹⁾. Cependant, en raison des mouvements de populations, ces maladies sont aussi répandues en Amérique et en Europe de l'Ouest. Notons que cette maladie peut apparaître sporadiquement au niveau de tous les groupes ethniques⁽¹⁰⁾. Des études sur les populations suggèrent que les porteurs de gènes causant la thalassémie ainsi que l'anémie falciforme sont protégés contre la malaria *P. falciparum*⁽¹⁴⁾. Les études ont montré que la β -thalassémie est apparue dans les régions malariales suite à une sélection positive des gènes mutés⁽¹⁴⁾.

1.1.4.3 Pathophysiologie et manifestations cliniques

La β -thalassémie comprend un large spectre de manifestations et de complications cliniques. Les patients sévèrement atteints présentent une anémie chronique, des déformations osseuses, une splénomégalie, une surcharge de fer et des complications cardiovasculaires (voir section 1.3, p. 52) (Fig. 1.9). De plus, d'autres complications β -thalassémiques ont également été décrites, mais ne seront pas détaillées dans cette revue de littérature. Mentionnons à ce titre les dysfonctions endocriniennes, les retards de croissance et de développement, le diabète, la pathologie hépatique et les infections⁽⁹⁾.

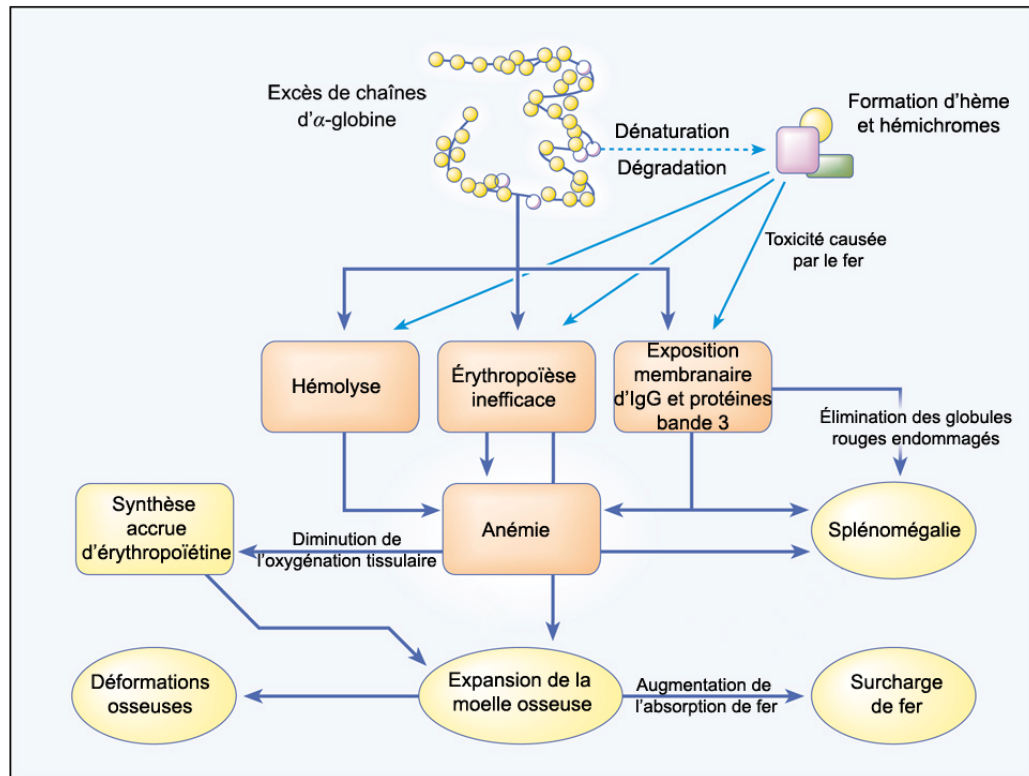


Figure 1.9: Résumé des conséquences de production excessive de chaînes d' α -globine (adapté de Olivieri, 1999⁽¹⁵⁾). Les processus primaires sont indiqués en orange et les processus compensatoires en jaune.

1.1.4.3.1 Anémie

Le phénotype clinique varie selon le génotype des patients et le taux de diminution de la production des chaînes de β -globine. La cause principale de l'anémie présente lors de la β -thalassémie est le déséquilibre entre la synthèse des chaînes de globines α et β , diminuant conséquemment la synthèse d'hémoglobine (HbA) et résultant dans l'hypochromie et la microcytose. Les nouveau-nés atteints de β -thalassémie majeure ne présentent pas d'anémie puisque la production de γ -globine persiste plusieurs mois suivant la naissance et les chaînes d' α -globine permettent la formation d'hémoglobine fœtale (HbF, $\alpha_2\gamma_2$). Ainsi, les manifestations cliniques débutent à la seconde moitié de la première année de vie, suite à la transition de l'expression des chaînes de γ -globine vers les chaînes de β -globine⁽¹⁵⁾. Par la suite, chez les individus les plus sévèrement atteints, l' α -globine libre s'accumule dans la cellule puisqu'elle est incapable de former des tétramères d'hémoglobine et les chaînes d' α -globine s'agrègent et précipitent formant des inclusions, appelés également

« corps de Heinz »⁽¹³⁾. Les corps de Heinz interfèrent dans le processus de maturation des précurseurs érythrocytaires, causant des dommages oxydatifs à la membrane cellulaire et une destruction des érythroblastes immatures à l'intérieur de la moelle osseuse^(16; 17). Centis *et al.* ont démontré, chez des patients thalassémiques, un taux d'apoptose érythrocytaire à l'intérieur de la moelle osseuse qui était 3 à 4 fois supérieur à celui des sujets normaux⁽¹⁸⁾. L'apoptose expliquerait ainsi partiellement l'inefficacité de l'érythropoïèse et, par conséquent, une partie de l'anémie résultante.

De plus, l'anémie comporte également une composante hémolytique, puisque les érythrocytes ayant atteint la maturité et contenant un excès de chaînes d' α -globine montrent une modification de la structure membranaire ainsi qu'une rigidité accrue⁽¹⁰⁾. Ceci occasionne leur élimination et leur destruction lors du passage à travers les capillaires sinusoides étroits de la rate et ailleurs dans la microcirculation. Les chaînes d' α -globine excédentaires se liant au cytosquelette membranaire endommagent les protéines de la membrane cellulaire ce qui cause la rigidité érythrocytaire⁽¹⁹⁾. En outre, les produits de dégradation des α -globines, tels que l'hème et le fer libre, provoquent une série de processus oxydatifs intracellulaires. L'oxydation endommage également la membrane et certaines composantes érythrocytaires. Ce processus entraîne une perte de l'asymétrie des phospholipides membranaires et une exposition de sites de liaison pour les immunoglobulines G (IgG) rendant les globules rouges susceptibles à l'élimination par les macrophages^(13; 20).

1.1.4.3.2 *Modification osseuse*

La diminution considérable de la capacité globale de transport d'oxygène du sang stimule la sécrétion de grandes quantités d'érythropoïétine afin de promouvoir une hyperplasie érythroïde compensatoire. Cependant, la capacité de la moelle osseuse de répondre à ce message est limitée par l'érythropoïèse inefficace. Ceci cause l'expansion massive de la moelle osseuse avec une production réelle très limitée de globules rouges et un amincissement de l'os cortical. Chez certains patients, l'érythropoïèse est si exubérante que des masses de tissu érythropoïétique extramédullaire sont formées dans l'abdomen, le pelvis et la poitrine⁽¹¹⁾. L'expansion massive de la moelle osseuse exerce plusieurs effets adverses sur la croissance, le développement et le fonctionnement de certains organes. Certains enfants présentent

même des déformations des os crâniens et faciaux et une porosité au niveau des os longs et des vertèbres⁽¹⁰⁾ pouvant également occasionner des fractures⁽²¹⁾.

1.1.4.3.3 *Splénomégalie*

L'exposition incessante de la rate aux globules rouges endommagés entraîne l'hypertrophie de la rate, appelée splénomégalie, causée par un travail excessif. Elle agit telle une éponge séquestrant une proportion considérable de la masse érythrocytaire⁽⁹⁾. La splénomégalie peut être évitée par transfusion régulière de sang⁽²²⁾. Cependant, lorsque les besoins en transfusion excèdent 180 à 200 mL de concentrés de globules rouges par kilogramme de poids corporel par année, les patients doivent généralement subir une ablation chirurgicale de la rate ou splénectomie⁽¹¹⁾. Le même processus d'hypertrophie peut avoir lieu dans le foie surtout suite à une splénectomie⁽¹⁰⁾.

1.1.4.3.4 *Surcharge de fer*

Les patients thalassémiques sévèrement atteints manifestent une augmentation de l'absorption gastro-intestinale de fer qui est reliée au degré d'inefficacité de l'érythropoïèse et de l'expansion subséquente de la population de précurseurs de lignée érythroïde⁽⁹⁾. L'absorption accrue entraîne une accumulation graduelle de fer dans les cellules de Kupffer et dans les macrophages de la rate^(10; 11). De plus, les patients thalassémiques homozygotes requièrent des transfusions sanguines régulières qui contribuent à accentuer l'accumulation de fer dans les glandes endocriniennes, le pancréas, le foie et le myocarde⁽¹⁰⁾. Le fer est emmagasiné dans les cellules de ces organes sous la forme de ferritine, hémosidérine et fer libre ou fer labile cellulaire. Le fer labile est le plus toxique puisqu'il provoque la formation de radicaux libres pouvant causer des dommages oxydatifs aux protéines et lipides cellulaires⁽²³⁾. L'absence d'un traitement permettant l'élimination du fer de l'organisme, ou traitement chélateur, entraîne une dysfonction graduelle au niveau du cœur, du foie et des glandes endocriniennes⁽²²⁾. La surcharge de fer peut également entraîner des complications au niveau du foie, telle que la fibrose, et un désordre des glandes endocriniennes, associé au diabète ou au retard de croissance et de développement^(15; 22).

1.1.4.4 Traitements

Durant les dernières décennies, le pronostic des patients atteints de β -thalassémie majeure a grandement été amélioré par les traitements combinés de transfusions sanguines et de chélation du fer. La figure 1.10 montre des résultats de probabilité de survie rapportées chez des patients β -thalassémiques italiens (A, C) et britanniques (B).

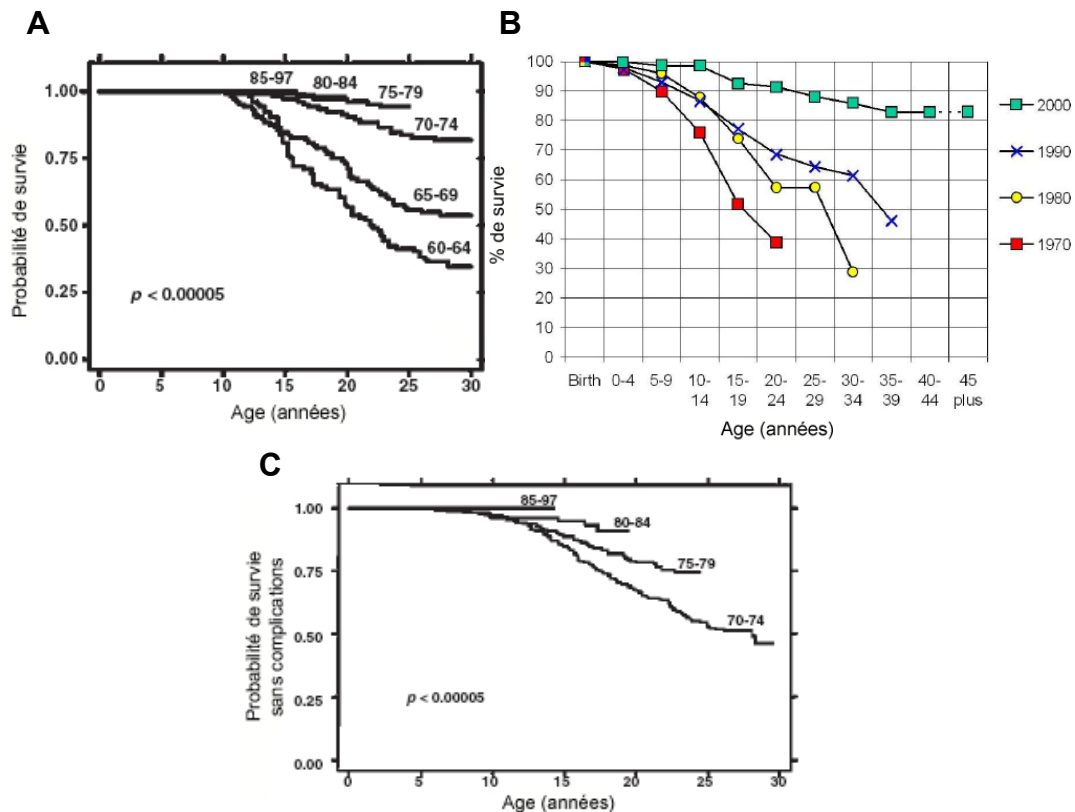


Figure 1.10: Probabilité de survie, après la première décennie de vie, (A) et de survie sans complications (C), par cohorte de date de naissance, chez des patients italiens atteints de β -thalassémie majeure (adapté de Borgna-Pignatti *et al.*, 2004⁽²⁴⁾). B) Comparaison de l'espérance de vie chez des patients britanniques atteints de β -thalassémie majeure étant en vie au début des années 1970, 1980, 1990 et 2000 (adapté de Modell *et al.*, 2008⁽²⁵⁾).

1.1.4.4.1 Transfusion sanguine

Le principal traitement symptomatique pour les patients atteints de thalassémie est la transfusion sanguine. Un programme adéquat de transfusion peut d'une part prévenir la mort causée par l'anémie durant les premières années de vie et

permettre une croissance et un développement normal durant l'enfance, et d'autre part limiter les complications liées à l'érythropoïèse telles que l'hyperplasie de la moelle osseuse et l'érythropoïèse extramédullaire^(26; 27). Généralement, les transfusions sont administrées chaque deux à quatre semaines avec un niveau d'hémoglobine avant transfusion de 9 à 10 g/dL^(10; 11). Dans le but d'éviter des réactions aux transfusions, le sang doit être lavé et filtré pour éliminer les globules blancs et les protéines plasmatiques. Toutefois, le risque de transmission d'agents viraux tels que l'hépatite B, C et le VIH demeurent une problématique importante des transfusions sanguines⁽²⁷⁾.

1.1.4.4.2 Traitement chélateur du fer

La surcharge de fer, principalement causée par les transfusions sanguines, est une cause importante de morbidité et de mortalité tardive chez les patients β -thalassémiques et elle peut être évitée ou traitée par l'administration d'un agent chélateur capable de former un complexe soluble et non toxique avec le fer et de promouvoir son excrétion. La déféroxamine est l'agent chélateur standard utilisé depuis 1970 pour usage clinique et ayant démontré son efficacité à long terme dans le traitement de la thalassémie^(10; 28). La déféroxamine est absorbée faiblement par voie orale et métabolisée rapidement dans le plasma nécessitant par conséquent l'infusion par voie parentérale sur une période allant de 8 à 12 heures⁽²²⁾. Ce médicament a montré une grande efficacité lors d'une utilisation optimale en inversant la toxicité au niveau des organes et en prolongeant l'espérance de vie des patients. Cependant, pour atteindre un niveau suffisant d'élimination du fer, ce médicament doit être administré au moins 5 à 7 jours/semaine⁽²⁸⁾. Le régime de traitement souvent inconfortable et rigoureux entraîne une adhérence faible au traitement plus particulièrement chez les adolescents et les jeunes adultes⁽²⁷⁾. De plus, des effets neurologiques toxiques ont été rapportés lors de l'administration de ce médicament. De ce fait, la surveillance pour toxicité est essentielle dès le début de ce traitement. Des médicaments chélateurs pouvant être administrés par voie orale ont également été développés afin d'améliorer l'observance de la thérapie et maintenir la qualité de vie des patients. Un tel médicament chélateur, la défériprone, montre des résultats favorables sur la fonction cardiaque et la diminution de la quantité de fer myocardique^(29; 30). Les effets secondaires liés à la prise de défériprone sont des problèmes gastro-intestinaux, des

arthropathies s'accompagnant de douleurs, ainsi que la neutropénie, nécessitant une surveillance hebdomadaire des comptes cellulaires hématologiques⁽¹¹⁾. Finalement, le déférasirox, disponible commercialement depuis 2005, est également un agent chélateur administré par voie orale. De nombreux travaux de recherche ont démontré l'efficacité de ce médicament, mais des études cliniques visant à évaluer l'efficacité et l'innocuité à long terme sont toujours en cours⁽³¹⁻³³⁾.

1.1.4.4.3 Transplantation de moelle osseuse

Le seul traitement disponible à ce jour capable de guérir la thalassémie est la transplantation de CSH provenant de la moelle osseuse. Plus de 1000 transplantations de moelle ont été effectuées à travers le monde jusqu'en 1997⁽¹⁵⁾. Le prérequis à la transplantation est la disponibilité d'un donneur ayant un système d'histocompatibilité HLA (système majeur d'histocompatibilité humain)⁵ identique à celui du patient thalassémique. La procédure consiste à prélever de la moelle osseuse de l'os iliaque du donneur et de l'infuser dans une veine périphérique chez le patient thalassémique ayant subi un traitement de préparation visant à éradiquer son système hématopoïétique et réprimer son système immunitaire⁽³⁴⁾. Le résultat thérapeutique de la transplantation est influencé par l'efficacité du traitement de chélation au moment de la transplantation⁽¹⁰⁾. Une complication possible de ce traitement est la persistance de cellules hématopoïétiques résiduelles du patient thalassémique⁽³⁴⁾. Mentionnons également qu'il existe d'autres approches expérimentales de remplacement de la moelle osseuse tel que la transplantation de sang de cordon ombilical et la transplantation de moelle osseuse intra-utérine⁽²⁷⁾.

1.1.4.4.4 Approches expérimentales

Les principales approches expérimentales incluent la réactivation ou l'augmentation de production d'hémoglobine fœtale (HbF) et la thérapie génique. Brièvement, le raisonnement derrière la thérapie d'induction d'HbF est basé sur le fait que chez les patients thalassémiques ayant une persistance d'HbF, le ratio entre les chaînes α et non- α est balancé permettant une survie prolongée des globules rouges⁽²⁷⁾. Les agents thérapeutiques utilisés sont des médicaments cytotoxiques,

⁵ Système de gènes codant pour des protéines se trouvant sur les membranes de toutes les cellules de l'organisme et servant principalement dans la reconnaissance du soi.

l'érythropoïétine et des analogues des butyrates⁽¹⁰⁾. Certains de ces composés utilisés seuls ou en combinaison ont montré une légère augmentation de l'HbF chez les patients thalassémiques mais dans l'ensemble les études ont été décevantes^(10; 15). La thérapie génique, quant à elle, consiste à corriger la mutation génétique en transférant le gène de β -globine dans une CSH. Cependant, à ce jour, aucune méthode efficace n'a été développée pour le transfert de gènes chez l'humain⁽²⁷⁾.

1.1.4.5 Modèles de souris β -thalassémiques

Les modèles animaux permettent l'amélioration de la compréhension des mécanismes pathophysiologiques et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. La souris est le modèle animal de prédilection pour les maladies humaines en raison de sa similarité biologique suffisante et de la possibilité de modification de son génotype.

Chez la souris, le gène de la β -globine, situé sur le chromosome 7, exprime quatre gènes fonctionnels principaux : $\epsilon\gamma$ et $\beta\text{h}1$, gènes exprimés durant la vie embryonnaire; et, selon l'haplotype, soit β -single ou $\beta 1$ (β -majeur) et $\beta 2$ (β -mineur). Les souris portant l'haplotype Hbb^s possèdent deux gènes identiques β -single et celles exposant l'haplotype Hbb^d produisent deux globines distinctes, β -majeur et β -mineur (Fig. 1.11)⁽³⁵⁾. Le gène β -majeur est responsable d'environ 80% de la production de β -globine adulte, alors que le gène β -mineur n'est responsable que des 20% restants⁽³⁶⁾. Similairement aux autres mammifères, le site d'érythropoïèse murin change au cours du développement embryonnaire, débutant dans le sac vitellin pour passer ensuite par le foie, la rate et finalement prendre place dans la moelle osseuse⁽³⁷⁾. Plusieurs modèles murins répliquant des caractéristiques de la β -thalassémie humaine de sévérité variable sont disponibles à ce jour. Le premier modèle murin, désigné $\text{Hbb}^{\text{th-1}}$ (ou Hbb^{d3th}), est celui qui a été étudié au cours de cette thèse. Ce modèle résulte d'une délétion spontanée du gène de la β -globine majeure⁽³⁵⁾. Environ 60% des souris homozygotes pour cette délétion survivent jusqu'à l'âge adulte et présentent une anémie microcytaire et hypochromique accompagnée d'une sévère anisocytose⁶, poikilocytose⁷ et réticulocytose. Des corps de Heinz sont présents dans un grand

⁶ Terme désignant l'inégalité de la taille des érythrocytes.

⁷ Terme désignant l'inégalité de la forme des érythrocytes.

nombre des érythrocytes circulants. Les souris hétérozygotes exhibent un phénotype semblable au trait thalassémique. Ces souris présentent également des caractéristiques histopathologiques similaires à celles des patients β -thalassémiques telles que la splénomégalie et la présence importante de dépôts de fer dans la rate⁽³⁸⁾. D'autres modèles, tels que Hbb^{th-2} ⁽³⁹⁾, Hbb^{th-3} ⁽³⁶⁾, Hbb^{th-4} ⁽⁴⁰⁾ ont également été développés, respectivement, par la délétion du gène de la β -globine majeure⁽³⁹⁾, la délétion des deux gènes adultes de la β -globine (soit β -majeur et β -mineur)⁽³⁶⁾ ou le remplacement des deux gènes adultes murins de la β -globine par un gène de β -globine humain contenant une mutation⁽⁴⁰⁾. Les animaux homozygotes pour ces trois derniers modèles meurent *in utero*, tandis que les animaux hétérozygotes présentent une anémie variant de modérée à sévère et une diminution importante de leur survie.

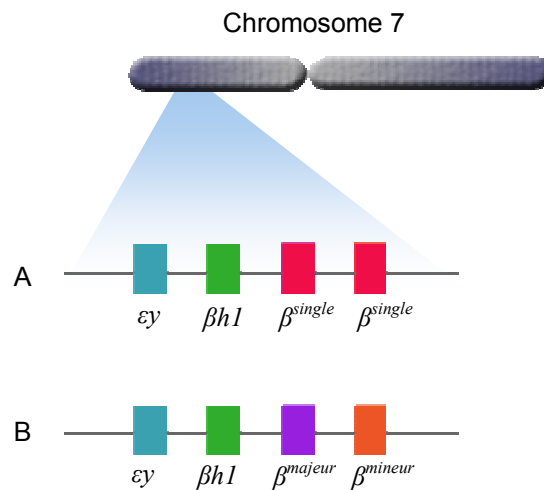


Figure 1.11: Représentation schématique simplifiée du locus de la β -globine chez la souris. A) Haplotype Hbb^s . B) Haplotype Hbb^d .

1.2 PHYSIOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

Le cœur est un muscle strié séparé en deux pompes disposées en série: le cœur gauche qui achemine le sang vers les tissus et organes périphériques ainsi que le cœur droit qui assure l'apport sanguin vers les poumons. Chacune de ces deux moitiés est composée à son tour d'une oreillette et d'un ventricule séparés par une valve tricuspide dans le cœur droit ou une valve mitrale dans le cœur gauche⁽⁴¹⁾ (Fig. 1.12). Les oreillettes et les ventricules gauches et droits sont séparés par un septum nommé respectivement interauriculaire et interventriculaire.

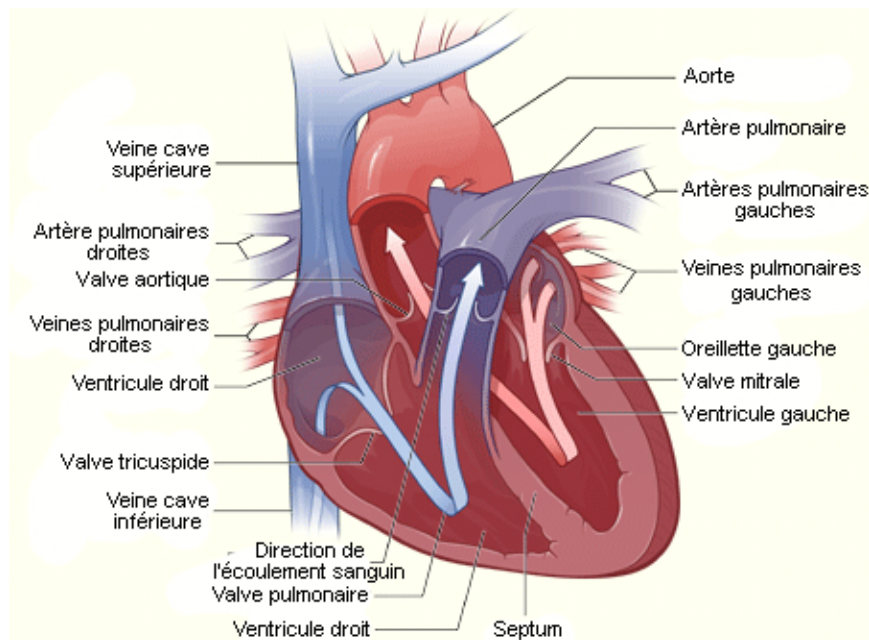


Figure 1.12: Structure cardiaque et direction de la circulation sanguine dans les chambres cardiaques (figure adaptée provenant de <http://www.nhlbi.nih.gov>).

Le sang veineux entre dans l'oreillette droite par les veines caves inférieures et supérieures pour passer ensuite dans le ventricule droit d'où il sera expulsé vers l'artère pulmonaire afin de permettre son oxygénation dans les poumons. Ensuite, le sang oxygéné est acheminé par les veines pulmonaires dans l'oreillette gauche et il est éjecté du ventricule gauche par l'aorte. Ainsi, la circulation se divise en deux grandes parties : la circulation systémique à haute résistance, alimentant tous les tissus du corps, et la circulation pulmonaire à basse résistance⁽⁴²⁾ (Fig. 1.13). Ces circulations

sont composées de systèmes fermés de vaisseaux sanguins. Les phases de contraction et de relaxation ventriculaires sont désignées, respectivement, systole et diastole.

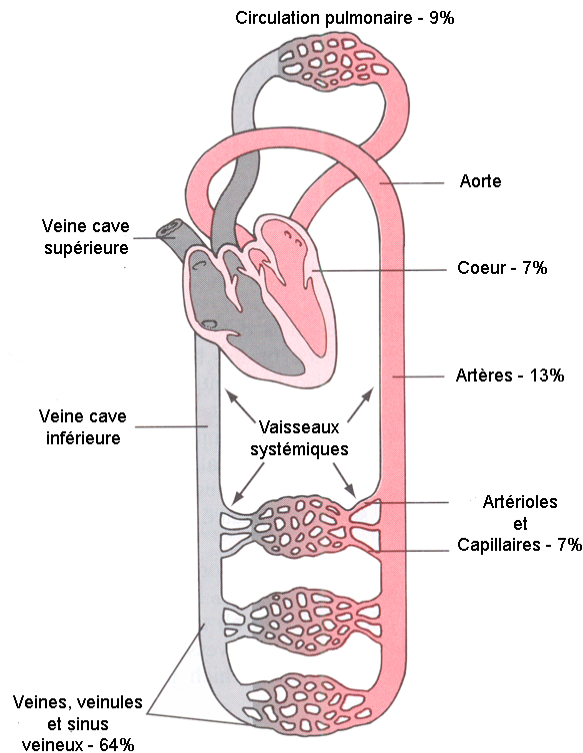


Figure 1.13: Schéma de l'organisation du système cardiovasculaire (adapté de Guyton *et al.*, 2001⁽¹⁾). Les pourcentages indiquent la proportion de sang contenue dans chaque section.

1.2.1 Physiologie vasculaire

Les artères transportent le sang du cœur aux tissus. Elles se séparent ensuite en plus petits vaisseaux pénétrant les organes et se subdivisent en artérioles. Ces dernières régulent le débit en fonction des besoins tissulaires, puisqu'elles possèdent une paroi vasculaire musculaire pouvant dilater ou contracter l'artériole. Les artérioles donnent subséquemment naissance aux capillaires qui sont le site d'échange des gaz, nutriments, électrolytes et autres substances. La paroi capillaire est très mince et expose de nombreux pores perméables à l'eau et à d'autres petites substances moléculaires. Les veinules recueillent le sang des capillaires et rejoignent graduellement les veines qui retournent le sang au cœur. Les veines servent de réservoir de sang et sont exposées à des pressions très faibles.

1.2.1.1 Structure artérielle

La structure et la composition cellulaire générale des vaisseaux sanguins sont similaires à travers l'ensemble du système cardiovasculaire. Ainsi, la paroi de tous les vaisseaux sanguins, à l'exception des capillaires, se compose de trois couches concentriques soit l'intima, la média et l'adventice (Fig. 1.14). L'intima est constituée d'une seule couche de cellules endothéliales posée sur une couche sous endothéliale de tissu conjonctif. L'intima est la barrière principale entre le sang et la paroi vasculaire. La média fournit la résistance mécanique et la force contractile vasculaire. Elle est délimitée par deux couches d'élastine, nommées limitante élastique interne et externe, et est composée principalement de cellules musculaires lisses organisées en unités lamellaires et disposées dans une matrice de fibres d'élastine et de collagène, deux protéines fibreuses⁽⁴³⁾. L'élastine est une protéine aux propriétés remarquablement élastiques. Le collagène est composé de trois chaînes formant une fibre hélicoïdale. De nombreux liens entre les chaînes stabilisent l'hélice et confèrent au collagène sa grande résistance mécanique. L'adventice est une couche de tissu conjonctif contenant du collagène et un peu d'élastine, permettant d'attacher le vaisseau aux tissus environnants.

Ainsi, la paroi vasculaire est principalement composée de cellules endothéliales et musculaires lisses et d'une matrice extracellulaire. Cette dernière est constituée de plusieurs protéines sécrétées par des cellules nommées fibroblastes, comprenant non seulement des fibres d'élastine et de collagène, mais également des protéoglycans, de la fibronectine et de la laminine. Les proportions des éléments de base composant la paroi vasculaire varient à travers le système vasculaire selon les besoins métaboliques et mécaniques⁽⁷⁾ (Fig. 1.15). Ces modifications dans la structure se manifestent principalement dans la média et la matrice extracellulaire. En conséquence, l'aorte et les grandes artères étant des structures principalement élastiques, leur média est riche en couches de fibres d'élastine alternant avec des couches de cellules musculaires lisses. Ce sont les propriétés élastiques des parois vasculaires artérielles qui permettent aux artères de se dilater durant la systole afin d'emmagasiner l'énergie de chaque battement cardiaque. Durant la phase diastolique

du cycle cardiaque, le retour élastique de cette paroi propulse le sang à travers le système vasculaire périphérique.

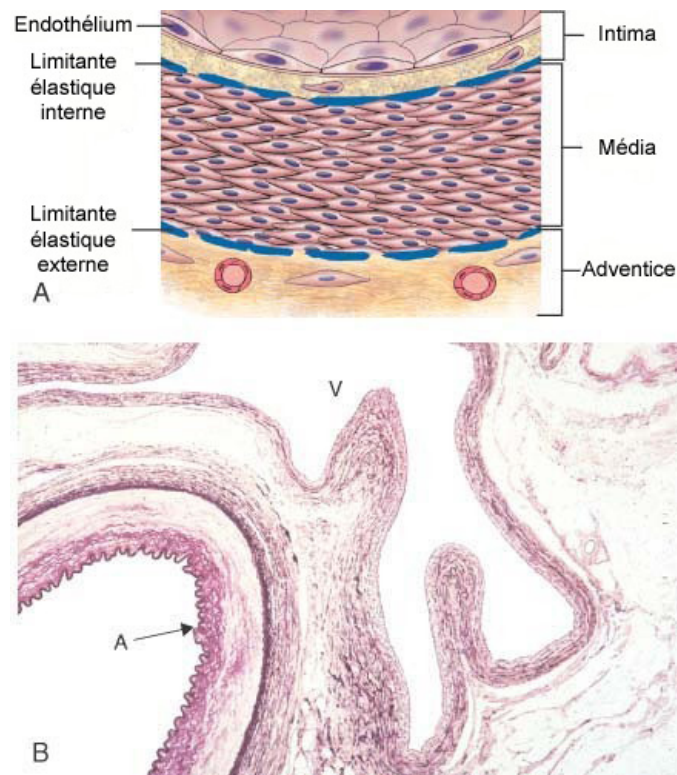


Figure 1.14: Paroi vasculaire. A) Représentation schématique d'une coupe transverse de paroi artérielle. B) Coupe histologique montrant une portion d'artère (A) et d'une veine adjacente (V) (adapté de Kumar *et al.*, 2005 ⁽⁷⁾).

D'autre part, la média artériolaire contient une grande proportion de cellules musculaires lisses qui permettent la régulation de la pression et du débit sanguin local par des modifications du diamètre de la lumière vasculaire. La contraction ou la relaxation des cellules musculaires lisses entraînent respectivement une vasoconstriction ou une vasodilatation. Ces mécanismes sont contrôlés partiellement par le système nerveux autonome ainsi que par des facteurs métaboliques locaux et des interactions cellulaires. Les artérioles sont le site principal de résistance vasculaire à l'écoulement sanguin, entraînant par conséquent une diminution importante de la pression sanguine moyenne au niveau de ces vaisseaux. Ce sont l'élasticité des grandes artères ainsi que la résistance artériolaire qui permettent de transformer le débit

artériel intermittent, causé par l'éjection cardiaque cyclique, en débit constant dans les tissus périphériques.

Chaque artériole se subdivise en de nombreux capillaires formant un réseau arborescent reliant les artérioles aux veinules et permettant un apport sanguin à chaque cellule. Les capillaires, souvent de diamètre inférieur à celui d'un globule rouge (soit $7.8 \mu\text{m}$), se composent d'une seule assise de cellules endothéliales, d'une épaisseur approximative de $1 \mu\text{m}$. Compte tenu de leur nombre élevé, la surface transversale totale de l'ensemble des capillaires est considérable. Subséquemment, la vitesse du sang diminue considérablement lors de son passage dans le réseau capillaire. Toutes ces caractéristiques rendent le réseau capillaire un lieu d'échange optimal pour la diffusion de gaz et molécules tels que l'oxygène, l'eau, les électrolytes, les protéines et les lipides. Les déchets métaboliques tels que le dioxyde de carbone et l'urée peuvent diffuser à leur tour, des tissus vers le sang afin d'être éliminés. Les tissus dont l'activité métabolique est plus élevée possèdent la plus haute densité capillaire.

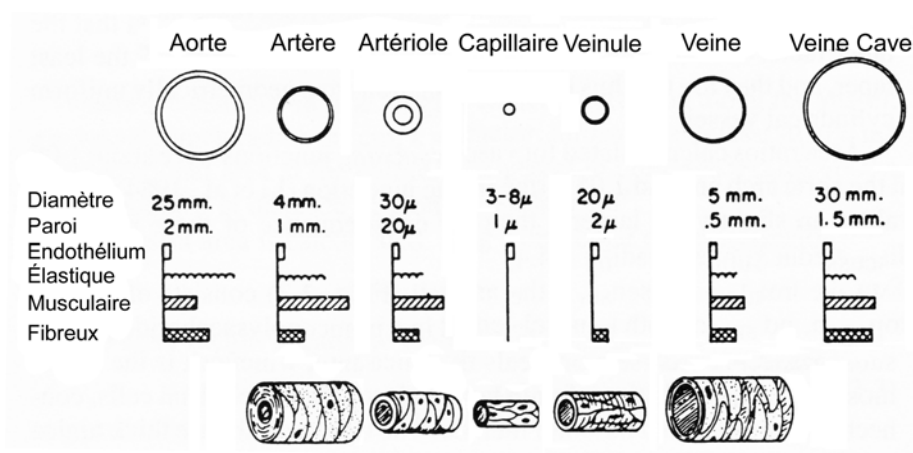


Figure 1.15: Proportions d'élastine, de muscle lisse et de collagène selon le type de vaisseau sanguin (adapté de Li, 2000 et Burton, 1954 ^(44; 45)).

1.2.1.2 Hémodynamique et propriétés vasculaires mécaniques

L'hémodynamique constitue l'étude des caractéristiques physiques gouvernant la circulation sanguine. Le débit à travers un vaisseau sanguin est déterminé par une relation analogue à la loi d'Ohm régissant le courant, le voltage et la résistance. En appliquant cette relation à un écoulement sanguin, le débit dépend de deux facteurs,

soit le gradient de pression du sang entre les deux extrémités du vaisseau et la résistance vasculaire, se définissant comme l'ensemble des forces qui s'opposent à la circulation sanguine. Le débit à travers un vaisseau peut être calculé par la formule suivante :

$$Q = \frac{\Delta P}{R} = \frac{P_1 - P_2}{R} \quad (1)$$

où Q représente le débit sanguin, ΔP la différence de pression entre les deux extrémités 1 et 2 (P_1 et P_2) du vaisseau (considérant que $P_1 > P_2$) et R la résistance vasculaire à l'écoulement. Cette formule montre que le débit sanguin est directement proportionnel au gradient de pression et inversement proportionnel à la résistance.

1.2.1.2.1 Résistance

La loi de Poiseuille est une des relations les plus fondamentales régissant l'écoulement d'un liquide dans un tube cylindrique. Cette relation a été développée pour décrire l'écoulement laminaire⁸ continu d'un liquide Newtonien, c'est-à-dire dont la viscosité est constante, dans un tube cylindrique rigide de section constante. Malgré que ces conditions ne soient pas entièrement respectés (écoulement pulsé, sang non-Newtonien, géométries vasculaires parfois tortueuses et de sections variables), cette relation permet, tout de même, de décrire de manière approximative l'écoulement continu dans la circulation sanguine⁽⁴¹⁾. Ainsi, selon cette relation, la résistance à l'écoulement sanguin est directement proportionnelle à la viscosité sanguine (η) et à la longueur du vaisseau (L), mais elle est inversement proportionnelle au rayon du vaisseau à la puissance 4 (r^4) :

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4} \quad (2)$$

La résistance vasculaire est donc extrêmement sensible au rayon du vaisseau⁽²⁾. De plus, ce sont les artérioles qui contribuent le plus à la résistance vasculaire périphérique en générant jusqu'à 60 % de la résistance, le reste se répartissant à 15% dans les capillaires, 15% dans les veines et 10% dans les artères⁽⁴³⁾. Les artérioles

⁸ L'écoulement laminaire est composé de couches concentriques de sang avançant toutes dans la même direction parallèlement à l'axe du vaisseau.

régulent ainsi la résistance grâce à leur capacité de contrôler activement leur diamètre, principalement par l'intermédiaire des cellules endothéliales qui répondent à divers stimuli et produisent des substances stimulant la contraction ou la dilatation des cellules musculaires lisses contenues dans la média (voir section 1.2.2.1.1). Une constriction généralisée à travers le corps entraîne conséquemment une augmentation importante de la résistance périphérique totale. Ainsi une altération de la régulation du diamètre vasculaire, causée par exemple par un dysfonctionnement endothélial, peut entraîner une modification importante de la résistance à l'écoulement sanguin.

La viscosité apparente⁹ du sang dépend essentiellement de la concentration de cellules sanguines qui exercent une friction sur les cellules adjacentes et la paroi vasculaire, de la concentration du sang en protéines plasmatiques, ainsi que de la déformabilité et de l'agrégation cellulaires⁽⁴⁶⁾. La viscosité sanguine varie généralement en fonction du taux de cisaillement¹⁰ (Fig. 1.16A). De plus, lorsque les globules rouges sont rigidifiés, la viscosité apparente à haut et à bas cisaillement est augmentée⁽⁴⁷⁾ (Fig. 1.16A). L'agrégation des globules rouges augmente aussi la viscosité apparente à bas cisaillement (Fig. 1.16B). La viscosité du sang à hémocrite normal et à haut taux de cisaillement est environ 3 fois celle de l'eau alors que celle du plasma est de 1,5 fois celle de l'eau⁽¹⁾. À bas taux de cisaillement, la viscosité sanguine peut être plus de 100 fois celle de l'eau.

Certaines pathologies, modifiant le nombre, la rigidité ou l'agrégation érythrocytaire, peuvent affecter la viscosité du sang. Chez les patients β -thalassémiques, la viscosité du sang est non seulement affectée par l'hémocrite, mais également par la déformabilité des globules rouges qui est diminuée⁽¹⁰⁾ et par l'agrégation érythrocytaire qui est augmentée⁽⁴⁸⁾ (voir sections 1.1.4.3.1 et 1.3.1).

⁹ Viscosité d'un liquide non-Newtonien mesurée en fonction du taux de cisaillement, à une température fixe.

¹⁰ Force tangentielle qu'exerce chaque couche de sang concentrique en mouvement, parallèle à l'axe du vaisseau, sur la couche de sang adjacente.

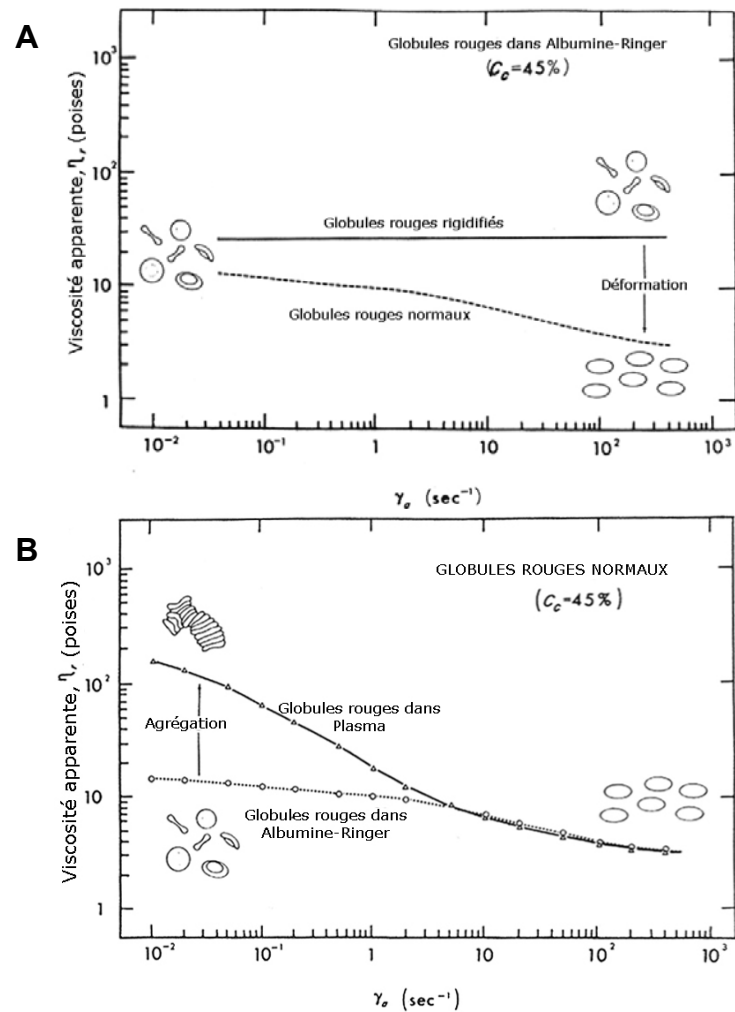


Figure 1.16: Viscosité sanguine apparente (η_r) en fonction du taux de cisaillement ($\dot{\gamma}_0$) (adapté de Chien, 1975⁽⁴⁷⁾). A) Globules rouges humains normaux (ligne pointillée) et rigidifiés (ligne continue) suspendus dans une solution de Ringer et d'albumine. Il n'y a pas d'agrégation érythrocytaire puisqu'il y a absence de plasma et par conséquent de protéines plasmatiques. B) Globules rouges humains normaux suspendus dans le plasma autologue (Δ) et dans une solution de Ringer et d'albumine (\circ). La concentration cellulaire des deux expériences est de 45% et la température de 37°C.

1.2.1.2.2 Pression

La pression artérielle correspond à la force exercée par le sang sur la paroi vasculaire et dépend du volume de sang contenu dans le vaisseau ainsi que de sa compliance (voir section 1.2.1.2.3). Sur la totalité du volume d'éjection systolique entrant dans les artères durant la systole ventriculaire, environ un tiers quitte les artères afin d'entrer dans les artérioles. Durant la phase diastolique, le sang poussé par

le retour élastique vasculaire continue de quitter les artères. Conséquemment, la pression maximale exercée sur les parois artérielles par le sang éjecté durant la phase ventriculaire systolique se nomme pression systolique (P_s) et elle est d'environ 120 mmHg. La pression artérielle minimale lors de l'évacuation du sang en diastole ventriculaire se nomme pression diastolique (P_d) et se situe quant à elle autour de 80 mmHg. La pression artérielle ne baisse jamais à 0 mmHg puisque les contractions cardiaques subséquentes ont lieu avant l'écoulement complet du sang des artères vers les artérioles. Lorsque la pression est moyennée dans le temps elle est désignée pression artérielle moyenne (\bar{P}) et estimée par la formule⁽⁴⁹⁾:

$$\bar{P} = \frac{P_s + 2P_d}{3} \quad (2)$$

La pression artérielle est sensiblement similaire à travers les grandes artères. Cependant, cette pression chute significativement dans les petites artères et artérioles puisque ces dernières exercent une résistance élevée contribuant également à atténuer le caractère pulsatile de la pression. La diminution de la pression continue plus lentement à travers les capillaires et le système veineux (Fig. 1.17).

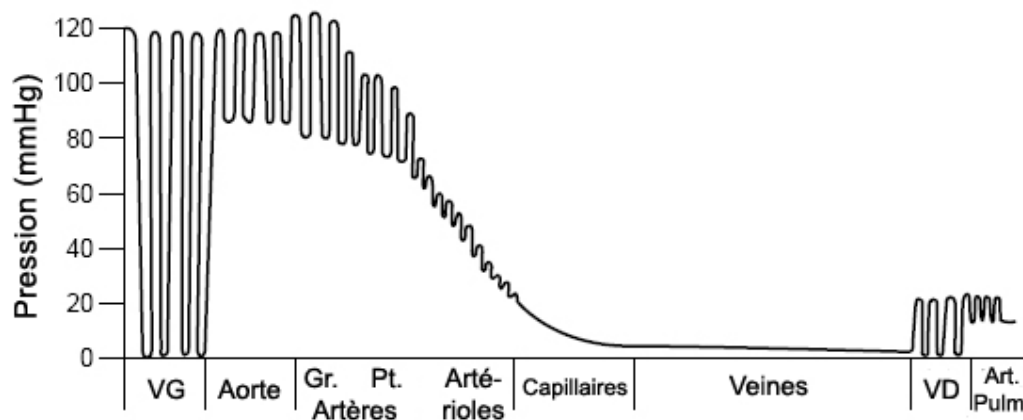


Figure 1.17: Pression artérielle dans la circulation systémique (adapté de résultats de Burton, 1951⁽⁵⁰⁾ ; figure tirée de Porth, 2002⁽⁵¹⁾). VG, ventricule gauche; Gr., grandes; Pt., petites; VD, ventricule droit; Art. Pulm., artère pulmonaire.

1.2.1.2.2.1 Contraintes et déformations circonférentielles

La pression transmurale (P_T) correspond à la différence entre la pression intraluminale (P_i) et celle exercée à l'extérieur du vaisseau (P_e) (Fig. 1.18). La tension pariétale ou contrainte circonférentielle pariétale (σ), représente la force circonférentielle s'exerçant sur la paroi vasculaire et qui s'oppose à la force de distension générée par la pression intraluminale. Lorsque le rayon vasculaire est stable, c'est-à-dire lorsque la paroi vasculaire atteint un état d'équilibre mécanique, la contrainte pariétale contrebalance parfaitement la pression transmurale. La loi de Laplace exprime la relation entre la pression transmurale et la contrainte pariétale (Fig. 1.18):

$$\sigma = P_T r = (P_i - P_e) r \quad (3)$$

Cette relation démontre que la contrainte pariétale vasculaire à l'état d'équilibre mécanique augmente proportionnellement au rayon vasculaire. Afin de prendre en considération l'effet de l'épaisseur de la paroi (h) sur la contrainte pariétale, l'équation de Laplace est modifiée comme suit :

$$\sigma = \frac{(P_i - P_e) r}{h} \quad (4)$$

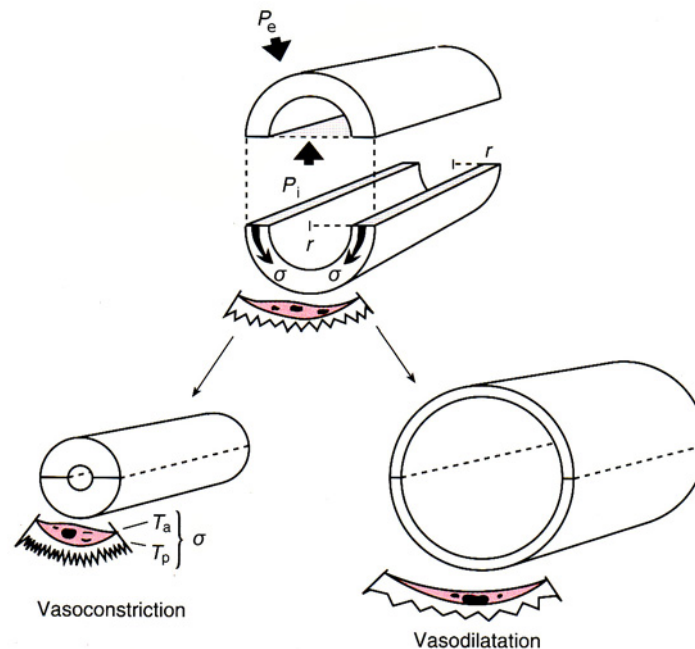


Figure 1.18: Contrainte pariétale et pression dans un vaisseau sanguin cylindrique (adapté de Levick, 2003⁽⁴²⁾). La pression intraluminale (P_i) presse sur la paroi vasculaire, de rayon r , et s'oppose à la pression externe (P_e) et à la contrainte pariétale (σ). La contrainte pariétale est la somme de la tension active des cellules musculaires lisses (T_a) et de la tension des fibres d'élastine et de collagène (montrées comme un ressort) (T_p). Lors de la vasoconstriction, le ressort est dans son état de repos et ce sont les cellules musculaires lisses qui génèrent la tension active. Il y a un transfert de la T_a vers la T_p lors de la vasodilatation.

Ainsi, l'épaississement de la paroi vasculaire entraîne une diminution de la contrainte transmurale. Certaines pathologies telles que l'hypertension artérielle causent une augmentation de la pression transmurale et par conséquent de la contrainte pariétale. À plus long terme, cette situation occasionne une réorganisation et une hypertrophie, ou épaississement, de la paroi vasculaire artérielle permettant de normaliser la contrainte pariétale⁽⁵²⁾.

Afin de comprendre l'influence structurelle de la paroi vasculaire sur la contrainte pariétale, cette dernière peut être divisée en deux composantes, soit la tension active et passive, tel que mentionné plus haut^(42; 45). La tension passive est principalement générée par l'étirement des fibres d'élastine et de collagène contenues dans la paroi. La tension active ne dépend pas, par définition, de l'étirement de la paroi vasculaire, mais plutôt du tonus vasomoteur et, par conséquent, de la

contraction des cellules musculaires lisses vasculaires. Il est à noter que les cellules musculaires lisses contribuent également à la composante passive de la tension. Lors de la vasoconstriction, les cellules musculaires lisses se contractent ce qui augmente dans l'immédiat la contrainte pariétale. Cette situation produit un état de déséquilibre mécanique et une diminution du rayon vasculaire. La loi de Laplace montre que si le rayon diminue, à pression transmurale constante, un nouvel état d'équilibre mécanique ne peut uniquement être atteint qu'en diminuant la contrainte pariétale totale. Cette diminution de la contrainte pariétale est atteinte par une diminution de la tension passive des fibres élastiques lors de la diminution du rayon vasculaire. La vasodilatation produit une cascade inverse de transfert de la tension active vers la tension passive.

La déformation circonférentielle de la paroi vasculaire (ε), quant à elle, est définie comme :

$$\varepsilon = \frac{D - D_0}{D_0} \quad (5)$$

où D est le diamètre interne observé et D_0 est le diamètre interne de repos ou de référence. Généralement, D_0 est défini comme le diamètre du vaisseau rétracté, ne subissant aucune charge, à très basse pression ou à 0 mmHg⁽⁵³⁾.

Le module élastique de Young (E), une mesure quantitative de la rigidité d'un segment unitaire de la paroi vasculaire ou des matériaux constituant cette paroi, représente la relation entre la contrainte pariétale et la déformation circonférentielle :

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (6)$$

Cependant, la relation contrainte-déformation de la paroi vasculaire n'est pas linéaire puisque cette dernière est composée d'éléments de rigidité individuelle variable associés par une organisation structurelle complexe. Ainsi, les fibres d'élastine sont sollicitées aux basses pressions de distension alors que ce sont les fibres de collagène qui sont principalement impliquées à pressions élevées. Par conséquent, il est plus approprié de calculer le module élastique incrémental (E_{inc}) en évaluant, à différents

points de la courbe, la pente de la courbe reliant les contraintes circonférentielles en fonction de la déformation, soit :

$$E_{inc} = \frac{\Delta\sigma}{\Delta\varepsilon} \quad (7)$$

1.2.1.2.3 Compliance

Lorsqu'un vaisseau est soumis à une variation de sa pression intraluminaire, on observe une déformation de sa paroi ayant pour conséquence une augmentation de son volume. La compliance vasculaire (C) réfère à cette capacité de la paroi vasculaire de se distendre par la pression sanguine à laquelle elle est soumise afin de contenir une quantité de sang donnée dans une portion de vaisseau. Elle représente donc une variation de volume sanguin (ΔV) en fonction d'une variation de pression transmurale (ΔP) et peut être formulée :

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P} \quad (5)$$

La distensibilité artérielle se définit comme une compliance normalisée au volume artériel au repos ou non contraint, considéré le plus fréquemment comme le volume artériel en diastole. La compliance et la distensibilité caractérisent les propriétés élastiques vasculaires et sont inversement reliées à la rigidité vasculaire.

Le vieillissement modifie la structure vasculaire ce qui entraîne, par conséquent, une modification de la rigidité artérielle. Ce sont principalement les grandes artères élastiques telles que l'aorte et l'artère carotide qui subissent une rigidification progressive de leur paroi avec l'âge⁽⁵⁴⁾ résultant en une diminution de leur compliance⁽⁵⁵⁾. Ces modifications peuvent s'expliquer par des changements structurels pouvant inclure un épaississement de la média, une augmentation de la quantité de collagène médial ainsi qu'une diminution de la densité des fibres d'élastine⁽⁵⁶⁾.

1.2.2 Physiologie de l'endothélium vasculaire

Les cellules endothéliales forment une monocouche d'une épaisseur de 0.2 à 4 μm recouvrant la face luminale de la totalité du système vasculaire⁽⁵⁷⁾. Ces cellules sont généralement de morphologie squameuse et s'allongent habituellement dans la

direction de l'écoulement sanguin (Fig. 1.19). C'est le cytosquelette de ces cellules endothéliales qui en détermine leur forme et orientation.

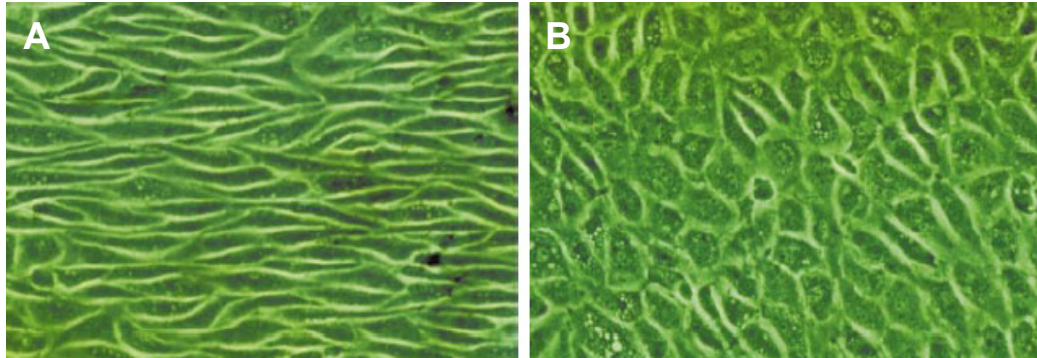


Figure 1.19: Modification de la morphologie des cellules endothéliales en fonction des forces de cisaillement exercées par l'écoulement sanguin (extrait de Malek *et al.*, 1999⁽⁵⁸⁾). Lorsque exposées à une force de cisaillement physiologique (>15 dyne/cm²) (A), les cellules endothéliales aortiques bovines s'alignent et s'allongent en direction de l'écoulement sanguin, contrairement à celles exposées à une faible force de cisaillement (~ 0 à 4 dyne/cm²) (B).

1.2.2.1 Fonctions de l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire représente bien plus qu'une barrière passive entre le sang circulant et la paroi vasculaire. En effet, sa position stratégique lui permet de jouer un rôle d'organe endocrine, paracrine et autocrine indispensable au maintien de l'homéostasie vasculaire. Il remplit ce rôle en surveillant continuellement les stimuli locaux et ceux provenant du sang et en générant, suite aux modifications de son environnement, des réponses immédiates ou à long terme. Ainsi, l'endothélium participe activement, par la sécrétion et l'expression membranaire de molécules spécifiques, dans la modulation du tonus vasculaire, de la perméabilité vasculaire, de l'angiogenèse, de l'hémostase et des processus inflammatoires⁽⁵⁹⁾.

1.2.2.1.1 Régulation du tonus vasomoteur

Les cellules endothéliales détectent de nombreux stimuli environnementaux hémodynamiques dont principalement les forces de cisaillement à la paroi exercées

par l'écoulement sanguin et les forces d'étirement de la paroi générées par les variations de la pression. Ces cellules sécrètent ensuite des médiateurs vasoactifs, relaxants ou constricteurs, qui influencent à leur tour l'hémodynamie vasculaire, régulant ainsi la pression artérielle et le débit sanguin.

1.2.2.1.2 Contrôle de la thrombose et de l'hémostase

L'endothélium vasculaire intact représente une surface principalement non thrombogène qui empêche l'activation de la cascade de coagulation. Les cellules endothéliales exercent ce rôle en sécrétant des substances qui inhibent l'adhésion et l'activation plaquettaire telles que la prostacycline, le NO, l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI), l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA)⁽⁶⁰⁾. D'autres molécules thromborésistantes sont également exprimées à la surface des cellules endothéliales (par exemple, la thrombomoduline, le sulfate d'héparane). Par ailleurs, l'endothélium vasculaire joue un rôle central dans l'hémostase, c'est-à-dire, l'ensemble des mécanismes permettant à prévenir la perte de sang suite à une lésion vasculaire. Ainsi, l'activation des cellules endothéliales entraîne la synthèse de molécules comme le facteur de von Willebrand et le facteur tissulaire PAI-1 qui exercent des propriétés thrombogènes.

1.2.2.1.3 Régulation de l'inflammation

Les cellules endothéliales sont directement liées au développement du processus inflammatoire. En effet, l'endothélium coordonne le recrutement des cellules inflammatoires aux sites d'infection ou de lésion, répondant aux stimuli inflammatoires tels que les cytokines (par exemple, TNF- α et IL-1) et les lipopolysaccharides (LPS), et produit et sécrète des cytokines et facteurs de croissance servant comme signaux de communication aux leucocytes⁽⁶¹⁾. L'endothélium remplit ce rôle en sécrétant des molécules chimiotactiques, telles que l'interleukine-8 et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), qui permettent le recrutement et l'activation des leucocytes et monocytes aux sites d'inflammation⁽⁶²⁾. De plus, de nombreuses molécules d'adhésion inductibles peuvent être exprimées à la surface des cellules endothéliales activées et permettent le rapprochement, l'attachement, le roulement et la transmigration leucocytaire. Ces molécules d'adhérence appartiennent

essentiellement à deux groupes, soit les sélectines (E et P sélectines) et la superfamille des immunoglobulines (ICAM-1, -2, -3, VCAM-1 et PECAM-1).

1.2.2.1.4 *Contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses*

L'endothélium vasculaire produit des activateurs et des inhibiteurs de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire⁽⁶³⁾. En absence d'activation des cellules endothéliales et lorsque la paroi vasculaire est intacte, ces substances sont maintenues en équilibre et l'activité proliférative des cellules musculaires lisses demeure minimale. Les substances anti-prolifératrices produites par l'endothélium incluent notamment le sulfate d'héparane, le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) et le NO⁽⁴¹⁾.

1.2.2.2 **Substances libérées par l'endothélium vasculaire**

De nombreuses molécules permettent à l'endothélium vasculaire d'exercer ses fonctions. Les principales substances libérées sont d'une part les facteurs vasodilatateurs tels que le NO et la prostacycline ainsi que des facteurs vasoconstricteurs incluant l'endothéline et le facteur d'activation des plaquettes (*Tableau I-I*).

1.2.2.2.1 *Monoxyde d'azote (NO)*

C'est au début des années 1980 que Furchgott et Zawadzki ont démontré que l'effet vasodilatateur de l'acétylcholine dépendait de la présence des cellules endothéliales, posant par conséquent l'hypothèse de l'existence d'un facteur vasodilatateur dérivé de l'endothélium⁽⁶⁴⁾. Par la suite, ce facteur était identifié comme étant le NO, reconnu à ce jour comme étant le principal agent vasodilatateur produit par les cellules endothéliales.

Substance	Propriétés	Sécrétion/expression	Précurseur
Monoxyde d'azote (NO)	Agent vasodilatateur ; inhibe l'adhésion leucocytaire ; exerce des propriétés antiplaquettaires ; inhibe la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses	Expression constitutive et inductible. La production est augmentée par la thrombine, l'adénosine diphosphate, les forces de cisaillement et les cytokines	L-arginine
Prostacycline (PGI ₂)	Agent vasodilatateur et antiplaquettaire	Expression constitutive et inductible sur les sites de perturbation vasculaire par des agents pro-inflammatoires	Acide arachidonique
Facteurs hyperpolarisants d'origine endothéliale (EDHF)	Agent vasodilatateur	Induite par l'acétylcholine, la bradykinine et les forces de cisaillement	Divers (par ex. acide arachidonique, ions K ⁺)
Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)	Catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, causant par conséquent une vasoconstriction. Catalyse la dégradation de la bradykinine	A la surface endothéliale	Angiotensine I
Endothéline-1 (ET-1)	Cause la vasoconstriction et la prolifération du muscle lisse vasculaire	Induite par l'hypoxie, les forces de cisaillement et l'ischémie	Prépro-endothéline-1

*Tableau I-I: Principales substances synthétisées par l'endothélium dans le maintien de l'homéostasie (traduit de De Caterina *et al.*, 2007⁽⁵⁷⁾).*

Le NO est une substance diffusible et labile synthétisé lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline, une réaction catalysée par la NO synthase, une enzyme existant sous trois isoformes (Fig. 1.20)⁽⁶⁵⁾. La NOS III, ou NO synthase endothéliale est une enzyme exprimée constitutivement par les cellules endothéliales et produit un taux basal de NO. Les deux autres isoformes sont la NOS I, ou la forme constitutive neuronale et la NOS II, ou la forme inductible permettant la production de grandes quantités de NO durant les réponses inflammatoires⁽⁶⁵⁾. La NOS endothéliale (eNOS) se situe principalement au niveau de la surface interne de la membrane plasmique cellulaire, plus spécifiquement dans les invaginations nommées calvéoles. Elle est activée par des stimuli tels que les contraintes de cisaillement exercées par le flux

sanguin sur la paroi vasculaire ou la présence d'agonistes (par exemple, l'acétylcholine, la bradykinine ou la thrombine)⁽⁶⁶⁾. L'enzyme peut être inhibée de manière compétitive par des analogues inactifs de la L-arginine tels que le L-nitro-arginine méthylester (L-NAME) et le N-monométhyl L-arginine (L-NMMA). En diffusant vers le muscle lisse vasculaire, le NO induit sa relaxation et par conséquent la dilatation vasculaire. Il inhibe également la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses. De plus, la libération du NO dans la lumière vasculaire inhibe l'agrégation plaquettaire.

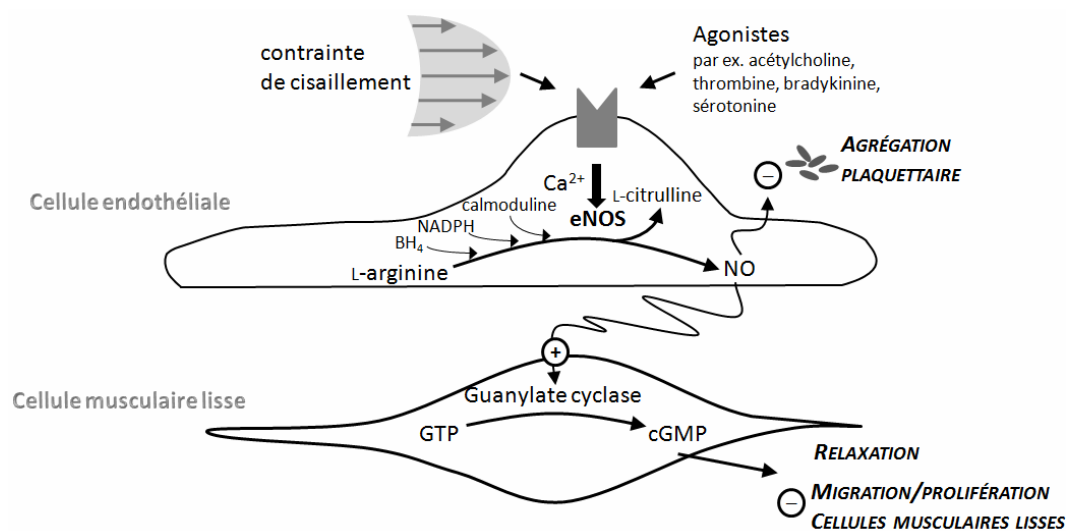


Figure 1.20: Représentation schématique des voies de signalisation du monoxyde d'azote (NO). Les contraintes de cisaillement et l'activation de récepteurs endothéliaux induisent une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium dans le cytoplasme des cellules endothéliales. Cette augmentation active la NO synthase endothéliale (eNOS) et mène à la libération de NO. Le NO diffuse jusqu'aux cellules musculaires lisses et provoque leur relaxation en activant la formation de guanosine monophosphate cyclique (cGMP) à partir de la guanosine triphosphate (GTP) par l'intermédiaire de la guanylate cyclase. NADPH, nicotinamide adénine diphosphate; BH_4 , tétrahydrobioptérine

1.2.2.2.2 Prostacycline

La prostacycline ou prostaglandine I₂ est un autre important facteur vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Elle est principalement produite par les cellules endothéliales vasculaires, cependant, contrairement au NO, son activité nécessite l'expression de récepteurs spécifiques au niveau des cellules musculaires lisses⁽⁶⁷⁾. Ainsi, la prostacycline ne peut agir comme facteur vasodilatateur dépendant de l'endothélium dans les réseaux artériels n'exprimant pas ce type de récepteurs. Cette molécule est dérivée de l'acide arachidonique et produite par l'intervention des cyclo-oxygénases. La prostacycline provoque la relaxation de certaines cellules musculaires lisses par l'intermédiaire de récepteurs couplés à l'adénylate cyclase, enzyme augmentant la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC).

1.2.2.2.3 Facteurs hyperpolarisants d'origine endothéliale (EDHF)

Des études expérimentales ont démontré que des agonistes, tels que l'acétylcholine, peuvent entraîner la dilatation vasculaire dépendante de l'endothélium par l'intermédiaire de facteurs autres que le NO et la prostacycline⁽⁶⁸⁾. Ce facteur est associé avec l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses et il est désigné facteur hyperpolarisant d'origine endothéliale, ou EDHF (« endothelium-derived hyperpolarizing factor »). Dans certaines conditions, plus particulièrement dans les artérioles de résistance, l'EDHF peut assurer la relaxation dépendante de l'endothélium lorsque la synthèse de NO endothélial est inhibée par une molécule pharmacologique ou génétiquement inactivée^(57; 68). L'action vasodilatatrice de l'EDHF implique l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendants de la membrane cellulaire endothéliale et une augmentation de la concentration intracellulaire en ions calciques⁽⁶⁸⁾. À ce jour, la nature exacte des EDHF demeure imprécise, cependant plusieurs produits cellulaires endothéliaux tels que les ions potassiques⁽⁶⁹⁾, des métabolites de l'acide arachidonique⁽⁷⁰⁾ et le peroxyde d'hydrogène⁽⁷¹⁾, peuvent causer de telles hyperpolarisations. Des contacts directs par le biais des jonctions intercellulaires, ou jonctions gap, entre l'endothélium et les cellules musculaires lisses peuvent également contribuer à ce type de réponse vasodilatatrice⁽⁷²⁾.

1.2.2.2.4 Endothéline-1

L'endothéline-1 est une puissante substance vasoconstrictrice synthétisée par les cellules endothéliales. Elle exerce son action biologique par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques nommés ET_A et ET_B exprimés par les cellules musculaires lisses. La stimulation des récepteurs ET conduit à la contraction vasculaire par deux mécanismes, soit une augmentation de l'entrée de calcium intracellulaire et une activation de la phospholipase C et A_2 ⁽⁵⁷⁾. La production d'endothéline-1 peut être stimulée par l'hypoxie, l'angiotensine II, la vasopressine et la thrombine et peut provoquer, en plus de la réponse contractile, une réponse proliférative^(41; 42).

1.2.2.3 Endothélium et remodelage vasculaire

À court terme, les modifications physiologiques et pathologiques des forces hémodynamiques appliquées à la paroi vasculaire, telles que le cisaillement, produisent généralement une réponse vasomotrice, constrictrice ou dilatatrice, médiée par l'endothélium vasculaire. Cependant, une perturbation chronique des forces hémodynamiques entraîne une activation de l'endothélium conduisant à un processus adaptatif de modification morphologique de la paroi vasculaire, caractérisé par un changement compensateur de diamètre et d'épaisseur de la paroi, nommé également remodelage⁽⁷³⁾. Le processus de remodelage vasculaire implique au moins quatre types de mécanismes cellulaires, soit la prolifération, la migration et la mort cellulaire ainsi que la production ou la dégradation de la matrice extracellulaire⁽⁷⁴⁾.

Ainsi, une augmentation soutenue des forces de cisaillement, occasionnée par exemple par un débit sanguin accru, est détectée par les mécanorécepteurs de l'endothélium et induit la synthèse et la libération de facteurs de croissance, ainsi que la différenciation des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Ces deux derniers types cellulaires modulent également la structure et la composition de la matrice extracellulaire en produisant des enzymes impliquées dans la dégradation de cette matrice. L'ensemble de ces modifications entraîne une augmentation du diamètre vasculaire luminal et/ou une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire ayant pour effet final la normalisation des forces de cisaillement. Ainsi, la phase initiale de formation de la plaque d'athérosclérose illustre l'importance de ce dernier phénomène puisqu'elle implique un remodelage positif caractérisé par une augmentation

compensatoire de la lumière vasculaire. Ce mécanisme connu également sous le nom de « phénomène de Glagov » permet le maintient des forces de cisaillement à des valeurs normales et se reflète par une absence de sténose dans la lumière tant que la surface de la lésion n'excède pas 40% de la surface vasculaire⁽⁷⁵⁾. Le type de remodelage vasculaire subséquent dépendra du type de stimuli appliqué à la paroi (Fig. 1.21).

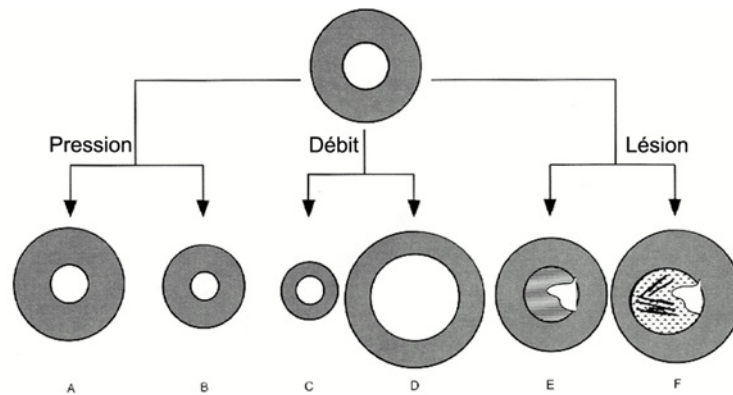


Figure 1.21: Remodelage vasculaire en fonction du stimuli appliqué (adapté de Gibbons *et al.*, 1994⁽⁷⁴⁾). L'hypertension peut entraîner une diminution du diamètre intravasculaire (B) pouvant également s'accompagner d'un épaississement de la paroi (A). La diminution ou l'augmentation chronique du débit sanguin peuvent occasionner respectivement une réduction (C) ou un accroissement (D) des dimensions vasculaires. Une lésion vasculaire peut entraîner la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima, processus également nommé hyperplasie néointimale (E). Le vaisseau F montre la formation d'une lésion d'athérosclérose.

1.2.2.4 Dysfonction endothéliale

Considérant toutes les fonctions physiologiques de l'endothélium vasculaire décrites ci-dessus, une définition simple de la dysfonction endothéliale est l'altération ou la détérioration des réponses vasomotrices, de l'agrégation plaquettaire, de la prolifération cellulaire (plus particulièrement du muscle lisse vasculaire) ou encore des interactions plaquettes-endothélium et leucocytes-endothélium. La dysfonction endothéliale est associée à plusieurs processus physiologiques et pathologiques telles que le vieillissement, l'inflammation, le diabète, l'hypertension artérielle et l'athérosclérose^(68; 76).

1.2.2.4.1 Mécanismes de dysfonction endothéliale

Généralement, la dysfonction endothéliale se traduit par une diminution de la biodisponibilité de NO et/ou un déséquilibre dans la production par l'endothélium de substances dilatatrices et constrictrices⁽⁶⁷⁾. La baisse de la biodisponibilité de NO peut signifier d'une part une diminution de sa production ou une augmentation de sa dégradation.

Une baisse de la production du NO peut résulter de diverses étapes de sa cascade de synthèse, soit :

- 1) Une déficience du substrat pour l'enzyme eNOS, c'est-à-dire l'acide aminé L-arginine, possiblement causée par une augmentation de l'expression d'arginases⁽⁷⁷⁾ ou la présence d'un antagoniste compétitif endogène de ce substrat, nommé ADMA (« asymmetric dimethyl arginine »)⁽⁷⁸⁾.
- 2) Une modification de la biodisponibilité de la tétrahydrobioptérine (BH₄), un cofacteur essentiel au fonctionnement de la eNOS⁽⁷⁹⁾.
- 3) Une diminution de l'expression de l'enzyme eNOS. Bien qu'eNOS soit une enzyme constitutive, son expression génique peut être modifiée par des agents pharmacologiques et des situations physiologiques. La modulation de l'expression se fait par l'intermédiaire d'une baisse du taux de transcription du gène ou une diminution de la demi-vie de l'ARNm. À titre d'exemple, une exposition de cellules endothéliales en culture au TNF- α ou à l'hypoxie, diminue le taux d'expression de eNOS⁽⁸⁰⁾.
- 4) L'absence de substrat ou de BH₄ peuvent également mener au « découplage » fonctionnel de la eNOS, formée par un complexe homodimérique, aboutissant ainsi à la formation d'anions superoxydes (O₂-)⁽⁷⁷⁾.
- 5) Une modification des voies de signalisation de la eNOS mettant en jeu des processus de phosphorylation, d'associations protéiques (plus particulièrement, avec la calvéoline et le complexe calcium-calmoduline) et d'activation par des récepteurs couplés à la protéine G⁽⁸¹⁾.

D'autre part, la diffusion du NO se fait uniquement dans un rayon d'une centaine de micromètres⁽⁷⁶⁾. Sa dégradation est essentiellement exercée par les O₂⁻. La réaction entre l'O₂⁻ et le NO se fait à un taux trois fois plus rapide que la dismutation des O₂⁻ par les superoxydes dismutases (SOD)⁽⁸¹⁾. En outre, les espèces réactives d'oxygène peuvent également inhiber les voies de signalisation des deux autres substances vasodilatatrices dépendantes d'oxygène, c'est-à-dire la prostacycline et l'EDHF. Ainsi, le stress oxydatif, ou déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène et les systèmes de défense anti-oxydants, joue un rôle important dans le dysfonctionnement vasculaire et la pathogenèse de maladies vasculaires dont l'hypertension et l'athérosclérose⁽⁵⁷⁾. Les sources potentielles de production d'espèces radicalaires de l'oxygène spécifiques à la dysfonction endothéliale sont les NADH/NADPH oxydases, les eNOS et la xanthine-oxydase⁽⁵⁷⁾.

1.2.2.4.2 Méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale

L'étude des effets vasomoteurs dépendants de l'endothélium est un outil indispensable pour l'évaluation de son intégrité fonctionnelle. Les méthodes d'évaluation de la fonction endothéliale emploient une variété de techniques afin de mesurer les réponses vasodilatatrices ou vasoconstrictrices résultant de stimuli pharmacologiques ou physiques tels que l'acétylcholine, la méthacholine, la bradykinine, la sérotonine et les contraintes de cisaillement. Ces réponses sont habituellement comparées avec des conditions de base ou témoin, ainsi que celles générées par des vasodilatateurs indépendants de l'endothélium. Cette dernière méthode permet non seulement d'évaluer la capacité de dilatation du muscle lisse vasculaire mais elle indique également la limite supérieure de la réponse vasodilatatrice.

En clinique, les principales méthodes invasives impliquent l'évaluation par angiographie coronaire quantitative des modifications de diamètre ou de débit en réponse à l'administration locale, par cathéter, de substances vasoactives au niveau des artères coronaires. Les méthodes non invasives reposent notamment sur l'évaluation par pléthysmographie ou échographie à haute résolution de l'augmentation de diamètre dépendante de l'endothélium, en réponse à l'augmentation du débit régional dans l'artère brachiale^(82; 83). La dilatation débit-

dépendante est générée par hyperémie post-ischémique en aval¹¹ du site d'évaluation ou par chauffage cutané distal.

Chez l'animal, l'étude de la fonction endothéliale se fait principalement *in vitro* au niveau des artères de résistance et même des artères de conductance chez les animaux de petite taille. Les deux méthodes employées le plus fréquemment sont l'étude par myographe d'anneaux isolés de petites artères et celle par artériographe de vaisseaux sanguins sous pression et débit contrôlé. La première consiste à fixer l'anneau vasculaire entre deux filaments, l'un étant relié à un support fixe et l'autre à un micromètre et un capteur de force. L'étude de la vasomotricité du vaisseau se fait en mesurant la tension et les dimensions du segment en réponse à l'application d'agents pharmacologiques. Pour la deuxième méthode (Fig. 1.22), le segment vasculaire est canulé, à ses deux extrémités, sur des micropipettes en verre à l'intérieur d'une chambre à organe. La pression intraluminale est contrôlée grâce aux micropipettes et au système de servo-contrôle. Le diamètre du vaisseau et l'épaisseur de ses parois sont mesurés suite à l'application d'agents pharmacologiques ou à une modification de débit.

¹¹ L'ischémie d'aval est généralement réalisée par le gonflement d'un brassard pneumatique à une pression supérieure à la pression systolique. L'occlusion entraîne une diminution de résistance vasculaire locale suite à l'ischémie. Cette faible résistance occasionne une augmentation du débit, caractéristique de l'hyperémie post-ischémique, lors du dégonflement rapide du brassard.

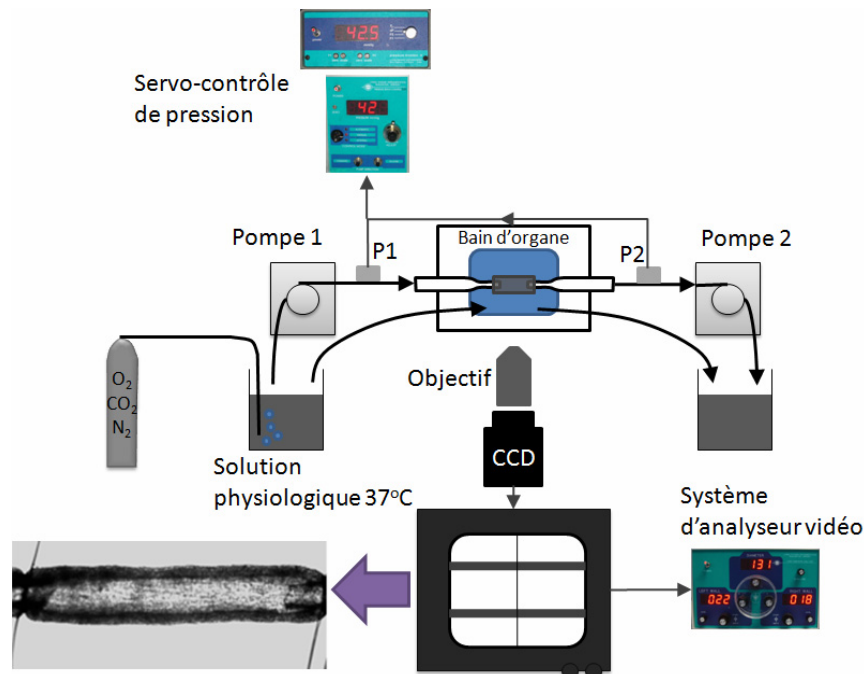


Figure 1.22: Artériographie pour l'évaluation de la fonction endothéliale de vaisseaux sanguins pressurisés. La petite artère est canulée sur des micropipettes de verre à l'intérieur du bain d'organe. Ces micropipettes permettent la perfusion à l'intérieur du vaisseau. La pression est maintenue grâce au système de servo-contrôle qui détecte la pression venant des capteurs P1 et P2 et contrôle en conséquence la vitesse de rotation des deux pompes. Il est à noter que le système peut également être utilisé en circuit fermé, c'est-à-dire en l'absence de débit intravasculaire. Le diamètre du vaisseau et les épaisseurs de sa paroi sont mesurés à partir de son image, transmise par une caméra CCD à un analyseur vidéo.

1.2.3 Physiologie cardiaque

La paroi cardiaque est composée de trois couches distinctes, soit l'endocarde, une mince couche de cellules endothéliales tapissant la face interne de la paroi, le myocarde et l'épicarde, la couche externe de la paroi composée de cellules épithéliales et de tissu conjonctif. La contraction cardiaque est assurée par le myocarde, un ensemble de cellules musculaires striées spécialisées, nommées myocytes, qui se regroupent en faisceaux au moyen de jonctions, nommées disques intercalaires. Ces cardiomyocytes contiennent cinq éléments principaux : 1) la membrane cellulaire, ou sarcolemme, et ses tubules T, nécessaire à la conduction des influx nerveux à l'ensemble de la cellule ; 2) le réticulum sarcoplasmique, un réservoir à calcium indispensable à la contraction ; 3) les mitochondries, fournissant à la cellule, au moyen

du cycle respiratoire, l'énergie sous forme d'ATP ; 4) le noyau cellulaire; et 5) les sarcomères ou l'unités contractiles du myocyte. Les sarcomères joints bout à bout, en série, forment des fibres contractiles d'environ 1 μm de diamètre, nommés myofibrilles. Ces unités sont composées d'un arrangement spécifique de protéines contractiles formant des filaments épais constitués principalement de myosine et des filaments fins contenant de l'actine (Fig. 1.23). De plus, les sarcomères contiennent également des protéines régulatrices de troponine et de tropomyosine. Les cardiomyocytes contiennent de nombreuses myofibrilles disposées en parallèle et donnant l'apparence striée à ces cellules.

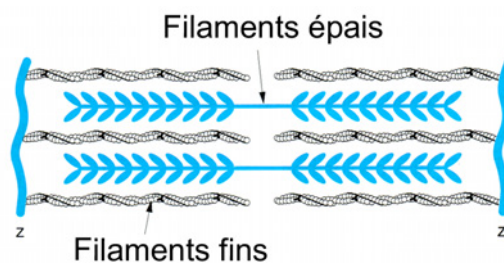


Figure 1.23: Structure du sarcomère (adapté de Fuster *et al.*, 2008⁽⁴¹⁾).

La contraction du myocarde est secondaire au raccourcissement des sarcomères qui se produit grâce au glissement des filaments d'actine entre les filaments de myosine vers le centre du sarcomère, suite à la formation de ponts d'actomyosine en présence de magnésium et d'ATP. Cette formation de ponts devient possible grâce à l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre initiée par le potentiel d'action cardiaque. La relaxation du myocarde découle de la diminution du calcium libre cytosolique qui entraîne le détachement des points et le retour des filaments fins et épais à leur position initiale.

1.2.3.1 Débit cardiaque

Le débit cardiaque est ajusté en fonction des besoins tissulaires en oxygène et nutriment. Ce débit dépend principalement de quatre facteurs : la pré-charge, la post-charge, l'état inotrope du myocarde et la fréquence cardiaque⁽⁴¹⁾.

1.2.3.1.1 Précharge

La précharge, un déterminant majeur du volume d'éjection systolique, correspond à la longueur des cardiomyocytes au repos ou avant leur contraction. La

longueur des sarcomères en fin de diastole varie entre 1.6 et 2.2 μm , dépendant en partie de la tension ou de l'étirement initial exercée sur le myocarde⁽⁷⁾. La force contractile est considérablement réduite dans les sarcomères courts puisque le chevauchement entre les filaments d'actine et de myosine est plus grand. Inversement, la contractilité est plus élevée dans les sarcomères plus longs. Ce phénomène est décrit par la loi de Frank-Starling qui stipule que la force de contraction des ventricules est directement modulée par le volume de sang présent au moment de la phase de remplissage⁽⁷⁶⁾. Ainsi, une augmentation du volume de sang en fin de diastole entraîne une force de contraction accrue durant la systole et conséquemment une élévation du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque. Cependant, lorsque la limite physiologique du muscle myocardique est atteinte, la force de contraction est diminuée puisque l'efficacité du chevauchement entre les filaments d'actine et de myosine est réduite. Le remplissage de la cavité ventriculaire génère une pression qui dépend du volume exerçant l'étirement sur la paroi ainsi que de la compliance du myocarde.

1.2.3.1.2 Post-charge

La post-charge représente la tension dans la paroi ventriculaire s'exerçant sur les cardiomyocytes durant la contraction qui résiste à l'éjection ventriculaire. Elle est déterminée par la résistance périphérique totale à l'écoulement sanguin et la dimension de la chambre cardiaque. La loi de Laplace (voir section 1.2.1.2.2.1) montre qu'un élargissement de la cavité ventriculaire accroît la tension de la paroi ce qui augmente le travail cardiaque nécessaire à la contraction. Une augmentation de la post-charge occasionne une diminution du volume d'éjection systolique et par conséquent du débit cardiaque. En clinique, la pression artérielle systémique est mesurée afin d'évaluer la post-charge du ventricule gauche, alors que la pression artérielle pulmonaire est considérée comme étant la post-charge du ventricule droit.

1.2.3.1.3 État inotrope

L'état inotrope cardiaque réfère à la capacité du myocarde de modifier sa force de contraction sans altérer la longueur diastolique ou de repos des cardiomyocytes qui le composent. Il est déterminé par les propriétés biochimiques et biophysiques régissant les interactions entre les filaments d'actine et de myosine des

cardiomyocytes. La concentration de calcium libre cytosolique est le principal déterminant de l'état inotrope cardiaque. La stimulation cardiaque par le système nerveux sympathique et certains agents pharmacologiques, tels que les agonistes bêta-adrénergiques et les digitaliques, ont un effet inotrope positif, ce qui entraîne une augmentation du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque. D'autre part, l'hypoxie exerce un effet inotrope négatif en interférant dans la production de l'ATP essentiel à la contraction musculaire.

1.2.3.1.4 Fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque représente le nombre de contractions ventriculaires par minute. Dans des conditions normales, le débit cardiaque augmente proportionnellement avec la fréquence cardiaque. Le débit cardiaque est diminué au-delà d'une certaine fréquence cardiaque, c'est-à-dire environ 160 battements par minute chez l'humain, puisque le temps de remplissage ventriculaire diastolique est raccourci ce qui diminue le volume d'éjection systolique.

1.2.3.2 Remodelage cardiaque

Le cœur possède une capacité d'adaptation lui permettant d'accroître ou de rétrécir sa taille en réponse à des demandes environnementales et une variété de stimuli. L'exercice, la grossesse et la croissance post-natale stimulent la croissance physiologique du cœur. D'autre part, l'activation neurohumorale, l'hypertension artérielle et une lésion myocardique causent une croissance hypertrophique pathologique⁽⁸⁴⁾. Le remodelage cardiaque peut se définir comme une série de modifications moléculaires, cellulaires et interstitielles (matrice extracellulaire) qui se manifestent cliniquement par des changements de taille, de forme et de fonction du cœur⁽⁸⁵⁾. Le remodelage est un processus dynamique et complexe impliquant principalement les cardiomyocytes mais également à un moindre niveau les fibroblastes et cellules endothéliales⁽⁸⁶⁾.

L'accroissement de la taille du cœur, désigné hypertrophie cardiaque, est principalement déterminée au niveau cellulaire par une interaction entre deux processus, soit l'hypertrophie ou l'augmentation de la taille des cellules et l'hyperplasie ou l'accroissement du nombre de cellules (Fig. 1.24A)^(41; 87). Cependant, il est

important de noter que l'apoptose ou la mort cellulaire programmée peut également intervenir dans les mécanismes de remodelage et d'hypertrophie cardiaques, en réponse aux stimuli pathologiques⁽⁴¹⁾. En effet, l'apoptose des myocytes entraîne une augmentation de la charge biomécanique sur les myocytes subsistants et peut ainsi contribuer à l'altération de la géométrie cardiaque⁽⁸⁸⁾. L'apoptose est également impliquée dans le mécanisme de décompensation de l'hypertrophie cardiaque vers l'insuffisance cardiaque, tel que décrit à la section 1.2.3.2.2.

L'hypertrophie physiologique, en réponse au conditionnement athlétique, est généralement associée à une augmentation proportionnelle de la longueur et de la largeur des myocytes. D'autre part, l'hypertrophie excentrique est caractérisée par une augmentation de la longueur des cardiomyocytes suite à l'assemblage en série de sarcomères supplémentaires (Fig. 1.24B). Ce type d'hypertrophie est secondaire à une surcharge de volume et se présente chez les patients atteints de myocardiopathie dilatée^(84; 87; 89). L'épaisseur relative de la paroi ventriculaire peut être normale, diminuée ou augmentée⁽⁸⁴⁾. En outre, une surcharge de pression telle que dans le cas de l'hypertension artérielle produit une augmentation importante de la tension exercée sur la paroi ventriculaire et mène au développement de l'hypertrophie concentrique. Au niveau cellulaire, ce type d'hypertrophie se caractérise par une augmentation de l'épaisseur des cardiomyocytes suite à l'assemblage en parallèle de nouveaux sarcomères et un épaississement de la paroi ventriculaire (Fig. 1.24B)^(41; 84; 87; 89). Au niveau de la matrice extracellulaire, le remodelage cardiaque conduit à une augmentation du dépôt de collagène, caractéristique de la fibrose, élément clé de l'hypertrophie pathologique⁽⁹⁰⁾.

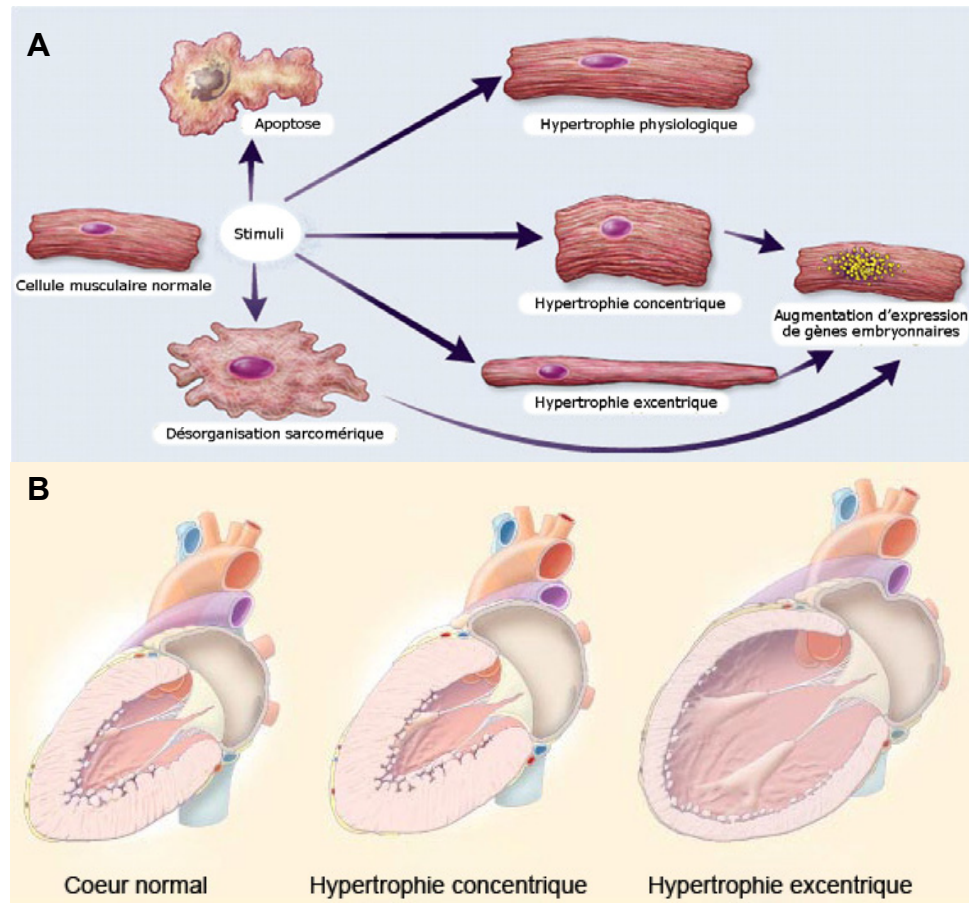


Figure 1.24: Hypertrophie cardiaque et morphologie des cardiomyocytes (A) (adapté de Hunter *et al.*, 1999⁽⁸⁷⁾) ainsi que de l'ensemble de la paroi ventriculaire (B) (adapté de Jessup *et al.*, 2003⁽⁸⁹⁾). La morphologie des cardiomyocytes est modifiée en réponse à de nombreux stimuli de croissance. L'expression de gènes fœtaux tels que ceux des peptides natriurétiques est augmentée dans l'hypertrophie concentrique et excentrique, mais non dans l'hypertrophie physiologique, c'est-à-dire en réponse à l'exercice physique.

1.2.3.2.1 Mécanismes moléculaires de l'hypertrophie cardiaque

Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation conduisant au remodelage cardiaque, et par conséquent à l'hypertrophie cardiaque, sont multiples (Fig. 1.25). Les facteurs principaux impliqués sont la stimulation neurohormonale, tels que la norépinéphrine ou l'angiotensine II, et la stimulation mécanique par l'intermédiaire de l'étirement des cardiomyocytes. La transduction des signaux mécaniques à travers la membrane cellulaire n'est pas à ce jour entièrement connue, cependant elle implique probablement des canaux ioniques sensibles à l'étirement, des

intégrines et d'autres protéines structurelles formant un réseau complexe qui relie la matrice extracellulaire, le cytosquelette, les sarcomères, les protéines régulant la concentration calcique et le noyau⁽⁹¹⁾. Une altération de l'équilibre de la concentration du calcium intracellulaire libre est impliquée dans une majorité des voies de signalisation du remodelage induites par le stress neurohormonal⁽⁸⁴⁾. Plusieurs molécules de signalisation dépendantes du calcium, incluant les protéines kinases dépendantes du calcium et les MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») participent dans la transduction de ce signal hypertrophique. En amont de ces voies, la transduction du signal s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G ou l'activation de la voie de signalisation de PI3-kinase/Akt⁽⁸⁴⁾. L'activation de la voie de la calcineurine, une phosphatase activée uniquement par une forte augmentation de la concentration calcique, est également impliquée dans la pathogenèse de l'hypertrophie cardiaque en réponse à la surcharge de pression⁽⁹²⁾.

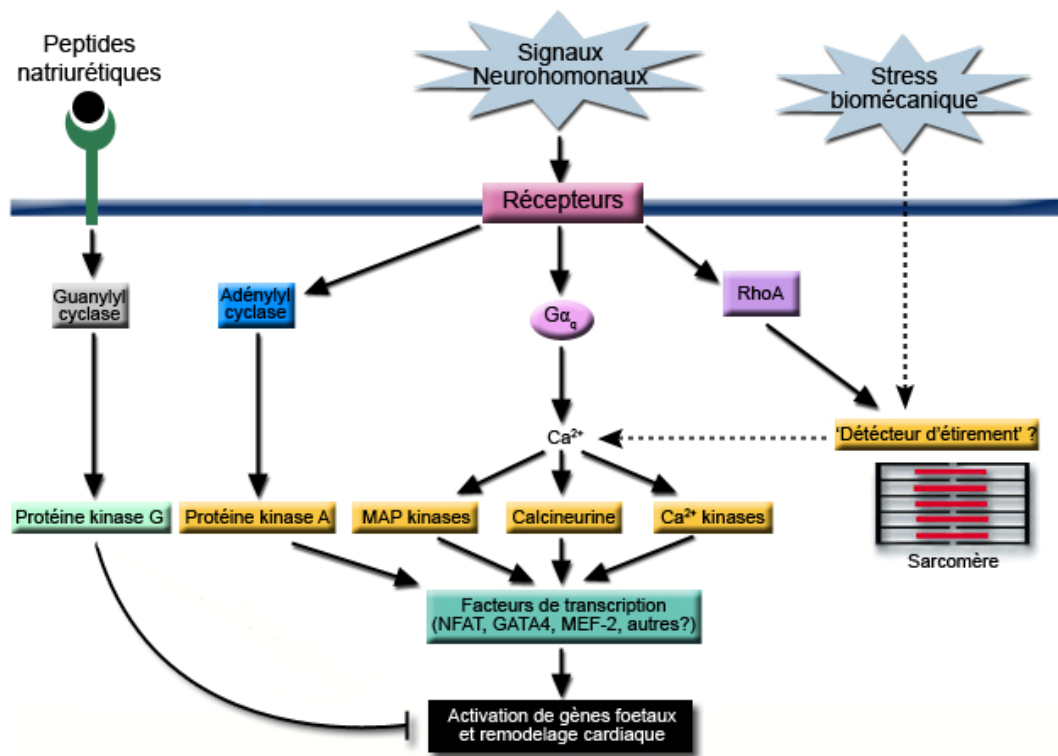


Figure 1.25: Voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque (adapté de Olson, 2004 ⁽⁹³⁾). Des signaux neurohormonaux (tels que la norépinéphrine, l'angiotensine II et l'endothéline 1) ou le stress biomécanique (secondaire à l'étirement) peuvent causer l'hypertrophie qui se caractérise par un remodelage cardiaque et une activation de l'expression de gènes fœtaux. Les voies de signalisation sont multiples et interagissent entre elles afin de modifier, par l'intermédiaire d'une multitude de facteurs de transcription, l'expression génique.

1.2.3.2.2 Transition entre l'hypertrophie cardiaque compensée et l'insuffisance cardiaque

L'augmentation chronique du travail cardiaque résulte éventuellement dans la diminution de la contractilité et de la capacité de relaxation du cœur hypertrophié. L'hypertrophie compensée est caractérisée par des anomalies fonctionnelles de la chambre cardiaque tout en maintenant une fonction préservée du muscle cardiaque et plus spécifiquement des myocytes. Cette hypertrophie évolue en une phase décompensée qui est caractérisée par des anomalies fonctionnelles de la chambre

cardiaque, du muscle cardiaque et des myocytes. D'un point de vue simplifié, le passage vers un état décompensé d'insuffisance cardiaque indique l'atteinte des limites moléculaires et phénotypiques des processus adaptatifs. La stimulation subséquente de voies de signalisation de l'hypertrophie déjà surstimulées fait basculer la balance des signaux de croissance cellulaire vers ceux de la mort cellulaire. La perte des cardiomyocytes et leur remplacement par du tissu fibreux diminue la performance contractile et mène vers une détérioration fonctionnelle irréversible, l'insuffisance cardiaque et ultimement la mort⁽⁹⁴⁾. Ainsi, la mort cellulaire programmée ou apoptose est un marqueur important de la transition entre la période d'hypertrophie compensée et l'insuffisance cardiaque.

1.2.3.3 Anémie chronique, mécanismes compensatoires et remodelage cardiaque

L'anémie chronique entraîne plusieurs mécanismes de compensation non-hémodynamiques et hémodynamiques, visant à permettre le maintien de l'oxygénation tissulaire adéquate⁽⁹⁵⁾.

Les adaptations non-hémodynamiques incluent une augmentation de la production d'érythropoïétine et de la concentration intracellulaire érythrocytaire de 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG)⁽⁹⁶⁾. L'érythropoïétine stimule la production de globules rouges permettant conséquemment d'accroître la capacité de transport d'oxygène. L'augmentation de la concentration de 2,3-DPG permet, quant à elle, d'améliorer l'extraction tissulaire d'oxygène en déplaçant la courbe de dissociation hémoglobine-oxygène.

En conditions d'effort ou lorsque les concentrations d'hémoglobine diminuent en deçà de 10 g/dL, tel que décrit dans le cas de la β -thalassémie majeure, les adaptations non-hémodynamiques sont excédés et une série de processus compensatoires hémodynamiques complexes sont initiés afin de répondre aux besoins tissulaires en oxygène^(97; 98) (Figure 1.26). Le principal facteur d'adaptation hémodynamique est un état de débit cardiaque élevé secondaire à une diminution de la post-charge résultant d'une réduction de la résistance vasculaire périphérique et une accroissement de la précharge cardiaque due à une augmentation du retour veineux^(96; 97). La diminution de la résistance périphérique reflète une baisse de la viscosité du

sang (diminution d'hématocrite) ainsi qu'une vasodilatation des artérioles de résistance causée par l'hypoxie. L'augmentation de la précharge résulte de la diminution des résistances au retour veineux qui est également secondaire aux baisses d'hématocrite et de viscosité sanguine. La vasodilatation favorise aussi l'écoulement du sang dans les circulations artérielles et veineuses ce qui contribue ainsi davantage à l'augmentation du retour veineux⁽⁹⁷⁾. Ces modifications de la précharge entraînent une augmentation du volume ventriculaire en fin de diastole et contribuent conséquemment, en concordance avec le mécanisme de Frank-Starling, à augmenter le volume d'éjection systolique. Ainsi, des études d'hémodilution normovolémique aiguë effectuées dans un modèle canin confirment une amélioration de la fonction ventriculaire caractérisée par une augmentation du débit cardiaque s'accompagnant d'une diminution de la post-charge, une augmentation de la précharge et de la fréquence cardiaque⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾.

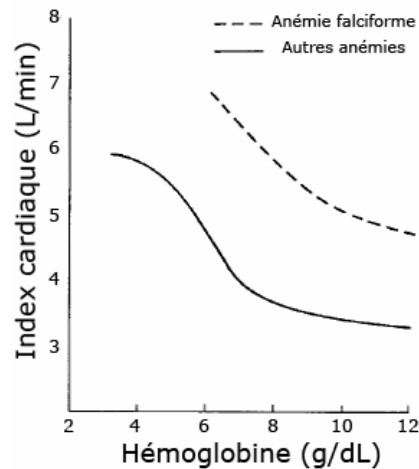


Figure 1.26: Figure illustrant la relation entre le taux d'hémoglobine et l'index cardiaque au repos chez des patients atteints d'anémie ferriprive (carence en fer) ou perniciose (ligne continue) ou d'anémie falciforme (ligne discontinue) (adapté de Varat *et al.* 1972⁽¹⁰²⁾).

Le maintien chronique d'un état élevé de volume d'éjection systolique par le ventricule gauche, combiné possiblement à une stimulation de sa contractilité par un accroissement de la concentration de facteurs inotropes positifs, induit une augmentation soutenue du travail cardiaque^(97; 103). À long terme, ces altérations hémodynamiques causent une dilatation ventriculaire gauche, une augmentation de la tension de la paroi ventriculaire et un remodelage ventriculaire caractérisé par une

hypertrophie ventriculaire excentrique initié par une augmentation du nombre de myofibrilles existants et un réalignement des sarcomères^(96; 104; 105). L'équipe de Schunkert *et al.* établit une relation entre les niveaux d'hématocrite et la masse du ventricule gauche dans la population saine (Figure 1.27)⁽¹⁰⁶⁾. Des études animales et cliniques montrent également que l'anémie chronique seule, c'est-à-dire en absence de maladie concomitante (par exemple, l'insuffisance rénale), induit une hypertrophie du ventricule gauche sans en altérer la fonction systolique⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾. Une anémie chronique sévère, c'est-à-dire lorsque la concentration d'hémoglobine est inférieure à 4-5 g/dL, entraîne l'insuffisance cardiaque⁽⁹⁷⁾. L'hypertrophie cardiaque est réversible lors de la correction de l'anémie, lorsque la fonction ventriculaire gauche est préservée. Cependant, la correction d'anémie, chez des patients souffrant d'anomalies fonctionnelles du ventricule gauche ne peut améliorer la fonction cardiaque puisqu'une augmentation de la concentration d'hémoglobine est associée à une élévation de la résistance vasculaire systémique⁽¹¹⁰⁾.

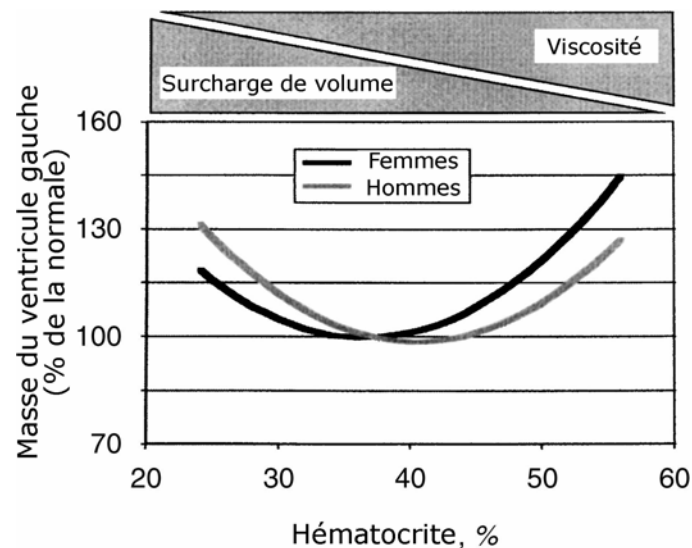


Figure 1.27: Relation schématisée entre la masse du ventricule gauche et l'hématocrite dans la population saine (adapté de Schunkert *et al.* ⁽¹⁰⁶⁾).

1.3 COMPLICATIONS CARDIOVASCULAIRES DE LA β -THALASSEMIE

Les manifestations cardiovasculaires chez les patients β -thalassémiques comprennent principalement les complications cardiaques, les évènements thromboemboliques artériels et veineux ainsi que l'altération des fonctions endothéliales vasculaires.

1.3.1 Occlusion vasculaire et évènements thromboemboliques

Les patients β -thalassémiques présentent un état chronique d'hypercoagulation ainsi qu'une augmentation de l'incidence d'épisodes thromboemboliques⁽¹¹¹⁾. Borgna-Pignatti *et al.* ont mené une étude auprès de 9 centres italiens spécialisés dans le traitement de patients β -thalassémiques qui montraient que 4 % des patients atteints de thalassémie majeure et 10 % des patients atteints de thalassémie intermédiaire présentaient des épisodes thromboemboliques⁽¹¹²⁾. Ces évènements thromboemboliques peuvent être localisés au niveau des artères cérébrales, pulmonaires, hépatiques, cardiaques, ou au niveau veineux^(112; 113). Les causes de l'occlusion vasculaire chez les patients thalassémiques sont complexes impliquant les plaquettes, la surface membranaire réactive des érythrocytes thalassémiques, les facteurs de coagulation et l'endothélium.

Un premier mécanisme pouvant expliquer ces évènements est l'état d'hypercoagulation chronique présent chez les patients thalassémiques. Des études ont démontré d'une part la diminution de la survie des plaquettes⁽¹¹⁴⁾ et d'autre part une augmentation des agrégats plaquettaires circulants chez les patients thalassémiques⁽¹¹⁵⁾. De plus, l'activation plaquettaire est confirmée par l'observation d'une sécrétion urinaire accrue des métabolites de thromboxane A₂ et de prostacycline⁽¹¹⁶⁾. Une telle augmentation de la concentration urinaire des métabolites de ces deux prostaglandines est également rapportée chez des patients atteints d'athérosclérose et refléterait l'activation plaquettaire^(117; 118). Cet effet pro-coagulant résulterait d'un mécanisme multifactoriel et proviendrait principalement des globules rouges des patients thalassémiques qui montrent des niveaux supérieurs de phospholipides anioniques tels que la phosphatidylsérine (PS) à leur surface

membranaire^(20; 113). En temps normal, les phospholipides chargés négativement sont confinés à la couche interne de la membrane cellulaire érythrocytaire⁽¹⁰⁾. Une enzyme membranaire permet la translocation de la PS vers l'extérieur. Les globules rouges âgés exposent une grande quantité de PS sur la couche externe de leurs membranes puisqu'elle est impliquée dans la reconnaissance et l'élimination des globules rouges par la rate⁽¹¹³⁾. L'exposition des PS au niveau de la membrane externe des érythrocytes thalassémiques résulte possiblement des dommages oxydatifs induits par l'accumulation de chaînes d' α -globines⁽²⁰⁾, mais également de la peroxydation des lipides membranaires causée par le fer libre circulant^(113; 119). La PS peut activer la prothrombine en thrombine, conduisant à l'activation plaquettaire et la formation d'agrégats plaquettaires contribuant ainsi au processus thrombotique (Fig. 1.28).

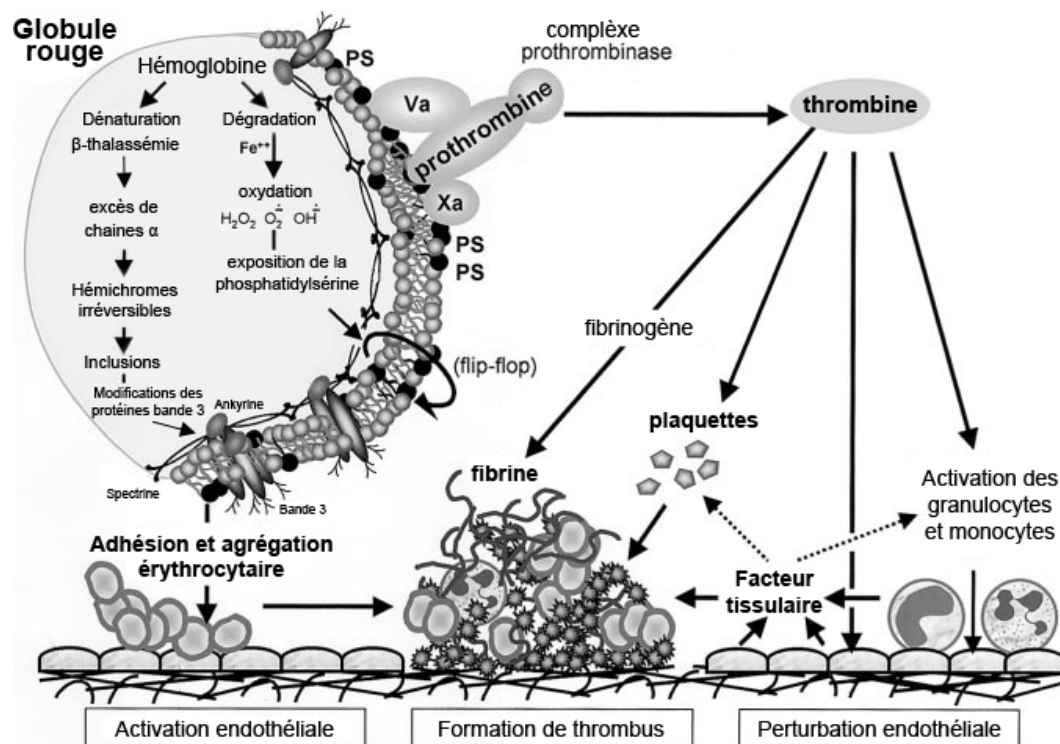


Figure 1.28: Modèle du processus d'obstruction vasculaire thalassémique (adapté de Eldor *et al.*, 2002⁽¹¹³⁾).

Cependant, l'exposition de PS sur la surface membranaire érythrocytaire contribuerait également à deux autres phénomènes, soit l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire et de l'adhérence érythrocytaire aux cellules endothéliales vasculaires. Ainsi, les globules rouges des patients thalassémiques montrent une

augmentation de l'adhésion aux cellules endothéliales en culture⁽¹²⁰⁾. L'adhésion des globules rouges aux cellules endothéliales vasculaires pourrait initier l'occlusion vasculaire, plus particulièrement au niveau de la microcirculation, tel que décrit dans les désordres drépanocytaires⁽¹²¹⁾. De plus, l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire chez des patients atteints de thalassémie majeure a été démontrée *in vitro*⁽⁴⁸⁾. Cette étude rapporte la formation d'agrégats de grande taille (Fig. 1.29) nécessitant des forces de cisaillement supérieures afin de disperser leur forme compacte. L'agrégation combinée à une augmentation de l'adhérence érythrocytaire aux cellules endothéliales pourrait contribuer davantage à l'incidence d'évènements thrombotiques.

En résumé, le phénomène de thrombose et d'occlusion vasculaire est reconnu chez les patients β -thalassémiques et résulterait d'un mécanisme multifactoriel. Néanmoins, l'effet de ces évènements sur la circulation sanguine et l'hémodynamique vasculaire requiert de plus amples investigations.

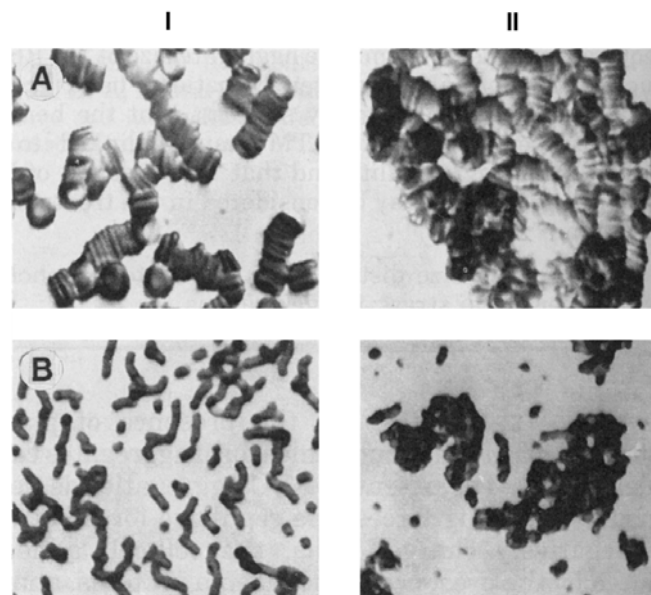


Figure 1.29: Agrégats érythrocytaires observées chez des sujets témoins (I) et des patients β -thalassémiques (II) à grossissement élevé (A) ou faible (B) (extrait de Chen *et al.*, 1996⁽⁴⁸⁾).

1.3.2 Dysfonction endothéliale

Tel que décrit ci-dessous, l'endothélium vasculaire est possiblement impliqué dans les phénomènes de thrombose et d'occlusion vasculaire rapportés chez les patients β -thalassémiques. En plus d'une augmentation de l'adhérence des globules rouges thalassémiques aux cellules endothéliales en culture⁽¹²⁰⁾, le nombre de cellules endothéliales circulantes ainsi que les marqueurs d'activation endothéliale sont augmentés chez les patients β -thalassémiques^(122; 123). Ces travaux de recherche suggèrent une perturbation de l'endothélium vasculaire. De plus, des études rapportent une altération d'une autre fonction essentielle de l'endothélium, soit la modulation du tonus vasculaire. En effet, des évaluations de l'hyperémie post-ischémique de l'artère brachiale montrent une altération de la dilatation débit-dépendante au niveau des grandes artères⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾. Le mécanisme aboutissant à ce dysfonctionnement endothélial demeure inconnu. Le fer pourrait possiblement agir directement en diminuant la biodisponibilité du NO ou indirectement en stimulant la formation de radicaux libres et peroxydation des lipides membranaires⁽¹²⁴⁾. Cependant, les résultats divergent entre les auteurs concernant l'existence^(125; 127) ou l'absence^(124; 126) de relation entre la surcharge de fer et le niveau d'altération de la dilatation dépendante du débit. Un manque de consensus existe également quant à l'intégrité de la réponse dilatatrice des cellules musculaires lisses en réponse à l'administration sublinguale de nitroglycérine. Ainsi, les études de dilatation de l'artère brachiale indépendante du débit, par stimulation directe des cellules musculaires lisses, montrent que les patients β -thalassémiques ont une réponse similaire^(124; 127) ou atténuée⁽¹²⁵⁾ en comparaison avec celle obtenue chez les sujets sains. Conséquemment, des travaux de recherche additionnels sont requis afin d'élucider le mécanisme sous-jacent aux perturbations endothéliales.

Outre les modifications fonctionnelles de l'endothélium vasculaire, les recherches montrent différents signes de remodelage de la paroi vasculaire chez les patients β -thalassémiques. Un épaissement des couches intima-média de la paroi carotidienne⁽¹²⁵⁾ ainsi qu'une altération des propriétés élastiques de la carotide⁽¹²⁴⁾, de l'artère brachiale^(124; 126) et de l'aorte^(126; 128) sont documentés chez ces patients. Le mécanisme exact du remodelage vasculaire demeure toutefois inconnu. Cependant,

les auteurs suggèrent qu'une combinaison de l'altération de la fonction vasomotrice et de la structure de la paroi artérielle génère une charge accrue sur le cœur β -thalassémique, contribuant ainsi à la détérioration structurelle et fonctionnelle cardiaque.

1.3.3 Pathologie cardiaque

Les complications et l'insuffisance cardiaques représentent la principale cause de décès chez les patients atteints de β -thalassémie majeure et intermédiaire^(23; 129; 130). Chez les patients subissant un traitement optimal de transfusions combinées à la chélation de fer, l'insuffisance cardiaque se présente vers la trentaine ou quarantaine⁽¹³¹⁾. Le portrait clinique de la pathologie cardiaque β -thalassémique peut se présenter sous la forme d'une dilatation et hypertrophie progressive du ventricule gauche^(124; 132) et droit⁽¹³³⁾ pouvant s'accompagner de troubles de la conduction et du rythme⁽¹³⁴⁾ et menant vers la dysfonction contractile cardiaque^(9; 132). D'autres complications telles l'hypertension pulmonaire⁽¹³⁵⁾ et parfois la myocardite⁽¹³⁶⁾ ou la péricardite⁽¹³¹⁾ peuvent également contribuer à la progression de la pathologie cardiaque⁽¹³⁰⁾. La structure et la fonction du cœur β -thalassémique sont possiblement affectées par deux facteurs principaux, soit l'augmentation soutenue du débit cardiaque et la surcharge de fer.

L'augmentation du débit cardiaque est une réponse physiologique normale à une anémie chronique sévère visant à compenser un déficit d'oxygénation des tissus^(110; 137). Cette adaptation résulte d'une augmentation de la précharge cardiaque, reflétant un retour veineux accru, ainsi qu'une diminution de la post-charge, secondaire à une diminution de la résistance périphérique sanguine. L'augmentation du travail cardiaque nécessaire au maintien du débit cardiaque accru causé par l'anémie chronique explique ainsi en partie la dilatation et l'hypertrophie cardiaque rapportées chez les patients β -thalassémiques⁽²³⁾. Cependant, une comparaison des résultats de débit cardiaque obtenus dans plusieurs études cliniques^(124; 129; 131; 132; 138-141) permet de constater que pour un même niveau d'hémoglobine, le débit cardiaque mesuré chez les patients β -thalassémiques est généralement supérieur à celui obtenu chez les patients présentant d'autres types d'anémies (Fig. 1.30). Cette différence est

encore plus accentuée chez les patients atteints de β -thalassémie intermédiaire. Les mécanismes permettant d'expliquer cette différence demeurent inconnus.

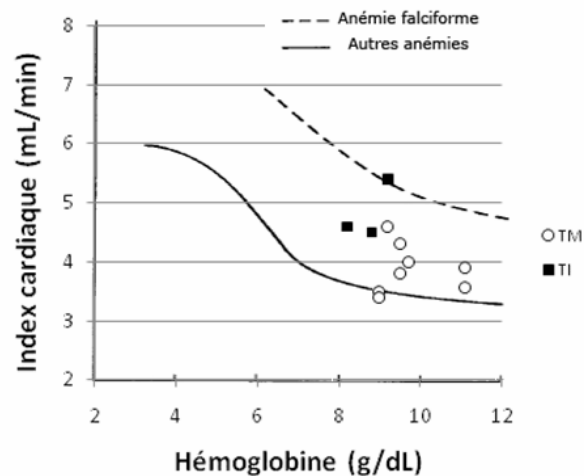


Figure 1.30: Comparaison des valeurs de débit cardiaque chez des patients atteints de β -thalassémie majeure (○)^(124; 129; 131; 132; 138-141) ou intermédiaire (■)^(129; 138; 140) avec celles obtenues chez des patients atteints d'anémie ferriprive (carence en fer) ou pernicieuse (ligne continue) ou d'anémie falciforme (ligne discontinue) (adapté de Varat *et al.* 1972⁽¹⁰²⁾)

Ces modifications de la structure cardiaque peuvent s'aggraver chez le patient β -thalassémique et entraîner une décompensation menant vers une dysfonction contractile et ultimement l'insuffisance cardiaque. Le mécanisme principal menant vers cette décompensation est généralement attribué à la surcharge de fer que subissent ces patients. En effet, la saturation des réserves de fer du foie et de la rate, résulte dans le dépôt de fer à l'intérieur des myocytes cardiaques⁽¹³⁰⁾. Les cardiomyocytes sont sensibles au stress oxydatif généré par le fer et subissent conséquemment la peroxydation lipidique et des dommages membranaires et mitochondriaux qui peuvent mener vers leur dysfonction contractile et la mort cellulaire⁽⁹⁾.

Néanmoins, la surcharge de fer ne peut entièrement expliquer la pathologie de la fonction cardiaque. Malgré une diminution significative des complications cardiaques chez les patients atteints de β -thalassémie majeure subissant un traitement combiné de transfusions et de chélation du fer, la cardiomyopathie et l'insuffisance

cardiaque demeurent présentes dans cette population⁽¹³¹⁾. De plus, les patients atteints de β -thalassémie intermédiaire présentent également une dysfonction cardiaque en l'absence de dépôts de fer myocardiques^(129; 142). Ces observations indiquent la nécessité d'études supplémentaires permettant d'évaluer la fonction et la structure cardiaques de la β -thalassémie majeure indépendamment de la surcharge de fer et de vérifier la présence d'un mécanisme additionnel de la détérioration fonctionnelle.

1.4 OBJECTIFS ET DESCRIPTIF DE LA THESE

Tel que mentionné dans la section précédente, plusieurs études ont démontré que les patients atteints de β -thalassémie majeure présentent des complications cardiovasculaires. Cependant, il existe d'importantes lacunes quant à la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents et la relation entre ces complications et la surcharge de fer transfusionnelle demeure incertaine. L'hypothèse générale de cette thèse de doctorat était, par conséquent, que la β -thalassémie entraîne des désordres cardiovasculaires en l'absence d'une surcharge de fer transfusionnelle. L'objectif global des travaux décrits aux chapitres qui suivent était d'évaluer *in vivo* par techniques non-invasives et *ex vivo*, la physiologie cardiovasculaire dans un modèle de souris β -thalassémique présentant un phénotype sévère comparable à celui des patients atteints de β -thalassémie majeure, en l'absence des effets possiblement confondants des traitements.

Le premier objectif spécifique de ce travail consistait à caractériser les désordres circulatoires chez les souris β -thalassémiques. Une méthode ultrasonore non-invasive a été proposée et employée pour l'évaluation quantitative des propriétés hémodynamiques vasculaires. Un second objectif visait d'une part à étudier la dysfonction vasomotrice de l'endothélium vasculaire des artères de résistance, ainsi que de caractériser le remodelage et les propriétés mécaniques de la paroi vasculaire carotidienne des souris β -thalassémiques. Le dernier objectif de cette thèse était d'évaluer les altérations de la fonction et la structure cardiaque des souris β -thalassémiques ainsi que de clarifier la relation entre la présence de fer myocardique et les troubles cardiaques.

Cette thèse est présentée sous forme d'articles qui répondent chacun à un des trois objectifs spécifiques, ci-haut mentionnés. Le modèle murin de la β -thalassémie

majeure employé dans ces études, Hbb^{th-1} (ou Hbb^{d3th}), présente une importante difficulté de reproduction et un taux de mortalité fœtale élevé. Afin de contourner ce problème, nous avons généré des souris β -thalassémiques par transplantation de CSH provenant de donneurs Hbb^{th-1/th-1} chez des receveurs ayant subi une irradiation totale. Ainsi, un quatrième article permettra d'évaluer les effets cardiovasculaires de l'irradiation corporelle totale. Finalement, un dernier chapitre permettra de remettre en perspective l'ensemble des résultats de cette thèse, de discuter des conclusions globales et de suggérer un nouveau mécanisme de la pathophysiologie cardiovasculaire β -thalassémique ainsi que des thématiques pour de possibles travaux futurs.

CHAPITRE 2: ARTICLE 1

Characterization of circulatory disorders in β -thalassemic mice by non-invasive ultrasound biomicroscopy

2.1 AVANT-PROPOS

Ce chapitre reproduit un article, publié en 2007 dans la revue *Physiological Genomics*, décrivant la présence de désordres circulatoires chez des souris β -thalassémiques. Nous avons généré un modèle de souris β -thalassémique présentant des caractéristiques phénotypiques de la β -thalassémie majeure humaine par transplantation de CSH provenant du foie fœtal de souris $Hbb^{th-1/th-1}$ (ou $Hbb^{d3th/d3th}$). Nous rapportons dans ce manuscrit l'utilisation d'une méthode d'imagerie échographique novatrice pour l'évaluation quantitative des propriétés hémodynamiques vasculaires chez la souris. Les résultats d'index de Pourcelot (PI) ainsi que de résistance périphérique totale montrent une perturbation de l'écoulement microcirculatoire chez les souris β -thalassémiques non-transfusées.

Ma contribution à ces travaux était principale puisque j'ai effectué la caractérisation du modèle de souris β -thalassémique et l'ensemble des évaluations échographiques ainsi que l'analyse et l'interprétation des données. J'ai également rédigé le manuscrit avec l'assistance de ma co-directrice, Dre Marie Trudel. Dr Hady Felfly a généré les souris β -thalassémiques en effectuant et analysant les expériences de transplantation de CSH. Dr Damien Garcia a contribué à la justification théorique de PI, incluse dans la section d'appendice de cet article. Dr Guy Cloutier a participé à la correction et la révision du manuscrit ainsi qu'aux réponses aux évaluateurs.

Characterization of circulatory disorders in β -thalassemic mice by non-invasive ultrasound biomicroscopy

Ekatherina Stoyanova¹, Marie Trudel², Hady Felfly², Damien Garcia², Guy Cloutier¹

¹University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Montreal, Canada,

²Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Canada,

Running head: Circulatory disorders in β -thalassemic mice

Corresponding author: Guy Cloutier, Director, Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), 2099 Alexandre de Sève, room Y-1619, Montreal, Quebec, Canada, H2L 2W5. Dr Cloutier is Professor of Radiology, Radio-Oncology and Nuclear Medicine and Member of the Institute of Biomedical Engineering at the University of Montreal.

Physiological Genomics. 2007; 29: 84-90.

Used with permission

2.2 ABSTRACT

β -Thalassemia is an inherited hematological disease caused by a decrease or absence of production of β -globin that requires chronic therapeutic interventions. This condition leads to important arterial and venous thromboembolic events, transitory ischemic attacks, and microcirculatory obstructions, indicative of circulatory disturbances. To investigate the presence of microcirculatory disorders without the confounding effect of treatments, we used β -thalassemic mice with

typical clinical characteristics of human β -thalassemia major. One impediment to the understanding of microcirculatory physiology, in particular for β -thalassemic mice, has been the lack of an appropriate noninvasive imaging approach. We thus developed a novel noninvasive high-frequency ultrasound imaging method to evaluate murine vascular hemodynamic properties. In our β -thalassemic mice, total peripheral vascular resistance was significantly increased ($p < 0.01$) compared with wildtype littermates, whereas mean blood pressure, heart rate, and cardiac output were similar ($p =$ nonsignificant). Importantly, the vascular hemodynamics in β -thalassemic mice were significantly affected according to the Pourcelot indexes measured in the common carotid artery and abdominal aorta ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively). Hence, our β -thalassemia characterization of vascular hemodynamics by noninvasive ultrasonic approaches proves the existence and provides unique quantitative assessment of microcirculatory flow disturbances in those mice.

Key words: β -thalassemia; high-frequency ultrasonography; vascular resistance; blood flow; hemodynamics.

2.3 INTRODUCTION

Thalassemia syndromes are a group of heterogeneous hereditary diseases characterized by a decrease or a total absence of synthesis of α - and/or β -globin chains composing the hemoglobin protein in red blood cells (RBCs)⁽¹³⁾. They are classified according to the type of deficient globin chain as α - and β -thalassemia⁽¹²⁾. In β -thalassemia, the severity of the pathophysiology depends on the level of β -globin chain deficiency, which leads to an excess of α -globin chains⁽⁵⁾. Consequently, thalassemic RBCs are hypochromic and microcytic and have a shorter half-life, leading to anemia⁽¹¹⁾.

β -Thalassemia is encountered worldwide, with a higher incidence in the Mediterranean region, Africa, the Middle East, India, and Southeast Asia⁽¹⁵⁾. Three clinical phenotypes of decreasing severity have been established: a transfusion-

dependent state, thalassemia major, a moderate phenotype, thalassemia intermedia, and a benign heterozygous condition, thalassemia minor. In severe cases, the disease can be fatal *in utero* or in early childhood, if untreated. Clinical features, in addition to the RBC anomalies, are heterogeneous, and patients display several systemic manifestations.

Thromboembolic events such as pulmonary embolism, stroke, and thrombosis of the arterial and venous vascular beds are common complications reported in β -thalassemia major patients^(143; 144). Possible vasoocclusive causes have been investigated and involve mainly functional and morphological erythrocyte abnormalities^(16; 19). Indeed, thalassemic RBCs display markedly reduced cellular deformability compared with normal cells⁽¹⁴⁵⁾. In addition, erythrocytes from β -thalassemic patients exhibit enhanced cellular adhesion to each other⁽⁴⁸⁾ and to endothelial cells⁽¹²⁰⁾. A multifactorial chronic hypercoagulable state has also been widely recognized in thalassemic patients⁽¹¹³⁾, and abnormalities of platelets and of the coagulation system may conceivably contribute to circulatory disorders. The exact underlying pathophysiology of these circulatory disorders remains to be documented.

The characterization of circulatory disorders per se in β -thalassemic patients is complicated by the various therapies that are likely to hinder hemodynamic assessment. Alternatively, important insights could be gained from untreated animal models. Several murine models of β -thalassemia have been generated through spontaneous or genetically induced mutations. One such model [Hbb^{d3(th)/d3(th)}] has been shown to closely reproduce hematological, pathological, and histological features of β -thalassemia major⁽³⁵⁾. Although this mouse model has existed for a long time, no previous studies on the vascular physiology or on the *in vivo* circulatory disturbances have been undertaken. One impediment to such progress has been the absence of noninvasive approaches to characterize blood flow. Herein we have thus established an ultrasound imaging approach to quantitatively assess microcirculatory disorders. In addition, we have investigated microcirculatory disorders without the confounding effect of treatments in β -thalassemic [Hbb^{d3(th)/d3(th)}] mice and determined that β -thalassemia can by itself lead to an impairment of vascular hemodynamic properties.

2.4 METHODS

2.4.1 Mouse strains

Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care Committees of the Clinical Research Institute of Montreal and the University of Montreal Hospital Research Center, and they were conducted in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Homozygous mice for a spontaneous mutation $Hbb^{d3(th)}$ were obtained by deletion of the murine β -major globin gene in the globin diffuse haplotype, leaving the β -globin minor gene intact⁽³⁵⁾. These homozygous β -thalassemic animals are severely affected⁽³⁵⁾. The thallemic mice used in this study were backcrossed for more than 16 generations onto C57BL/6J inbred mice to have a homogenous background. Congenic C57BL/6J control animals carry a globin single haplotype and were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). All mice were maintained in microisolator cages.

2.4.2 Fetal liver transplantation

Because of the severe thallemic phenotype, a limited number of homozygous β -thallemic mice were available at any one time. To circumvent this problem, we generated homozygous β -thallemic fetuses (E14.5) from heterozygous β -thallemic mating, and used fresh fetal liver as donor cells for transplantation. Fetal liver cells were obtained from three homozygous β -thallemic fetal donors (C57BL/6J) and resuspended in serum-free Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco, Grand Island, NY). The C57BL/6J recipient mice were exposed to 875 cGy of total body irradiation (Mark I-68A-1 Research Irradiator, San Francisco, CA), and 2 h later, they received a total of 1.8×10^6 bone marrow cells suspended in a physiological solution of 350 μ l injected into the tail vein. The transplanted mice were monitored on a regular basis for hematopoietic engraftment from 4 to 25 wk post-fetal liver cell transfer. Evaluation of engraftment was determined from peripheral blood on the basis of hemoglobin composition by the proportion of donor (Hb minor) and recipient (Hb single) hemoglobin. This assay involved loading RBC lysates onto cellulose acetate membranes (Titan III-H; Helena, Helena, CA) and electrophoresing for 35 min at 300 V in a Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.5) using

Helena equipment. Briefly, the protocol involved membrane staining with Ponceau S (Helena), destaining for 5 min in 5% acetic acid and 10 min in 100% ethanol, and fixation for 5 min in 70% methanol and 30% acetic acid, followed by drying for 6 min at 55°C. Sole expression of hemoglobin minor in C57BL/6J recipient mice demonstrated complete hematopoietic engraftment and confirmed production of homozygous β -thalassemic transplanted animals (homo- β thal).

2.4.3 Animal preparation

Seventeen male homo- β thal mice and nineteen C57BL/6J age-matched controls were studied. Mice were weighed and anesthetized using an intraperitoneal injection of 0.015 mL/g 2,2,2-tribromoethanol, 2.5%. The lumbar body hair was removed using a commercial depilatory cream (Nair, Church and Dwight, Princeton, NJ) applied over the anterior chest and neck of each animal. Mice were then placed on a warming platform under a heating lamp. The body temperature was monitored using a rectal thermometer (THM100; Indus Instruments, Houston, TX) and maintained to $37 \pm 1^\circ\text{C}$. ECG electrodes on the platform supporting the mouse allowed us to continuously monitor the heart rate (HR). An estimate of mean aortic blood pressure (MBP) measurements was obtained using a tail-cuff monitoring system (XBP-1000; Kent Scientific, Torrington, CT)⁽¹⁴⁶⁾.

2.4.4 Echographic examinations

A high-resolution ultrasound biomicroscope (Vevo 660; Visualsonics, Toronto, ON, Canada) equipped with a single-element oscillating transducer (central frequency of 35 MHz, focal length of 10 mm, and frame rate of 30 Hz) was used. Lateral and axial resolutions for this probe are 115 and 55 μm , respectively⁽¹⁴⁷⁾. The axial dimension of the sample volume in pulsed-wave Doppler mode was fixed to 0.3 mm for recordings in the common carotid artery and to 0.51 mm for recordings in the ascending and abdominal aortas. Preheated ultrasound transmission gel (Aquasonic 100; Parker Laboratories, Orange, NJ) was placed on the regions of interest to provide an acoustic coupling medium between the probe and the animal.

The left common carotid artery and abdominal aorta were imaged longitudinally by B-mode ultrasonography at 35 MHz, and the Doppler sample

volume was positioned precisely into the vessel of interest to record the time-varying velocity waveforms for 2 s. The Doppler recordings were performed at 30 MHz, 1–2 mm before the carotid bifurcation and above the renal bifurcation, identified by imaging the kidneys as reference.

The heart was imaged by using the B-mode parasternal long-axis view. The M-mode sampling line was positioned perpendicular to the ascending aorta at the exit of the left ventricle, and time-varying tracings were recorded to follow changes in aortic diameters (AoD). For Doppler recordings, the transducer was oriented to obtain an angle below 60° between the ultrasound beam and the aortic arch. The Doppler velocity waveforms were recorded in the ascending aorta by positioning the sampling volume at the exact same location where the M-mode tracings were obtained. An automatic angle correction provided by the instrument was applied to record quantitative velocity measures.

2.4.5 Hemodynamic variables measured non-invasively

2.4.5.1 Pourcelot index (PI)

Manual measurements using Matlab software (version 6.5, Natick, MA) were made of the peak systolic velocity (S) and of the end-diastolic velocity (D) in both common carotid artery and abdominal aorta (see Fig. 2.3). The Pourcelot index (PI) was calculated by use of the following formula⁽¹⁴⁸⁾:

$$PI = (S - D) / S$$

The mean PI value for each measurement was averaged over 10 consecutive cardiac cycles. A theoretical description of this index can be found in the Appendix.

2.4.5.2 Stroke volume, cardiac output and cardiac index

The AoD was measured 0.5–1.5 mm downstream of the aortic valve in systole and diastole. An average value was then calculated over five cardiac cycles. The velocity-time integral (VTI) was determined by tracing manually the envelope of the Doppler velocity waveforms measured at the same location as AoD. VTI was

averaged over 10 cardiac cycles. With the assumption of parabolic velocity profiles, the stroke volume (SV) was then calculated as follows:

$$SV = \frac{1}{2} (AoD / 2)^2 \times \pi \times VTI$$

The assumption of parabolic velocity profiles, and therefore the presence of 1/2 in the above equation, is justified, since the calculated Womersley number⁽¹⁴⁹⁾ in the ascending aorta was 2.5 on average in the present study. Because the measured Womersley number was small, we can assume Poiseuille parabolic-like flow in the ascending aorta of the studied mice. Moreover, velocity profiles have been shown to be parabolic in ascending aortas of rats⁽¹⁵⁰⁾.

Cardiac output (CO) was deduced from SV by multiplying it by the HR (CO = SV x HR). The cardiac index (CI) was finally calculated by normalizing CO for body weight and was expressed in milliliters per minute per gram of body weight (mL min⁻¹ g⁻¹).

2.4.5.3 Total peripheral vascular resistance (TPVR)

Total peripheral vascular resistance (TPVR) was calculated as:

$$TPVR = MBP / CO \approx TCP / CO$$

where MBP and TCP are the mean aortic blood pressure and the tail-cuff pressure, respectively. Because it has been shown that TCP is similar to MBP in mice⁽¹⁴⁶⁾, TCP can be adequately used for the estimation of TPVR. In the above equation, the postcapillary pressure was neglected and assumed to be zero.

2.4.6 Variability analyses

Intra- and interobserver and intersession variability analyses were performed for the basic echographic measures AoD, VTI, and PI on a subgroup of eight C57BL/6J mice. Intraobserver variability was assessed on the same echographic images by a single observer repeating the measurements on different days. The interobserver variability was determined on the same echographic images by having two observers within the same session performing these measurements. Intra- and interobserver errors were calculated as the difference between two measures divided

by the mean and expressed as a percentage of variability. For the intersession variability, the echographic examinations were repeated on two different days at a 1-wk interval. Intersession variability was calculated as $(D1 - D7)/[(D1 + D7)/2]$, where D1 and D7 are two measurements performed by the same reader on the echographic images obtained in the sessions of the first and seventh days, respectively.

2.4.7 Statistical analyses

Data were averaged and reported as means \pm SE over n observations, where n represents the number of mice per group. Comparisons of results from homo- β thal and control mice were made by Student's unpaired t -tests. Statistical significance was considered at $p < 0.05$.

2.5 RESULTS

2.5.1 Production of homo- β thal mice by fetal liver cell transplants

The homozygous β -thalassemic [$Hbb^{d3(th)/d3(th)}$] mouse model was deleted for both adult β -globin major genes but had intact β -globin minor genes. Since a large population of homozygous β -thalassemic mice could not be obtained because of poor breeding efficiency, a strategy was developed to generate sufficient animal numbers. As described earlier, fetal liver cell transplants from three homozygous β -thalassemic mice were thus performed, conferring the entire spectrum of hematological defects from thallemic donors to fetal liver recipients. Because recipients (Hb single) and donors (Hb minor) express alternative forms of hemoglobin, RBC engraftment was verified through the exclusive presence of the donor hemoglobin in recipient blood by 10–25 wk posttransplant, congruent with the clearance rate of normal murine RBCs. Figure 2.1 depicts the hemoglobin phenotype of five representative recipients 17 wk following the transplant. As expected, all transplanted animals produced strictly hemoglobin minor, the donor cell hemoglobin, which revealed complete fetal liver engraftment. Consistently, all transplanted mice were monitored for hematological parameters and showed severe anemia with a hematocrit that ranged from 27 to 34%, whereas the hematocrit in normal mice of the same age was $49.0 \pm 1.3\%$.

Transplanted mice developed features identical to those of donor mice and consistent with severe β -thalassemia major.

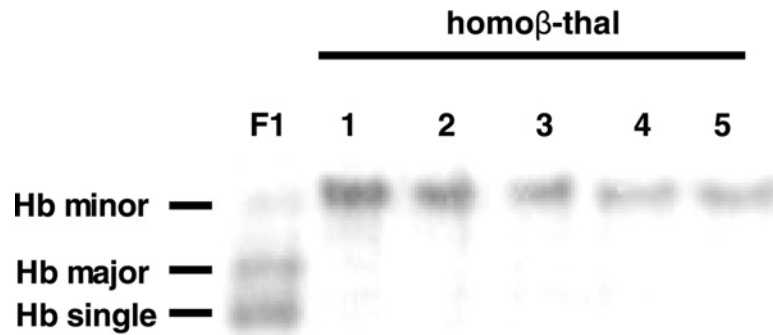


Figure 2.1: Analysis of engraftment of fetal liver transplanted mice. Red blood cell hemoglobin levels in recipient mice were determined to evaluate engraftment of donor $Hbb^{d3(th)/d3(dth)}$ fetal liver cells (Hb minor) at 10 weeks following transplantation. Protein electrophoresis of hemoglobin single from the globin single haplotype has fastest migrating band as indicated, whereas the hemoglobin major and minor from the diffuse haplotype migrates slower. By 14 weeks, recipients produced strictly hemoglobin minor indicating a complete switch from hemoglobin single production and thus complete hematopoietic engraftment. Blood from (C57BL/6J) \times (CBA/J) F1 mice (F1) served as control for single (Hb single) and diffuse (Hb major, Hb minor) haplotype.

At the time of echographic examinations, homo- β thal mice were 9.4 ± 0.4 mo old ($n = 17$), and, as seen in *Table II-I*, they were age matched to wildtype (WT) controls (9.2 ± 0.7 mo; $n = 19$). Although all mice were of similar age, body weight was significantly decreased by 10% ($p < 0.01$) in β -thalassemic animals (25.5 ± 0.6 g) relative to WT controls (28.6 ± 0.6 g), as frequently observed in humans with β -thalassemia major^(140; 151).

Parameter	Control ($n = 19$)	Homo β -thal ($n = 17$)	P value
Age (months)	9.2 ± 0.6	9.4 ± 0.4	NS
Body wt (g)	28.6 ± 0.6	25.5 ± 0.6	< 0.01
AoD (mm)	1.49 ± 0.02	1.41 ± 0.02	< 0.05
VTI (cm)	5.5 ± 0.1	5.1 ± 0.2	NS
SV (mL)	0.048 ± 0.001	0.041 ± 0.003	< 0.01

Table II-I: Physiological and echographic parameters. Values are means \pm SE. Homo β -thal, homozygous β -thalassemic transplanted; AoD, aortic diameter; VTI, velocity-time integral of the aortic velocity; SV, stroke volume; NS, not significant.

Because ultrasound scans are difficult to accomplish in conscious mice, we resorted to general anesthesia despite its impact on cardiac function and hemodynamics^(152; 153). However, we have limited the influence of anesthesia in our study by administering only the minimal dose granting a sufficient time period to perform echographic examinations. The comparisons between the two groups of mice were done under the same anesthetic regimen to avoid confounding effects.

2.5.2 Increase of global vascular resistance in β -thalassemic mice

To investigate blood flow hemodynamics in β -thalassemia, systemic cardiovascular parameters were examined in untreated homo- β thal mice presenting features similar to those observed in β -thalassemia major patients. Although the MBP was slightly higher in homo- β thal mice (84.7 ± 3.9 mmHg) compared with WT mice (79.5 ± 3.6 mmHg), there was no statistical difference between the two groups ($P = 0.34$, Fig. 2.2A). HR was determined from the ECG (Fig. 2.2B) and was also comparable between groups (483.7 ± 12.7 vs. 467.7 ± 7.5 beats/min, $P = 0.27$). SV was 41 ± 3 and 48 ± 1 μ L for homo- β thal and control mice, respectively ($p < 0.05$). The lower SV in homo- β thal mice likely results from their smaller body size, since SV values were similar when normalized to body weight ($p = 0.07$). The CO and CI were not statistically different ($p = 0.07$ and $p = 0.83$, respectively) in both groups. As

indicated in Fig. 2.2C, CI was $0.77 \pm 0.05 \text{ mL min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ in homo- β thal mice compared with $0.79 \pm 0.02 \text{ mL min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ in control mice. A significant increase of TPVR (Fig. 2.2D), by 30% ($p < 0.01$), was found in homo- β thal mice ($4.65 \pm 0.37 \text{ mmHg min mL}^{-1}$) compared with WT controls ($3.58 \pm 0.14 \text{ mmHg min mL}^{-1}$), which confirms general vascular blood flow anomalies in the β -thalassemic group.

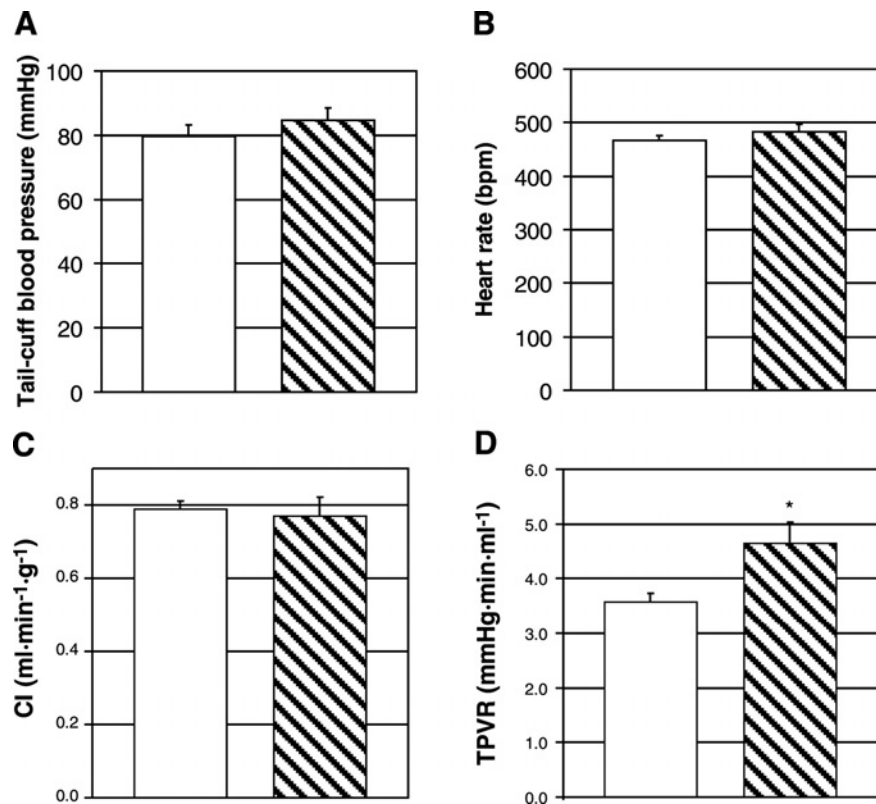


Figure 2.2: Tail-cuff blood pressure (TCP, mmHg; A), heart rate (HR, beat/min; B), normalized cardiac output (CI, $\text{mL min}^{-1} \text{ g}^{-1}$; C), and total peripheral vascular resistance (TPVR, mmHg min mL^{-1} ; D) in homo- β thal ($n = 17$, hatched bars) and control ($n = 19$, open bars) mice. Data are means \pm SE. * $p < 0.01$.

2.5.3 Impairment of vascular properties in homo- β thal mice

Because β -thalassemic mice showed systemic circulatory disorders (according to TPVR), specific circulatory effects were further investigated by Doppler ultrasonography. Two different and complementary sites were selected to evaluate vascular properties: the carotid artery feeding the brain and the abdominal aorta irrigating major organs and the lower limbs. The rationale for selecting the left

common carotid relied on the fact that cerebral thromboembolic events have been documented in β -thalassemic patients^(113; 143). The abdominal aorta was also chosen because it is easily accessible and it is the main supplier of blood flow to numerous organs and tissues, including the kidneys, where anomalies were described in humans⁽¹⁴³⁾.

PI was calculated as is done for human radiology scans. Using the ultrasound biomicroscope, we measured the Doppler peak systolic and end-diastolic velocities (as in Fig. 2.3) to derive PI in the carotid artery and abdominal aorta. The diameter of both vessels was large enough to allow accurate and reproducible localization of the Doppler recording sites, as shown by the white arrow in Fig. 2.4A for the smallest vessel investigated in this study (the carotid). As reported in Fig. 2.5, PI was significantly higher in the homo- β thal group for both vessels. In the common carotid artery, PI was 0.867 ± 0.007 (no units) in homo-thal mice compared with 0.832 ± 0.007 in control mice ($p < 0.01$), whereas those values were 0.822 ± 0.012 in homo- β thal and 0.792 ± 0.008 in control mice for the abdominal aorta ($p < 0.05$). This increase of PI in the β -thalassemic group was directly related to a decrease in diastolic blood flow velocity, as shown in Fig. 2.4, B and C. These results suggest that the homo- β thal mice had impaired vascular properties in the neck vessels, abdomen, and lower limbs.

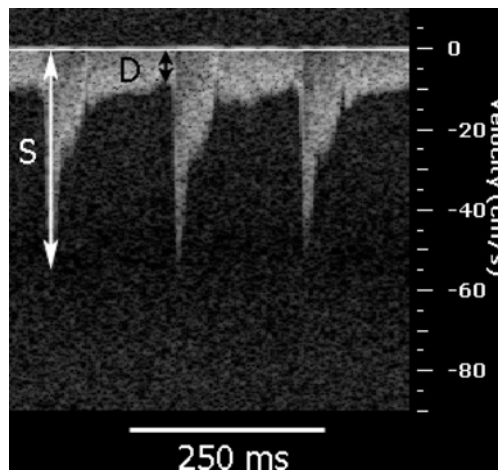


Figure 2.3: Doppler display of common carotid artery velocity waveforms of a wildtype mouse showing the systolic (S) and end-diastolic (D) velocities. Three cardiac cycles are displayed.

2.5.4 PI measurements are reproducible with low interpretive variabilities

To validate the noninvasive echographic approaches reported in this study, the reproducibility of most measures was verified by computing the intra- and interobserver and intersession variabilities. As indicated in *Table II-II*, the largest variability was observed for VTI, but it did not exceed 10% even when evaluated by different observers. The intra- and interobserver absolute errors for CO and TPVR were low at $2.8 \pm 4.0\%$ and $1.0 \pm 5.0\%$, respectively. Noticeably, intra- and interobserver variabilities on PI were $<1\%$. Similarly, for the intersession variability assessment reported in *Table II-III*, all measurements were quite reproducible when performed at an interval of 1 wk. Of all measures, CO ($-11.1 \pm 6.2\%$) and TPVR ($12.6 \pm 8.2\%$) appeared the most variable. By contrast, even when performed on different recording sessions, PI measurements were highly reproducible with an error of $1.7 \pm 1.8\%$ for the carotid artery and $2.1 \pm 2.6\%$ for the abdominal aorta. Of all noninvasive variables used to assess hemodynamic impairments in homo- β thal mice, PI was the most reliable.

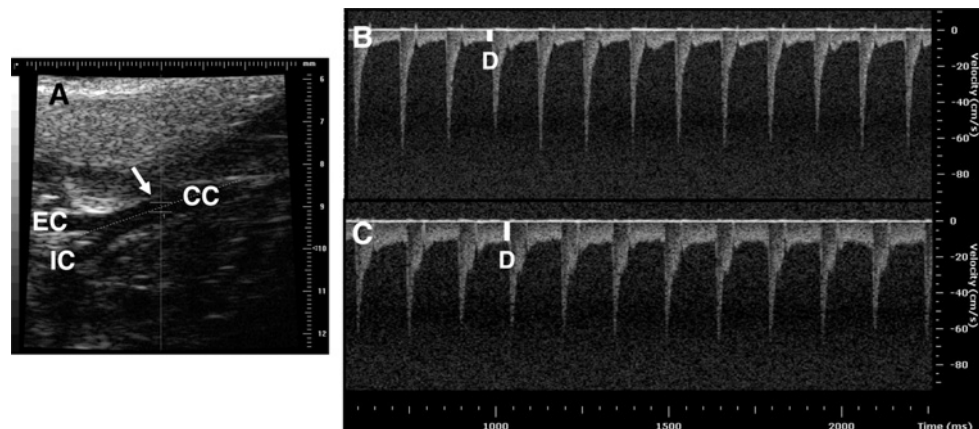


Figure 2.4: Ultrasonographic imaging of the carotid artery. A: B-mode image showing the common carotid artery (CC) and the internal (IC) and external (EC) carotid arteries in longitudinal view. The Doppler sample volume (white arrow) is positioned within the CC artery before the bifurcation. B and C: Doppler flow velocity waveforms recorded in the CC artery of a β -thalassemic mouse (B) and same measures in a wildtype control mouse (C). D, end-diastolic velocity (white line).

2.6 DISCUSSION

The purpose of this study was to investigate the presence of blood flow abnormalities in the peripheral circulation of β -thalassemic mice, with a secondary objective of developing noninvasive imaging tools for the assessment of cardiovascular disorders. Using a novel ultrasound diagnostic approach, we have demonstrated circulatory flow disorders in homo- β thal mice.

Parameter	Intra-observer variability %	Inter-observer variability %
AoD (mm)	0.7 ± 0.5	-0.2 ± 0.5
VTI (cm)	-4.3 ± 1.4	-8.1 ± 0.9
CO ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)	2.8 ± 4.0	-1.0 ± 5.0
TPVR ($\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$)	-2.8 ± 4.0	1.0 ± 5.0
PI (no unit):		
carotid artery	0.3 ± 0.2	0.7 ± 0.4
abdominal aorta	-0.2 ± 0.3	0.9 ± 0.3

Table II-II: Intra- and inter-observer variabilities of echographic measurements. Values are means \pm SE; $n = 8$ wildtype control mice. Intra- and interobserver variabilities were calculated as the difference of 2 measures performed on the same image divided by the mean of those 2 measurements expressed as a percentage. CO, cardiac output; TPVR, total peripheral vascular resistance; PI, Pourcelot index.

Herein, we produced homo- β thal mice that displayed a phenotype typical of human β -thalassemia major, with a pronounced β - to α -globin chain imbalance, for hemodynamic analysis. While no difference was noted in standard cardiovascular parameters such as the cardiac index, heart rate and mean blood pressure, significant blood flow changes were obtained in homo- β thal animals by measuring the total peripheral vascular resistance. Such flow alterations in homo- β thal mice were also observed on local flow waveforms, as determined by the PI. In human, PI derived from the Doppler waveform is a well-recognized parameter for the assessment of

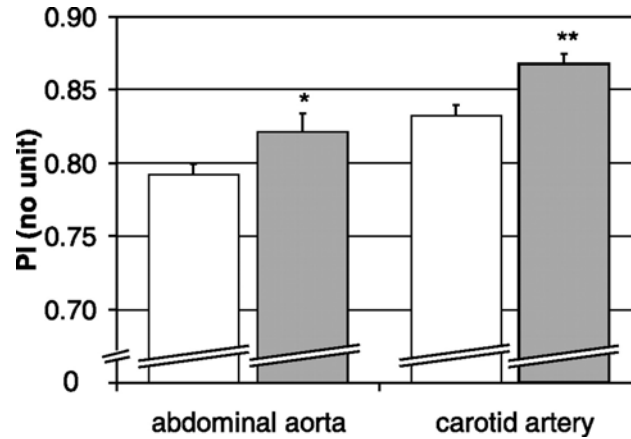


Figure 2.5: Doppler Pourcelot indexes (PI, no units) in the common carotid artery and abdominal aorta of homo- β thal (n = 17, shaded bars) and control (n = 19, open bars) mice. Data are means \pm SE. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

vascular hemodynamics. Hence, this study proposed a novel use of this parameter for the noninvasive evaluation of cardiovascular physiology in mice. The high-frequency ultrasound biomicroscope allowed accurate and reproducible Doppler flow velocity measurements in all animals and overcame the limitations of clinical ultrasound scanners (having a much lower spatial resolution and a larger probe head).

When compared with the total peripheral vascular resistance, PI provides alternative information on systemic hemodynamics and presents major advantages. Indeed, PI is highly reproducible and is more time efficient. Thus PI has considerable appeal as a means to evaluate noninvasively vascular impairment in mice. We showed from the Π -theorem (see Appendix in section 2.7) that PI is mainly related to the diastolic decay time measured at a specific location along the vascular tree. It should be noted that the Π -theorem is unable to provide a complete theoretical description of PI. According to the theoretical background provided in the Appendix, one can just state that PI is governed by the diastolic decay time normalized by the cardiac period when some physiological parameters such as the blood density and the cross-sectional area of the vessel are given. A more complete theoretical analysis is not straightforward and would require a series of numerical or analytical simulations in a complex model of the blood circulation. In this study, because the heart rate did not significantly differ from one group to another, we can only assert that PI was related to the so-called diastolic decay time (in a linear way or not) for measurements in the

ascending aorta and carotid artery. The diastolic decay time can be defined as the product of the local arterial compliance by the downstream vascular resistance, as in the Windkessel model. However, we cannot confirm this if one considers the numerous limitations of this last model⁽¹⁵⁴⁾.

Parameter	% of error
AoD (mm)	-5.4 ± 2.3
VTI (cm)	6.7 ± 4.7
CO (ml·min ⁻¹)	-11.1 ± 6.2
TPVR (mmHg·min·mL ⁻¹)	12.6 ± 8.2
PI (no unit):	
carotid artery	1.7 ± 1.8
abdominal aorta	2.1 ± 2.6

Table II-III: Intersession variability of the echographic parameters. Values are means \pm SE; n = 8 wildtype control mice. Intersession variability errors were calculated as the difference between the measurements performed by the same reader on the images obtained during 2 different scanning sessions separated by a 7-day interval.

An interesting finding was the fact that PI varied with the site of measurement. This was predictable, since, besides resistance and compliance, it is highly dependent on the cross-sectional area of the vascular bed downstream of the site of examination⁽¹⁵⁵⁾. Surprisingly, when compared with human physiology, we observed higher values of PI in the carotid (brain vascular network) than in the abdominal aorta (renal, abdominal, and lower limb vascular network) of mice. Because the flow waveform changes along the abdominal aorta, we noted that a small variation in the site of measurement could lead to high differences in PI values. Therefore, we defined, using B-mode imaging, a precise localization of the Doppler sample volume, just above the renal bifurcations, to ensure reproducible measurements.

An increase in vascular resistance to blood flow should theoretically be primarily determined by direct changes in arteriolar diameters⁽⁴³⁾ and by alterations of

the normal erythrocyte function, which is essential for the adequate flowing of blood in the macro- and microcirculation⁽¹⁵⁶⁾. In our homo- β thal mice, the increase in vascular resistance potentially results from alterations of the endothelium of blood vessels, a critical regulator of the vascular tone. The altered membrane composition of erythrocytes affecting their function, due to the precipitation of excess α -globin chains, may have also resulted in enhanced adherence of RBCs to endothelial cells and abnormal RBC aggregation increasing blood viscosity. Consequently, thromboembolic complications, as reported in β -thalassemic patients^(20; 145; 157), may explain the increased flow resistance in pathological β -thalassemic mice.

In summary, we have demonstrated the feasibility of performing noninvasive measurements of vascular hemodynamic properties by high-frequency ultrasonography in mice. Our results also showed, for the first time, *in vivo* evidence of flow disorders in β -thalassemic mice. The imaging approach, as developed in this study, will open the field of noninvasive circulatory investigation to additional mouse models and to dissection of the contribution of molecular and cellular modulators of flow. Importantly, our findings will not only be very pertinent for assessing vascular pathophysiology phenotype but also will provide crucial criteria for evaluating genetic treatment efficiency in β -thalassemia and other diseases impairing the flow of blood.

2.7 APPENDIX

2.7.1 PI: Theoretical Background

The PI is a dimensionless echographic parameter commonly used to characterize vascular hemodynamics downstream of an artery. PI depends on both the arterial compliance (C) and downstream vascular resistance (R)⁽¹⁵⁸⁾. It still remains unknown how these two variables mathematically relate to PI. A simple dimensional analysis may, however, help to better understand how PI varies with vascular parameters.

The arterial flow waveform is mainly characterized by the cardiac period (T), the mean flow rate, the arterial cross-sectional area, the blood density and viscosity, the pulse wave velocity along the artery, the wave reflection at bifurcations and at sites of vessel caliber changes, and parameters R and C. The pulse wave velocity is

affected by C and the blood density⁽¹⁵⁹⁾. On the other hand, the wave reflection depends on the cross-sectional area and pulse wave velocity⁽¹⁶⁰⁾. In addition, with the assumption that mean flow rate, arterial cross-sectional area, blood density, and viscosity have fixed values in a given animal, the Π -theorem⁽¹⁶¹⁾ allows one to write PI as a function of $R \times C \div T$. The product $R \times C$ is the diastolic decay time, and it characterizes the rate at which pressure inside an artery decays during diastole. This parameter reflects the mechanical behavior of the vascular tree, and it has been used in both animals and patients^(162; 163). The lower the PI and the higher the diastolic decay time, then, physiologically, the better the mechanical vascular property.

2.8 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported through the Canadian Institute of Health Research (CIHR #MOP-36467 to GC, #MOP-67233 to MT) and is now pursued through joint funding to GC and MT of the National Institutes of Health of USA (#RO1HL078655), the CIHR (#CMI 72323) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (#PG-05-0313). GC is recipient of the National Scientist Award of the “Fonds de la Recherche en Santé du Québec” (2004-2009). HF is supported by a studentship from the “Programme canadien des bourses de la francophonie”. The authors would like to thank Mr Erick Raymond-Beaubien for his contribution to the inter-observer variability study, and the Foundation of the University of Montreal Hospital for the purchase of the Visualsonics high-frequency ultrasound system.

CHAPITRE 3: ARTICLE 2

Endothelial dysfunction and vascular remodeling in β -thalassemic mice

3.1 AVANT-PROPOS

Tel que décrit au chapitre 2, les souris β -thalassémiques présentent une augmentation locale et globale de la résistance vasculaire à l'écoulement sanguin, tel que rapporté par les résultats de TPVR et de PI. Puisque la résistance est inversement proportionnelle au rayon vasculaire à la puissance 4 (voir section 1.2.1.2.1), une altération de la régulation du diamètre vasculaire, par exemple secondaire à une dysfonction endothéliale, peut entraîner d'importantes modifications de la résistance vasculaire. De plus, une perturbation chronique des propriétés hémodynamiques, p. ex. une modification du débit, peut entraîner un processus adaptatif de remodelage de la paroi vasculaire. Ainsi, les conclusions de l'article précédent entraînent deux questions principales : 1) Est-ce que l'augmentation de la résistance vasculaire chez les souris β -thalassémiques résulte, en partie, d'une dysfonction endothéliale? et 2) Est-ce que l'altération de l'hémodynamie vasculaire dans l'artère carotidienne commune des souris β -thalassémiques, se reflétant par une augmentation de PI, entraîne un remodelage de cette paroi vasculaire? L'article qui suit, en voie d'être soumis au journal *Cardiovascular Research*, s'intéresse à ces questions et démontre un dysfonctionnement de la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium chez les souris β -thalassémiques malgré une augmentation de l'expression de l'enzyme eNOS ainsi qu'un remodelage de la carotide commune caractérisé par un épaissement de la paroi vasculaire. La distensibilité de la carotide demeure cependant similaire entre les souris β -thalassémiques et leurs contrôles.

Le modèle de souris employé dans le cadre de nos expérimentations a été généré par transplantation de moelle osseuse combinée à un traitement de pré-conditionnement d'irradiation corporelle totale. Afin d'éliminer un effet

potentiellement confondant du protocole de transplantation sur l'interprétation des paramètres cardiovasculaires, le groupe de souris contrôle employé dans les études présentées par les articles 2 et 3 (chapitres 3 et 4) était généré par irradiation corporelle totale combinée à la greffe de CSH provenant de souris C57BL/6J.

Ma contribution à ce manuscrit était majeure puisque, en plus d'avoir rédigé l'article, j'ai effectué la quasi-totalité des expérimentations, soit les études de la réactivité et de la mécanique vasculaires, l'immunobuvardage de type Western, les analyses histologiques et statistiques. Dr Hady Felfly et Dre Wafaa Lemsaddek ont généré les souris β -thalassémiques en effectuant les expériences de transplantation de CSH et l'évaluation de la prise du greffon. Dr Damien Garcia a participé à l'analyse des résultats de mécanique vasculaire. Dre Marie Trudel et Dr Guy Cloutier ont contribué à la révision et la correction du manuscrit.

Endothelial dysfunction and vascular remodeling in β -thalassemic mice

Ekatherina Stoyanova^{1,2}, Guy Cloutier², Hady Felfly¹, Wafaa Lemsaddek¹, Marie Trudel¹

¹ Institut de recherches cliniques de Montréal, Molecular Genetics and Development, Faculte de Medecine de L'Universite de Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

² Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada,

Running title: A novel mechanism for β -thalassemia cardiopathy

Key words: thalassemia, cardiovascular complications, heart, myocardial iron overload, murine model of hemoglobinopathy

*Correspondence:

Marie Trudel, Ph.D.

Institut de Recherches Cliniques de Montreal,

110 ouest avenue des Pins

Montreal, Quebec, Canada H2W1R7.

Tel: (514) 987-5712

3.2 ABSTRACT

Human β -thalassemia major is one of the most prevalent genetic disease characterized by decrease or absence of β -globin chain production with consequent reduction of erythrocyte number and hematologic alterations. The main cause of death of treated β -thalassemia major with chronic blood transfusion is early cardiac complications that have been attributed to secondary iron overload despite optimal chelation. **Methods and Results:** Herein, we investigated the pathophysiological mechanisms of cardiovascular dysfunction in a severe murine model of β -thalassemia from 6 to 15-months of age in the absence of confounding effects related to transfusion. Our longitudinal analysis showed that β -thalassemia mice first display a significant increase of cardiac output in response to limited oxygen-carrying erythrocytes that progressed rapidly to left ventricular hypertrophy and structural remodeling. Following this compensated hypertrophy, the β -thalassemia mice developed age-dependent deterioration of left ventricular contractility and dysfunction that led toward decompensated heart failure. Consistently, murine β -thalassemic hearts histopathology revealed cardiac remodeling with increased interstitial cardiac fibrosis but virtual absence of myocardial iron deposits. Importantly, development of thalassemic cardiac hypertrophy and dysfunction independently of iron overload has uncoupled these cardiopathogenic processes. **Conclusion:** Together our study on the pathophysiology in β -thalassemia major hemoglobinopathy showed that not only severe chronic anemia but also additional secondarily induced mechanisms are major contributors to thalassemic cardiopathy.

3.3 INTRODUCTION

β -thalassemia is an inherited hemoglobin disorder resulting from impaired production of β -globin chains of the hemoglobin tetramer. The resultant phenotype is a chronic hemolytic anemia of varying severity, depending on the level of β -globin chain deficiency and subsequent α -globin chain accumulation. β -thalassemia major is characterized by a severe transfusion-dependent anemia starting from the first year of life, while β -thalassemia intermedia represents a milder, generally transfusion-independent form with a later clinical onset⁽¹²⁹⁾. Transfusion therapy in β -thalassemia major patients requires adequate iron chelation treatments since it initiates progressive

accumulation of iron in several organs causing subsequent tissue damage, and eventually, death.

Although lifelong blood transfusions combined with adequate chelation therapy have significantly improved survival in β -thalassemia major patients, cardiac complications remain the main mortality cause in both β -thalassemia major and intermedia^(129; 131; 164). Additionally, arterial and venous thromboembolic events in β -thalassemia major patients⁽¹¹¹⁾ have also been reported. In fact, several pathogenic factors contribute to these complications, including a chronic hypercoagulable state⁽¹¹³⁾, increased erythrocyte aggregation⁽⁴⁸⁾ and endothelial adhesion of thalassemic erythrocytes⁽¹²⁰⁾. Furthermore, *in vivo* evidence of endothelial cell activation^(122; 123) and impaired flow-mediated dilation in brachial arteries of β -thalassemic patients^(124; 125) suggest the implication of endothelial dysfunction in the pathogenesis of the abovementioned vascular complications. Studies reported flow-mediated endothelial dysfunction in conduit arteries of optimally chelated transfusion-dependent β -thalassemic patients⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾. However uncertainty remains regarding the integrity of the resistance artery endothelial vasomotor function. Moreover, while these clinical studies have suggested a decrease in nitric oxide (NO) bioavailability, the enzymatic expression of NO synthase (NOS) has not been documented.

Additionally, endothelial dysfunction generally leads to vascular remodeling⁽¹⁶⁵⁾, namely structural alterations in the arterial wall and, consequently, to potential changes in mechanical properties. In β -thalassemic patients, ultrasonographic measurements demonstrated impaired elastic properties of the aorta^(128; 166) and carotid artery⁽¹²⁴⁾, suggesting a reorganization of the vascular wall involving smooth muscle cells, elastin and collagen. Such a hypothesis remains to be verified.

Several β -thalassemic mouse models replicating phenotypic aspects and hematological anomalies of β -thalassemia major have been produced for characterization of pathogenesis and for development of potential therapeutic strategies. To date, however, no studies have investigated vascular function and structure in β -thalassemic mice. In addition, vasculature in β -thalassemia has not yet been studied without the confounding effects of transfusions and subsequent

transfusional iron overload. The objectives of this study were to characterize endothelial vasodilatory function of isolated mesenteric resistance arteries by focusing on the NO system and to evaluate mechanical properties and structure of the carotid artery in a non-transfused mouse model of β -thalassemia major.

3.4 METHODS

3.4.1 Experimental animals

Experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care Committees of the University of Montreal Hospital Research Center and of the Clinical Research Institute of Montreal, as well as those of the Canadian Council on Animal Care.

Male bone marrow transplanted control (BMT control, $Hbb^{+/+}$) and homozygous β -thalassemic mice (homo- β thal, $Hbb^{d3(th)/d3(th)}$) were generated as described previously⁽¹⁶⁷⁾. Briefly, control C57BL/6J mice obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and β -thalassemic mice homozygous for a deletion of the murine β -major gene ($Hbb^{d3(th)/d3(th)}$)⁽³⁵⁾ bred onto C57BL/6J background for > 16 generations were used. Bone marrow cells harvested from either homozygous β -thalassemic ($Hbb^{d3(th)/d3(th)}$) or wild-type C57BL/6J- $Gpi1^a$ ($Hbb^{+/+}$) donors were injected (1.8×10^6 cells) in lethally irradiated (8.75 Gy, Mark I-68A-1 Research Irradiator, San Francisco, CA) two month-old C57BL/6J- $Gpi1^b$ recipients. Bone marrow engraftment was evaluated in both mouse groups 4 months following transplantation. Only recipients displaying complete hematopoietic engraftment were included in the study, i.e. recipients with the sole expression of either hemoglobin minor for homo- β thal mice or the specific glucose phosphate isomerase isotype marker $Gpi1^a$ for BMT controls.

Hematocrit levels were determined in 14 month-old mice immediately before sacrifice. The entire intestine and the left common carotid artery were quickly dissected and placed in ice cold physiological saline solution (PSS). The abdominal aorta was also dissected, blotted dry, quickly frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until assayed. Heart, lungs and spleen were excised, blotted dry and weighted.

3.4.2 Functional studies of resistance arteries

Second-order branches of mesenteric arteries (~150-250 μm in diameter) from 10 BMT control and 9 homo- β thal mice were carefully dissected from all adherent connective tissue and bathed in a 5 mL organ chamber containing a PSS of the following composition (in mmol/L): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.18 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 0.026 EDTA and 5.5 glucose, maintained at pH 7.4, warmed to 37°C and continuously bubbled with 12% O₂, 5% CO₂, and 83% N₂. Each arterial segment was mounted and secured on two glass microcannulas using nylon ties, in a video-monitored pressure arteriograph system (Living Systems, Burlington, USA). The distal cannula was occluded to prevent flow, after residual blood was gently washed out of the vessel lumen. The proximal cannula was connected to a pressure transducer to maintain a constant intraluminal pressure using a servo-control unit and a peristaltic pump. The arteriograph system was placed on the stage of an inverted microscope (Nikon Eclipse TS100, Melville, NY) equipped with a video camera to monitor and measure the vessel lumen diameter. The distance between moving cannulas was carefully adjusted to obtain a horizontal vessel alignment without further stretch. Experimental measures were started 1h after equilibration at 45 mmHg intraluminal pressure. Between each protocol described next, the system was washed out with PSS, reequilibrated for 30 min and the resting lumen diameter was measured. The vascular contractile reactivity was evaluated by dose-response curves to norepinephrine (NE, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ mol/L). Endothelium-dependent and independent relaxations to cumulative concentrations of acetylcholine (ACh, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ mol/L) and sodium nitroprusside (SNP, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada, 10⁻⁹ to 10⁻³ mol/L), respectively, were assessed by measuring dilatory responses in vessels pre-contracted with a sub-maximal concentration of NE (the concentration that produced 75 to 80% of maximal contraction, i.e. EC₇₅-EC₈₀). To study the contribution of NO to the ACh-induced relaxations, concentration-response measurements were repeated after a 30 min pre-incubation with *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada, 10⁻⁴ mol/L). The relaxation was determined as a percentage of increase in lumen diameter from the resting diameter.

3.4.3 Mechanical studies of carotid arteries

Left carotid arteries of 13 BMT controls and 11 homo- β thal mice were mounted onto the pressure arteriograph, adjusted to their *in vivo* length by displacing cannulas and deactivated by perfusing with warmed and continuously bubbled Ca^{2+} -free PSS containing 10 mmol/L EGTA for 45 min at 45 mmHg. The intraluminal pressure was then raised 3 times from 3 to 140 mmHg to unbuckle arteries. Vascular mechanics were evaluated by increasing intraluminal pressure from 3 to 180 mmHg by steps of 10 mmHg (except for the first step which was from 3 to 10 mmHg). For each pressure step, lumen diameter and wall thickness were measured by microscopy at 3 different positions along the vessel.

Carotid vascular wall cross-sectional area (CSA) was calculated, at 80 mmHg, as: $(\pi/4) \times (D_e^2 - D_i^2)$, where D_e and D_i represent external and intraluminal diameters, respectively. Circumferential strain (ε) was determined as $(D_i - D_{i(0)})/D_{i(0)}$, where $D_{i(0)}$ is the lumen diameter at 3 mmHg. Circumferential stress (σ) was given by $\sigma = (P \times D_i)/(2W)^{(168)}$, where P is the intraluminal pressure in dynes/cm² and W the wall thickness. An exponential fitting regression was performed on the stress-strain relationship of each vessel with the equation: $\sigma = \sigma_0 e^{\beta \varepsilon}$, where the amplitude σ_0 stands for the stress at the diameter $D_{i(0)}$ and the exponent β is the rate of increase of the stress-strain curve. This exponential model was used to reduce the tangential elastic modulus ET to $d\sigma/d\varepsilon = \beta\sigma$. Therefore, β also represents the slope of ET-to-stress relationship and thus reflects non-linear elastic properties of vascular wall components. An increase in β indicates increased local stiffness. The incremental distensibility, expressed as the fractional change in lumen diameter ($\Delta D_i/D_{i(0)}$) per change in intraluminal pressure (ΔP), was calculated as: $100 \times \Delta D_i / (D_{i(0)} \times \Delta P)$. Distensibility reflects global vascular mechanical properties.

3.4.4 Protein expression analysis

Frozen abdominal aortas (n=6 per group) were separately pulverized in the presence of liquid nitrogen and the powder was homogenized in a lysis buffer (pH 8) containing 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA and 0.5% Triton $\times 100$ supplemented with a protease inhibitor cocktail (No. P8340, Sigma-Aldrich, Oakville,

Canada) and PMSF (1 mM final concentration). Samples were incubated for 30 min on ice and centrifuged at 4°C for 5 min. The supernatants were collected and stored at -20°C. Protein concentrations of lysates were determined by spectrophotometric Bradford protein assay (No. 500-0006, Bio-Rad, Mississauga, Canada) using bovine serum albumin as standard. Protein lysate of bovine aortic endothelial cells (BAEC; 2 µg) was used as positive control. Equal amounts of aortic protein (20 µg/lane, except BAEC control lane) were loaded, separated by SDS-PAGE with Novex 8% Tris-Glycine Pre-cast gel system (No. EC6018, Invitrogen, Burlington, Canada) and transferred to a nitrocellulose membrane. Nonspecific sites were blocked with 5% nonfat powdered milk in phosphate buffered saline (pH 7.4) with 0.1% Tween 20 (PBST) for 1 hr at room temperature. The membrane was incubated with the primary mouse monoclonal antibody against eNOS (1:500; No.610296, BD Transduction Laboratories, Mississauga, Canada) for 2 hr at 4°C, washed 3 times (5 min each) in PBST and incubated with the secondary antibody (peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin 1:5000; No. A4416, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) for 1 hr at 4°C. The membrane was then washed 3 times for 5 min in PBST and signal was detected by using a ECL Western blotting detection system (No. RPN2132, Amersham, Baie d'Urfé, Canada). Band intensity was quantified and expressed as a percentage of BMT control band intensity. Constitutively expressed protein GAPDH served as an internal control.

3.4.5 Histopathology analysis

At the end of mechanical experiments, common carotid arteries from BMT control and homo- β thal mice (n=8 in each group) were fixed overnight in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin and cut serially in 5 µm cross-sections. Tissue sections were stained with Sirius red for collagen or Verhoeff van Gieson for elastin. For all sections of a specific staining, images were taken at the same light intensity and exposure time settings (polarized light for Sirius red and transmitted light for Verhoeff's van Gieson). For each staining, 6 sections per vessel were analyzed. Quantification analysis of media CSA (MCSA) and relative surface of medial elastin and collagen were measured in post-processing (Matlab software, ver. 7, release 14, Natick, MA).

3.4.6 Statistical analyses

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis of dose-response curves and mechanical parameters were carried out with two-way ANOVA for repeated measures by using the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. Wall CSA, histological and protein expression data were analyzed by unpaired Student *t* tests. $P < 0.05$ was considered significant.

3.5 RESULTS

Fourteen month-old homo- β thal mice were severely anemic and displayed significant splenomegaly, as described in human β -thalassemia major. Homo- β thal mice also had smaller body weights and increased lung and heart weights normalized to body weight, when compared with BMT controls (*Table III.I*). The 65% increase in normalized heart weight is indicative of cardiac hypertrophy, a phenotype consistent with severe clinical β -thalassemia⁽¹³⁰⁾.

	BMT control (n = 13)	Homo- β thal (n = 11)
Body weight (g)	32.7 \pm 1.3	28.1 \pm 0.8*
Hct (%)	41.9 \pm 1.1	27.0 \pm 1.2 [†]
Heart weight to BW (mg/g)	4.5 \pm 0.2	7.3 \pm 0.3 [†]
Lung weight to BW (mg/g)	4.6 \pm 0.2	5.9 \pm 0.1 [†]
Spleen weight to BW (mg/g)	2.2 \pm 0.3	11.4 \pm 1.2 [†]

Table III.I : Characteristics of 14-month old animals. Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$; [†] $p < 0.001$ vs. BMT control mice. BW, body weight; Hct, hematocrit.

3.5.1 Vasomotor responses in mesenteric arteries

Vascular function was assessed in isolated mesenteric arteriole preparations of 14 month-old BMT control (n=10) and homo- β thal (n=9) mice. NE mediated vascular contractions and endothelium-independent vasodilations stimulated by SNP were similar in both groups (Figures 3.1 and 3.2 C). These results are indicative of preserved smooth muscle cell function in homo- β thal mice. The endothelium-dependent vasodilation to ACh, however, was significantly impaired in homo- β thal mice (Figure 3.2 A). The ACh-induced relaxation was attenuated by L-NAME to the same extent in both groups (Figure 3.2 B). Therefore, β -thalassemic mice exhibited endothelial vasodilatory dysfunction with preserved smooth muscle cell function.

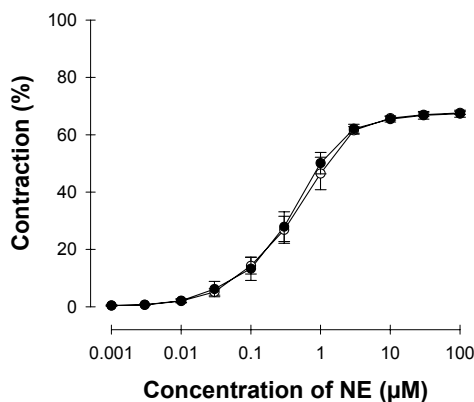


Figure 3.1: Vasoconstrictive response of mesenteric resistance arterioles to norepinephrine (NE) in 14-month old BMT control (○; n = 10) and homo- β thal (●; n = 9) mice. Contraction was expressed as percentage change in lumen diameter compared with baseline. Data are means \pm SEM.

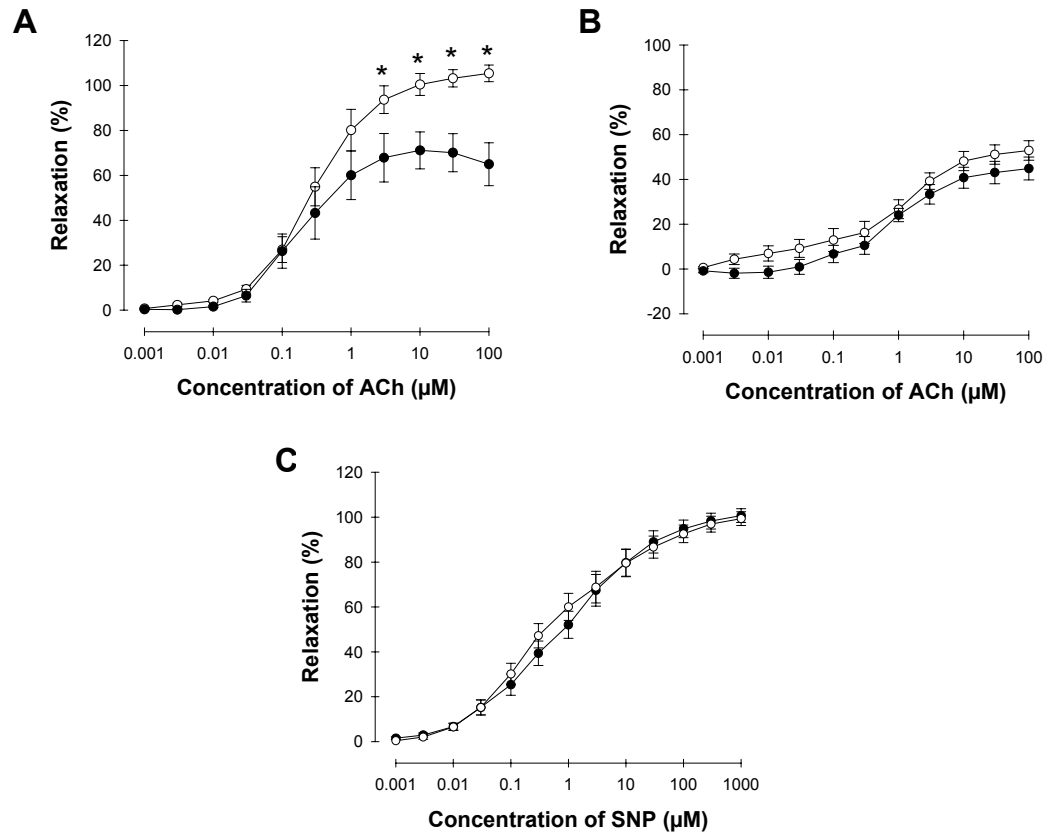


Figure 3.2: Vasodilatory responses of mesenteric resistance arterioles to acetylcholine (ACh) in the absence (A) or presence of L-NAME (B), or to sodium nitroprusside (SNP, C) in BMT control (○; $n = 10$) and homo- β thal (●; $n = 9$) mice. Relaxation in norepinephrine contracted arterioles is expressed as a percentage change in lumen diameter compared with baseline. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$.

3.5.2 Aortic eNOS protein expression

We assessed through aortic Western blot analysis, whether the alteration in endothelium-dependent vasodilation was secondary to changes in eNOS expression. Homo- β thal mice showed a 2-fold increase in eNOS expression versus BMT controls ($p < 0.05$, Figure 3.3). Thus, the aforementioned endothelial dysfunction occurred despite an up-regulation of eNOS.

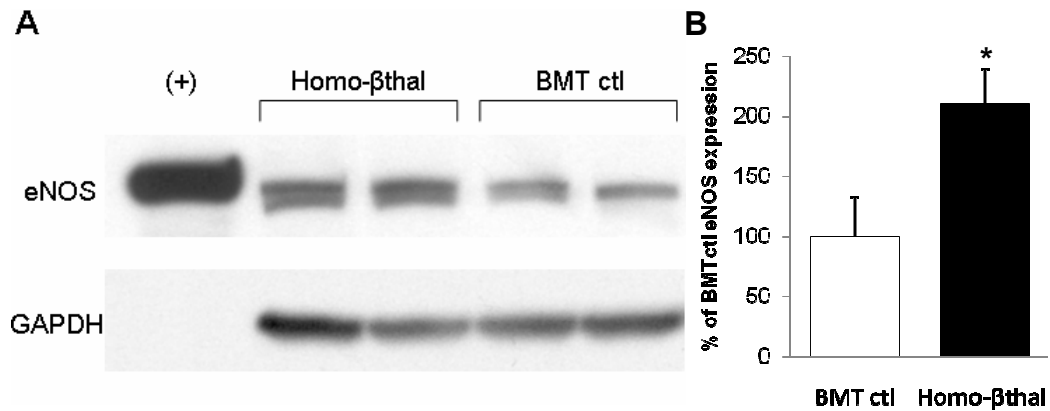


Figure 3.3: eNOS protein expression in aortas of BMT control and homo- β thal mice. (A) Representative Western blot and (B) densitometric analysis of the eNOS protein expression ($n = 6$ mice per group). Measurements are expressed as % of the eNOS bands in aortas of BMT control mice. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$.

3.5.3 Carotid artery vascular mechanics

The mechanical properties of carotid arteries of BMT control ($n=13$) and homo- β thal ($n=11$) mice were studied by correlating passive changes in vascular diameters to stepwise increases in intraluminal pressure. Carotid arteries of both groups displayed similar increases in luminal diameter in response to the increase in intraluminal pressure from 3 to 180 mmHg (Figure 3.4 A). Because of vascular wall thickening in homo- β thal mice (as confirmed by the higher CSA at 80 mmHg, $p < 0.05$, Figure 3.4 B, insert), carotid external diameters were significantly larger at all intraluminal pressures (Figure 3.4 B). Circumferential strains were higher in homo- β thal compared with BMT control mice between 50-80 mmHg and were similar at all other intraluminal pressures (Figure 3.4 C). Circumferential wall stresses were significantly lower in homo- β thal carotid arteries at intraluminal pressures above 60 mmHg (Figure 3.4 D). Consequently, the non-linear circumferential stress-strain curve was shifted rightward in that group (Figure 3.4 E), which is indicative of softer arteries. This is confirmed by the lower mean values of β (slope of the tangential elastic strain modulus-to-stress relation) in homo- β thal mice (3.11 ± 0.08 , $p < 0.01$) when compared to BMT controls (3.43 ± 0.05). These results suggest that wall component stiffness of carotid arteries of homo- β thal mice is decreased when

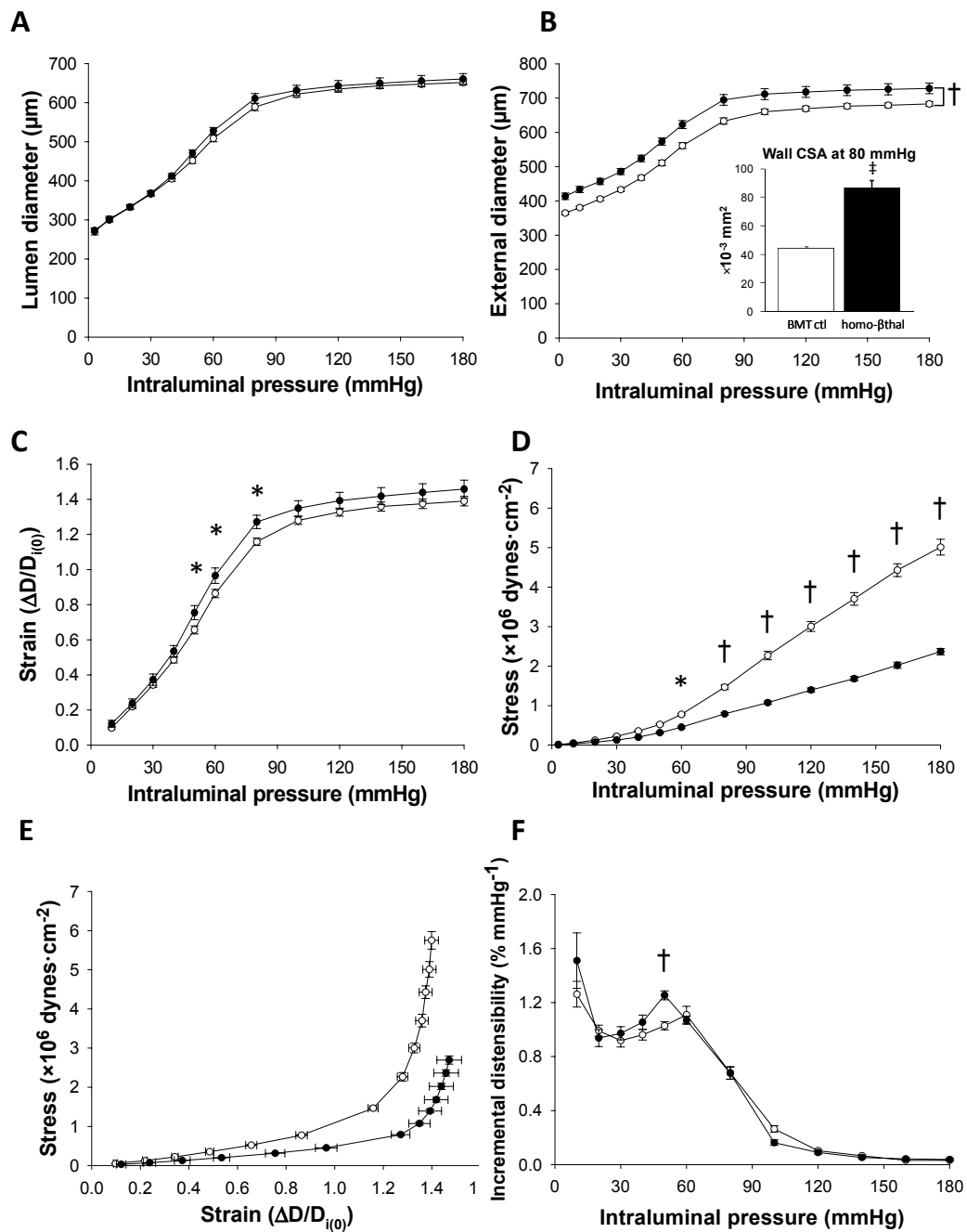


Figure 3.4: Intraluminal diameter (A), external diameter (B), circumferential strain (C), circumferential stress (D), stress-strain relationship (E) and incremental distensibility in BMT control (\circ ; $n = 13$) and homo- β thal (\bullet ; $n = 11$) mice. The wall cross-sectional area (CSA) at 80 mmHg is presented as an insert in panel B. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$; $\dagger p < 0.001$. The curve in panel E exhibited a rightward shift in the homo- β thal group as shown by a significant decrease in β ($p < 0.01$), the slope of the tangential elastic strain modulus-to-stress relation.

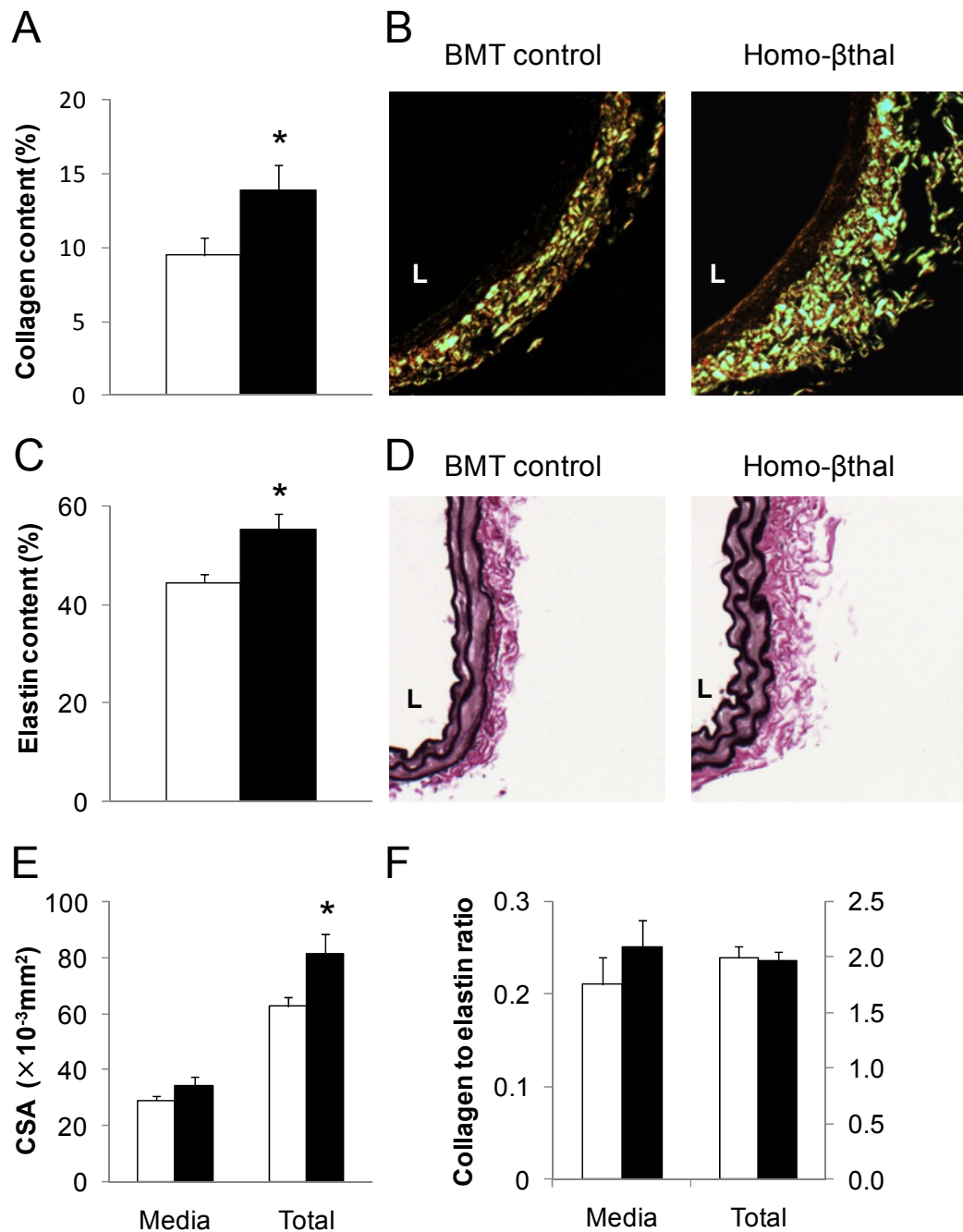


Figure 3.5: Composition of left common carotid arteries in BMT control (open bars) and homo- β thal mice (closed bars, $n = 8$ per group). Collagen (A) and elastin (C) content in the media and representative microscopy images of Sirius red stained sections for collagen (B) and Verhoeff van Gieson stained sections for elastin (D) photographed under polarized and transmitted light, respectively. Measurements of media and total cross-sectional areas (E). Collagen to elastin ratios in the media and total vascular wall (F). Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$. L, vascular lumen.

compared to BMT controls. However, as indicated in Figure 3.4 F, carotid artery vascular distensibilities were overall similar (except at 50 mmHg).

3.5.4 Carotid artery composition

Histological analysis of carotid arteries confirmed the significant increase in total wall CSA of homo- β thal mice (Figure 3.5 E, $p < 0.05$). The media CSA was similar in vessels of both groups. Sirius red and Verhoeff van Gieson stainings revealed, respectively, that relative surfaces of collagen and elastin in the media of homo- β thal carotid arteries were significantly increased when compared with BMT controls (Figure 3.5 A-D, $p < 0.05$). Media and total wall collagen-to-elastin ratios remained similar in both groups.

3.6 DISCUSSION

The endothelium-mediated NO vasodilation in resistance arteries, and mechanical properties and structure of the common carotid artery in β -thalassemic mice were investigated. The results have demonstrated that: 1) β -thalassemic mice, homozygous for a deletion of the murine β -major gene, display significant impairment of resistance arteriole endothelial-dependent vasodilator function in conjunction with increased levels of eNOS expression; and 2) carotid arteries of β -thalassemic mice are characterized by wall thickening with increased collagen and elastin content while distensibility remained similar.

Endothelium-dependent vascular reactivity

Previous clinical studies have suggested that endothelial dysfunction in conduit arteries of β -thalassemic patients was resulting from decreased NO bioavailability⁽¹²⁵⁾. Our results are consistent with these prior reports, since we observed attenuated endothelium-dependent vasodilation to ACh in resistance arteries of β -thalassemic mice. NO bioavailability is determined by a balance between NO production and consumption. Our results present for the first time that endothelial dysfunction in β -thalassemia occurs despite increased eNOS expression levels. This data suggests either an impairment of NOS activity or an increase in NO scavenging. β -thalassemia is associated with chronic intravascular hemolysis that is known to induce decompartmentalization of two main erythrocyte components into

the plasma: hemoglobin and arginase⁽¹⁶⁹⁾. Cell-free plasma hemoglobin rapidly reacts with, and deactivates, NO⁽¹⁷⁰⁾, and has been shown to induce *in vivo* significant decrease in NO bioavailability and endothelial dysfunction⁽¹⁷¹⁾ by limiting NO diffusion from the endothelium to smooth muscle cells and consequently inhibiting vasodilation. While this mechanism of NO-scavenging is likely to contribute in further decreases of *in vivo* NO bioavailability in β -thalassemia, it does not apply to the current experimental *ex vivo* setting of isolated mesenteric arterioles. However, spontaneous release of erythrocyte arginase during intravascular hemolysis may limit cellular availability of the eNOS substrate for NO synthesis, L-arginine, resulting in a deficiency of NO production. In fact, studies of patients affected with sickle cell disease, another hemoglobinopathy inducing chronic hemolytic anemia, have shown increased intravascular hemolysis-related plasma arginase activity⁽¹⁶⁹⁾. In β -thalassemia patients, elevated erythrocyte arginase activity strongly correlating to plasma arginase activity, has also been reported⁽¹⁷²⁾. In β -thalassemic arteries, decreased plasmatic L-arginine should lead to decreased cellular uptake of the substrate and consequent alteration of NO production despite an increase of eNOS expression.

Moreover, further decreases of NO bioavailability may also result from increased oxidative stress. A common mechanism of endothelial dysfunction in hemolytic anemias has been suggested by studies on β -thalassemia⁽¹⁷³⁾, sickle cell disease⁽¹⁷⁴⁾ and mouse models of severe hemolysis⁽¹⁷⁵⁾ reporting increased oxidizing potential of plasma, possibly generated directly by cell-free hemoglobin, heme and heme-iron⁽¹⁷⁶⁾, which might damage and activate endothelium by exerting oxidative injury. In addition, enzymatic pathways of overproduction of reactive oxygen species (ROS), such as superoxide, by activation of vessel wall xanthine oxidase and NADPH oxidase, have also been suggested to play a role in the generation of oxidative stress in both β -thalassemia and sickle cell disease⁽¹⁶⁹⁾. Finally, the paradoxical decrease in NO production even though eNOS levels were increased might reflect an eNOS uncoupling mechanism. The possible decrease in availability of L-arginine might lead to disruption or uncoupling of the eNOS dimer causing the production of superoxide instead of NO^(177; 178), adding further to the reduction in NO bioavailability and the increase in oxidative stress in β -thalassemia.

Endothelium-independent vascular reactivity

Additionally, a discrepancy with respect to previous clinical investigations was reported concerning endothelium-independent vasodilation in β -thalassemia^(124; 125; 127). Indeed, our findings confirm preserved endothelium-independent vasodilation to SNP, a direct donor of NO metabolized by smooth muscle cells. This important insight indicates that resistance arteriole vasodilatory impairment occurs in the absence of vascular smooth muscle cell dysfunction in NO signaling at the level of the guanylate cyclase-cGMP system. Therefore, conversely to findings in sickle cell anemic patients and mouse models⁽¹⁷⁹⁾, vascular dysfunction in our β -thalassemic mice does not seem to be associated with NO resistance or lack of responsiveness.

Carotid artery structure and mechanical properties

The β -thalassemia major mouse model not only had impaired resistance arteriole endothelial-mediated vasomotor function but also displayed altered carotid artery structure with changes in mechanical properties of wall components. While clinical studies reported increased carotid artery intima-media thickness in β -thalassemia major patients⁽¹⁸⁰⁾, our study demonstrated the development of carotid artery wall hypertrophy characterized by an increase in total wall thickness. This wall thickening was associated with growth in both medial collagen and elastin densities within the β -thalassemic carotid artery wall with similar total and medial ratios of collagen-to-elastin content. As a result, carotid artery distensibility was comparable in both mouse groups, while stiffness of carotid wall components was decreased in β -thalassemic mice.

It is classically recognized that arterial stiffness of large elastic arteries, such as the carotid artery, is mainly determined by the composition of the extracellular matrix and its structural components such as collagen and elastin fibers. However, other factors must be taken into consideration when interpreting stiffness results. In fact, global mechanical behavior of arteries is highly determined by the three-dimensional organization of structural components rather than by their relative content. Studies have shown an important role of structural characteristics, such as the area and number of fenestrations of the elastic lamina, or integrin-mediated interactions between extracellular matrix and smooth muscle cells, in the determination of arterial

mechanical strength and stiffness⁽⁵⁴⁾. Therefore, the underlying mechanism of preserved carotid wall distensibility in the presence of wall thickening and decreased stiffness of wall components in β -thalassemic mice likely implies complex interactions between several factors and requires further analysis.

Clinical studies in β -thalassemia major patients have reported increased arterial stiffness of carotid arteries^(124; 180), brachial arteries^(124; 126), and ascending⁽¹²⁸⁾ and abdominal aortas⁽¹⁸¹⁾. The explicative mechanisms of discrepancy between these clinical and our murine β -thalassemia vascular mechanical results remain unknown and require further investigation. Nevertheless, clinical studies have also demonstrated that the stiffness of the abdominal aorta in regularly transfused β -thalassemia major patients was increased in relation to liver iron concentration, a reliable indicator of tissue iron loading⁽¹⁸¹⁾. Iron overloading has been known to increase systemic and vascular wall ROS generation which might contribute to the development of vascular injury⁽¹⁸²⁾. These findings thus lead us to hypothesize that the β -thalassemic vasculature remodels differently in the absence of palliative transfusion treatments leading to iron-overloading.

While the exact molecular process of vascular remodeling in β -thalassemic mice remains to be clarified, anemia induced hypoxia and oxidative damage might have contributed to arterial structural changes. In fact, hypoxia is known to promote vascular cellular proliferation and matrix synthesis by inducing a variety of genes in endothelial cells leading to production of mitotic factors such as platelet derived growth factor B (PDGF-B), insulin-like growth factor (IGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF)⁽¹⁸³⁾. Additionally, studies have indicated that ROS might induce vascular structural and functional alterations by activating several intracellular signaling cascades, namely through the activation of extracellular signal regulated kinases (ERKs), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), tyrosine kinases, protein tyrosine phosphatases and transcriptional factors such as NF κ B and AP-1⁽¹⁸⁴⁾.

In conclusion, our study of non-transfused β -thalassemic mice provides evidence of functional alterations of endothelium-dependent vascular responses characterized by dysregulation of endothelial NO production and consequent NO bioavailability. Additionally, endothelial dysfunction of resistance arterioles occurred

concomitant with structural alterations of the carotid artery wall and modifications of mechanical properties of wall components. It was hypothesized that hemolysis may contribute to the pathophysiology of both endothelial dysfunction, and vascular structural and mechanical changes in β -thalassemia, and treatments targeting hemolysis related complications, namely erythrocyte decompartmentalization of hemoglobin and arginase, may represent potential therapeutic strategies for these cardiovascular complications. Future investigations with this mouse model should allow a better understanding of the underlying molecular processes in the pathogenesis of β -thalassemia major vasculopathy.

CHAPITRE 4: ARTICLE 3

β -thalassemia induces cardiac dysfunction and remodeling independently of myocardial iron loading

4.1 AVANT-PROPOS

Les complications cardiaques chez les patients atteints de β -thalassémie majeure sont généralement attribuées aux dépôts de fer myocardique secondaires aux transfusions sanguines chroniques. L'article qui suit, visant à être soumis à la revue *Haematologica*, décrit les évaluations morphologiques et fonctionnelles cardiaques chez des souris β -thalassémiques non-transfusées. Les résultats de cette étude montrent, pour la première fois, le développement d'une hypertrophie et une dysfonction ventriculaire gauche en l'absence de transfusions sanguines chroniques. En plus de démontrer l'absence de dépôts directs de fer dans le myocarde, les analyses histologiques indiquent la présence abondante de fer dans les tubules rénaux résultant possiblement de l'hémolyse intravasculaire. Nous proposons donc un modèle des désordres cardiaques de la β -thalassémie impliquant un état de débit cardiaque élevé combiné à une surcharge du travail causée par l'hémolyse intravasculaire.

Ma contribution à cet article était majeure puisque, en plus d'avoir rédigé le manuscrit, j'ai exécuté la quasi-totalité des expérimentations, soit les évaluations échocardiographiques, les analyses histologiques et hématologiques. J'ai également effectué l'analyse statistique et l'interprétation des données. Dr Hady Felfly et Dre Wafaa Lemsaddek ont généré les souris β -thalassémiques en effectuant les expériences de transplantation de CSH et l'évaluation de la prise du greffon. Dre Wafaa Lemsaddek m'a également assisté dans les prélèvements d'échantillons sanguins pour fin d'analyse hématologique. Dr Guy Cloutier et Dre Marie Trudel ont contribué à la révision et la correction du manuscrit.

β -thalassemia induces cardiac dysfunction and remodeling independently of myocardial iron loading

Ekatherina Stoyanova^{1,2}, Guy Cloutier², Hady Felfly¹, Wafaa Lemsaddek¹, Marie Trudel¹

¹ Institut de recherches cliniques de Montréal, Molecular Genetics and Development, Faculte de Medecine de L'Universite de Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

² Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada,

Running title: A novel mechanism for β -thalassemia cardiopathy

Key words: thalassemia, cardiovascular complications, heart, myocardial iron overload, murine model of hemoglobinopathy

*Correspondence:

Marie Trudel, Ph.D.

Institut de Recherches Cliniques de Montreal,

110 ouest avenue des Pins

Montreal, Quebec, Canada H2W1R7.

Tel: (514) 987-5712

4.2 ABSTRACT

Human β -thalassemia major is one of the most prevalent genetic disease characterized by decrease or absence of β -globin chain production with consequent reduction of erythrocyte number and hematologic alterations. The main cause of death of treated β -thalassemia major with chronic blood transfusion is early cardiac complications that have been attributed to secondary iron overload despite optimal chelation. **Methods and Results:** Herein, we investigated the pathophysiological mechanisms of cardiovascular dysfunction in a severe murine model of β -thalassemia from 6 to 15-months of age in the absence of confounding effects related to transfusion. Our longitudinal analysis showed that β -thalassemia mice first display a significant increase of cardiac output in response to limited oxygen-carrying erythrocytes that progressed rapidly to left ventricular hypertrophy and structural remodeling. Following this compensated hypertrophy, the β -thalassemia mice developed age-dependent deterioration of left ventricular contractility and dysfunction that led toward decompensated heart failure. Consistently, murine β -thalassemic hearts histopathology revealed cardiac remodeling with increased interstitial cardiac fibrosis but virtual absence of myocardial iron deposits. Importantly, development of thalassemic cardiac hypertrophy and dysfunction independently of iron overload has uncoupled these cardiopathogenic processes. **Conclusion:** Together our study on the pathophysiology in β -thalassemia major hemoglobinopathy showed that not only severe chronic anemia but also additional secondarily induced mechanisms are major contributors to thalassemic cardiopathy.

4.3 INTRODUCTION

β -thalassemia is among the most common monogenic hereditary disorder. β -thalassemia results from mutations that reduce or abolish expression of β -globin gene and thus hemoglobin production in red blood cells (RBC). According to the decrease in β -globin levels, two forms are distinguished: a moderate β -thalassemia intermedia and a severe β -thalassemia major. The hallmark of this disorder is hemolytic anemia with hypochromic and microcytic RBC. β -thalassemia is also characterized by marked destruction of RBC leading to stimulation of erythroid cell differentiation and

elevated reticulocytes. β -thalassemia major is a life-threatening condition that necessitates chronic blood transfusion therapy from early childhood whereas β -thalassemia intermedia is usually transfusion-independent.

β -thalassemia major causes high mortality and morbidity. In the 1970s, individuals with β -thalassemia major had a mean lifespan of ~ 17 years⁽¹⁸⁵⁾ but under optimal iron chelation therapy in the last four decades, the prognosis has been greatly improved by >25 years^(25; 186). β -thalassemia patients display severe systemic manifestations with damage to tissues or organs affecting mainly the spleen, liver, kidneys, lungs, bone marrow and heart⁽¹⁸⁷⁾. Characteristic histopathologic anomalies in these various organs consist of iron deposits and/or fibrosis⁽⁹⁾. In addition, the spleen is affected by entrapment of RBC and by increased extramedullary hematopoiesis to compensate erythroid cell destruction⁽¹⁸⁸⁾. Most importantly, cardiac complications have been shown to be the most common cause of death in β -thalassemia intermedia and major patients^(130; 189; 190).

Cardiac dysfunctions in β -thalassemia major have traditionally been attributed to iron-overload⁽¹⁹¹⁾ from repeated transfusions and increased intestinal absorption rate⁽¹⁹²⁾ combined with a sustained state of increased cardiac output. It has been reported that the process of iron-related oxidative damage could lead to cardiac hypertrophy, cardiomyocyte degeneration and dysfunction associated with rhythm abnormalities^(23; 189; 191). However, heart remodeling and failure is persistent even with optimal chelation in β -thalassemia major patients⁽¹³¹⁾. Unless heart in β -thalassemia major is highly prone to iron deposits in comparison to other organs, this raises the question on the existence of another etiology for cardiac complications. Furthermore, clinical studies in non-transfused β -thalassemia intermedia patients describe cardiac complications with no evidence of cardiac iron overload^(129; 142). Such clinical observation led us to hypothesize that β -thalassemia major cardiac dysfunction can occur in absence of transfusion related iron-overload and myocardial iron deposition.

Few mouse models of β -thalassemia have been developed and closely reproduced human β -thalassemia major or intermedia diseases^(35; 36; 39; 193). These models were generated to characterize the pathophysiology and to assess cell and gene therapy approaches⁽¹⁹⁴⁾. Among the murine models, only one reproduces β -

thalassemia major ($\text{Hbb}^{\text{d}3(\text{th})/\text{d}3(\text{th})}$), homo- β thal, and is the best-analyzed to date⁽³⁵⁾. The homo- β -thal mice exhibit typical severe β -thalassemia major phenotype with hematologic, histologic and physio-pathologic features including reduced fertility and death at early age^(35;167). However, no study so far in any of these β -thalassemic mouse models has analyzed the functional and structural cardiac physiology.

To gain insights into the progressive cellular and molecular cardiac pathophysiology in β -thalassemia without the confounding effect of therapies, we have undertaken a longitudinal study from a cohort of untransfused homo- β thal mice from 6-months of age till death by non-invasive transthoracic echocardiography. These mice with virtual absence of cardiac iron deposition develop early alteration of left ventricular morphology followed by both diastolic and systolic dysfunction. Our results provide the first evidence that β -thalassemia major can induce iron-independent cardiac anomalies that likely progress to decompensation and lead to heart failure.

4.4 DESIGN AND METHODS

4.4.1 Mouse strains

Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care Committees of the Clinical Research Institute of Montreal and the University of Montreal Hospital Research Center, in accordance to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Homozygous β -thalassemic ($\text{Hbb}^{\text{d}3(\text{th})/\text{d}3(\text{th})}$) donor mice have a deletion of the murine β -globin major gene, in the globin diffuse haplotype, leaving only the β -minor gene intact⁽³⁵⁾. These mice were backcrossed for > 16 generations onto C57BL/6J and are considered on a homogeneous background. Congenic C57BL/6J-Gpi1^a donor and C57BL/6J-Gpi1^b recipient mice can be differentiated with the marker glucose phosphate isomerase isotype (Gpi1) and were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). All mice were maintained in microisolator cages.

4.4.2 Production of bone marrow transplanted mice

Bone marrow transplanted mice were produced as described previously⁽¹⁶⁷⁾. Briefly, bone marrow cells were harvested from either homozygous β -thalassemic (Hbb^{d3(th)/d3(th)}) or wild-type C57BL6/J-Gpi1^a (Hbb^{S/S}) donors. Two month-old C57BL6/J recipients were exposed to a lethal dose of irradiation of 8.75 Gy (Mark I-68A-1 Research Irradiator, San Francisco, CA) and injected with 1.8×10^6 hematopoietic cells from marrow of homozygous β -thalassemic mice (homo- β thal, Hbb^{d3(th)/d3(th)}) or of C57BL/6J-Gpi1^a controls (Hbb^{S/S}). Bone marrow engraftment was evaluated in both mouse groups 2-5 months following transplantation and occasionally within the following year to verify sustained engraftment. Only recipients displaying complete hematopoietic engraftment were included in the study, i.e. recipients with the sole expression of either hemoglobin minor for homo- β thal mice (n=46) or the specific glucose phosphate isomerase isotype marker *Gpi1^a* for controls (n=37).

4.4.3 Echocardiography examinations

Male homo- β thal and control mice were studied at 3 different ages: 6 months (n=23 and 18), 10 months (n=22 and 18) and 14 months (n=19 and 18). Cardiac morphology and function were evaluated *in vivo* by transthoracic echocardiography using a high-resolution ultrasound biomicroscope Vevo 770 (Visualsonics, Toronto, ON, Canada) equipped with a 35 MHz probe. In addition, electrocardiogram (ECG) was monitored in all mice and body temperature maintained at 37 ± 1 °C using a rectal thermometer (THM100, Indus Instruments, Houston, TX, USA). Mean arterial blood pressure (MAP) was measured using a tail-cuff monitoring system (XBP-1000, Kent Scientific, Torrington, CT, USA).

The left ventricle (LV) M-mode tracings were obtained at the level of the papillary muscles using the two-dimensional parasternal long-axis view. The measurement of wall thicknesses and chamber dimensions were averaged over 5 cardiac cycles and done according to the American Society of Echocardiography guidelines⁽¹⁹⁵⁾. End-diastolic (d) and end-systolic (s) left ventricle internal diameters (LVD), interventricular septum (IVS) and posterior wall (PW) thicknesses were measured. LV fractional shortening (FS) was calculated from the LV dimensions

using the equation: FS (%) = [(LVDd – LVDs) / LVDd] × 100. Ejection fraction was calculated as: [(LVEDV – LVESV) / LVEDV] based on LV end-diastole and end-systole volumes (LVEDV and LVESV). These were determined from Teichholtz's formula⁽¹⁹⁶⁾: LV volume = [7/(2.4 + LVD)] × (LVD)³. LV mass was estimated using the following equation⁽¹⁹⁷⁾: LV mass = 1.055 × [(IVSd + LVDd + PWd)³ – (LVDd)³] where 1.055 is a constant related to the specific gravity of the myocardium. Relative wall thickness was assessed as the ratio between wall thickness and LV diameter: [(IVSd + PWd) / LVDd].

Aortic diameter (AoD) dimensions were measured in systole and diastole using M-mode tracings and averaged over 5 cardiac cycles. Doppler velocity waveforms were recorded in the aortic root and the velocity-time integral (VTI) was determined by semiautomatic analysis. VTI was averaged over 5 cardiac cycles. The stroke volume (SV)¹² was then measured as follows⁽¹⁵³⁾: $SV = (AoD / 2)^2 \times \pi \times VTI$. The cardiac output was calculated as the product of SV with the heart rate (HR), where HR was directly obtained by ECG. The cardiac output was calculated as follows⁽¹⁵³⁾: $CO = (AoD / 2)^2 \times \pi \times VTI \times HR$, where HR was the heart rate obtained directly by ECG. The cardiac index (CI) was calculated by normalizing CO for body weight and expressed in milliliters per minute per gram of body weight (mL·min⁻¹·g⁻¹).

Doppler ultrasound recordings were performed in the right common carotid artery 1-2 mm before the carotid bifurcation to measure the peak systolic (S) and the end-diastolic (D) velocities. Pourcelot index (PI), a commonly used parameter reflecting local vascular resistance to blood flow and vascular compliance as previously⁽¹⁶⁷⁾ was computed as $PI = (S - D) / S$, and averaged over 10 cardiac cycles. (See also Supplemental section.)

¹² Veuillez prendre note que la formule employée pour calculer le volume d'éjection systolique pour cet article et celui qui suit (c'est-à-dire, l'article #4, chapitre 5) diffère de celle employée dans l'article #1 (chapitre 2). Ce changement résulte d'une différence méthodologique puisque dans le précédent article, le signal Doppler de l'aorte était enregistré au niveau de l'aorte ascendante à environ 0.5-1.5 mm de la valve aortique, ce qui justifiait l'utilisation d'un facteur de correction (1/2). Par la suite, des développements méthodologiques nous permettaient d'enregistrer ce signal directement au niveau de l'anneau aortique (valve aortique), ce qui est le site à privilégier afin de minimiser la variabilité et les erreurs de mesure. La formule utilisée n'emploie donc pas le facteur de correction (1/2). Par conséquent, les valeurs de débit cardiaque (CO et CI) et de résistance périphérique totale (IPVR) diffèrent entre l'article #1 (chapitre 2) et les articles #3 et #4 (chapitres 4 et 5, respectivement) ce qui rend la comparaison difficile.

4.4.4 Hematological analysis

Blood was obtained by sub-mandibular bleeding before sacrifice of 15 month-old homo- β thal and control mice (n=8 from each group) and collected in tubes containing EDTA (Capiject, Terumo Medical Corp., Elkton, Maryland, USA). Red blood cell and reticulocyte counts, hemoglobin and hematocrit levels, mean cellular volume (MCV) and mean cellular hemoglobin (MCH) were evaluated using a Bayer Advia 120 cell analyzer (Bayer Corp., Tarrytown, NY, USA) with an analysis reporting software version 2.2.06.

4.4.5 Histopathological examinations

15 month-old homo- β thal and control mice were sacrificed for pathologic analyses (n=8 from each group). Several organs including the heart, liver, kidney, spleen and lungs were excised and weighed. Organ-to-body weight ratios were determined. Hearts, lungs, kidneys and spleens (n=5 from each group) were fixed overnight in 10% phosphate-buffered formalin and paraffin embedded. Tissue sections of 5 μ m thickness were stained with hematoxylin and eosin, Prussian blue staining for iron analysis and Sirius red staining for interstitial fibrosis evaluation. Semi-quantitative levels of iron and fibrosis were evaluated from 8-10 photomicrographs per section at magnification 100X taken under a Zeiss Axiophot microscope at same light intensity and exposition settings for each staining. The percentage of iron and collagen contents in each field was evaluated automatically using a computer assisted color threshold analysis using Matlab software (ver. 7, release 14, Natick, MA).

4.4.6 Statistical analyses

Data are reported as means \pm standard errors of the mean (SEM) over n observations, where n represents the number of mice per group. Longitudinal comparisons of cardiovascular parameters were assessed using a two-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. Student's unpaired t -test was used for comparison of LV dimensions, hematological and histopathological parameters. All statistical analyses were performed using Sigma Stat

(Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) with statistical significance considered at $p < 0.05$.

4.5 RESULTS

4.5.1 Homo- β thal mouse model phenotype

Several homo- β thal mice deleted of both β -globin major genes were produced from bone marrow transplantation to obtain cohorts with sufficient animals of same ages and same sex for longitudinal analysis. Complete engraftment of homo- β thal and control bone marrow in transplanted mice was determined from the hematologic glucose phosphate isomerase isotype marker or the sole presence of hemoglobin minor. To verify persistent and stable long-term engraftment, assessments were performed from 4 months of age onwards. Analysis of hematological profile was evaluated in adult mice to assess severity of β -thalassemia. The homo- β thal bone marrow transplanted mice displayed features of β -thalassemia major with severe anemia as evidenced by markedly decreased red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb) and hematocrit (Hct) levels and consequently, exhibit decreased blood viscosity (*Table IV-I*). Additionally, mean cellular volume (MCV) and mean cellular hemoglobin (MCH) were significantly lower in homo- β thal mice (*Table IV-I*), correlating with erythrocyte microcytosis and hypochromia. Severe reticulocytosis suggested increased erythropoiesis in homo- β thal mice in comparison to controls (*Table IV-I*). These hematologic parameters in homo- β thal mice are similar to those in native homo- β thal mice (*Supplementary Table SI*). Consequent to complete engraftment of β -thalassemic hematopoietic stem cells, recipient mice showed significant decrease in lifespan expectancy relative to controls. Indeed, only 39.1% of transplanted homo- β thal mice were alive at 15 months whereas 91.9% of transplanted control mice were thriving at that age. The transplanted homo- β thal mouse models reproduced the typical hematological characteristics of severe β -thalassemia major⁽³⁵⁾ that affected their survival rate as reported in human β -thalassemia major⁽¹¹⁾.

	BMT control (n = 8)	Homo-βthal (n = 8)
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8.2 ± 0.4	$4.8 \pm 0.5^*$
Hb (g/dL)	12.4 ± 0.6	$4.9 \pm 0.5^\dagger$
Hct (%)	40.7 ± 1.4	$19.7 \pm 1.7^\dagger$
MCV (fL)	49.7 ± 1.5	$41.8 \pm 1.1^*$
MCH (pg/RBC)	15.0 ± 0.2	$10.4 \pm 0.2^\dagger$
Retics (%)	6.6 ± 1.1	$31.2 \pm 1.5^\dagger$

Table IV-I: Hematologic parameters in 15-month old mice. Values are means \pm SEM. * $p < 0.01$; $\dagger p < 0.001$ vs. control mice. RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean RBC cellular volume; MCH, mean RBC cellular hemoglobin; Retics, Reticulocytes.

4.5.2 Distinct histopathology in homo- β thal organs

Since β -thalassemia patients have growth impairment, we monitored body weight in homo- β thal mice from 6 months of age (Figure 4.3A). At 6 months, body weight was slightly reduced by $\sim 5\%$ in homo- β thal mice compared to control mice ($p=0.2$). The decrease in body weight of homo- β thal mice dwindled further at 10 and 14 months of age by 10 and 14%, respectively in comparison to age-matched controls. These findings indicate a general physiological impact in homo- β thal mice significantly detectable at 10 months of age onwards.

Table IV-II shows organ-to-body weight ratios in both thalassemic and control groups at ~ 15 months of age. All organ-to-body weight ratios were significantly higher ($p < 0.05$) in the target group and were comparable to those of native homo- β thal mice. As expected, the most notable organ enlargement was the spleen (by ~ 4.8 -fold), a typical characteristic of severe murine β -thalassemia^(15; 198). While lungs- and liver-to-body weight ratios were increased by 1.2- to 1.3-fold, the heart- and kidney-to-body weight ratios were markedly increased by 1.6- to 1.7-fold in homo- β thal mice ($p < 0.001$) (*Table IV-II* and data not shown).

A

Organ-to-body weight ratio (mg/g)					
	<i>n</i>	Heart	Spleen	Lungs	Kidney
Control	8	5.5 ± 0.3	2.5 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.6 ± 0.3
Homo-βthal	8	8.8 ± 0.5‡	12.1 ± 1.1‡	8.3 ± 0.7*	11.7 ± 1.5†

B

Organ	Iron deposits (%)			Collagen content (%)		
	Control (n = 5)	Homo-βthal (n = 5)	Hbb ^{th-1/th-1} (n = 3)	Control (n = 5)	Homo-βthal (n = 5)	Hbb ^{th-1/th-1} (n = 3)
Heart	0.25 ± 0.19	0.12 ± 0.03	0.21 ± 0.11	4.0 ± 0.3	6.9 ± 0.3‡	8.0 ± 2.2
Spleen	3.60 ± 1.46	17.68 ± 4.14*	10.11 ± 1.92	3.6 ± 0.6	7.0 ± 1.2*	9.0 ± 2.0
Lungs	0.20 ± 0.05	0.81 ± 0.22*	0.66 ± 0.12	5.4 ± 0.6	4.4 ± 1.0	4.2 ± 0.2
Kidney	0.54 ± 0.50	4.47 ± 1.46*	3.8 ± 1.4	8.0 ± 1.3	7.4 ± 1.1	9.4 ± 0.6

Table IV-II: (A) Organ-to-body weight ratios in 15 month-old control and homo-βthal mice (B) Semiquantification of iron deposits and collagen content in 15 month-old control, homo-βthal and Hbb^{th-1/th-1} mice. Values are means ± SEM. * $p < 0.05$; † $p < 0.01$; ‡ $p < 0.001$ vs. control mice.

Histopathological semi-quantitative analysis of heart, spleen, lungs and kidney were performed including specific Prussian blue for iron staining and Sirius red for interstitial fibrosis (*Table IV-II*). Presence of abundant iron in the spleen is a typical feature of severe β-thalassemia^(38; 198; 199) secondary to reticuloendothelial RBC destruction and extramedullary hematopoiesis (Figure 4.1D). Accordingly, important splenic collagen deposition was measured in homo-βthal mice, 1.9-fold above those of controls. In the lungs of homo-βthal mice, a significant 4.1-fold increase of iron deposits was calculated throughout the tissue in comparison to virtual absence in controls ($p < 0.05$). However, no increase in interstitial fibrosis was detected in the lungs of homo-β-thal mice. Similarly to the lungs, the kidneys of homo-βthal mice expressed no interstitial fibrosis but had high levels of iron deposits that were mainly localized to the cortical region (Figure 4.1B). The presence of iron in proximal tubular

cells may be indicative of free hemoglobin renal reabsorption due to chronic hemolysis. As illustrated in Figure 4.2A and B, homo- β thal mice exhibited marked cardiac hypertrophy. This enlargement was associated with a 1.7 fold increase in interstitial collagen deposition diffusely distributed throughout the myocardium when compared to controls ($p < 0.001$, Figure 4.2C and D). These cardiac structural changes and pathological remodeling in homo- β thal mice were not associated with infiltration of immune cells or inflammation. In addition, iron deposits in the hearts of homo- β thal mice were extremely sparse in contrast to all other organs. When detected, these deposits in homo- β thal hearts were located mainly in focal region of the outer layer of the myocardium or epicardium (Figure 4.2E and F), were non-significant ($p > 0.05$) and were comparable to those of wildtype C57Bl6/J mice of same genetic background ($0.12 \pm 0.11\%$; $n=9$), indicative that cardiac hypertrophy is not directly linked to iron deposits.

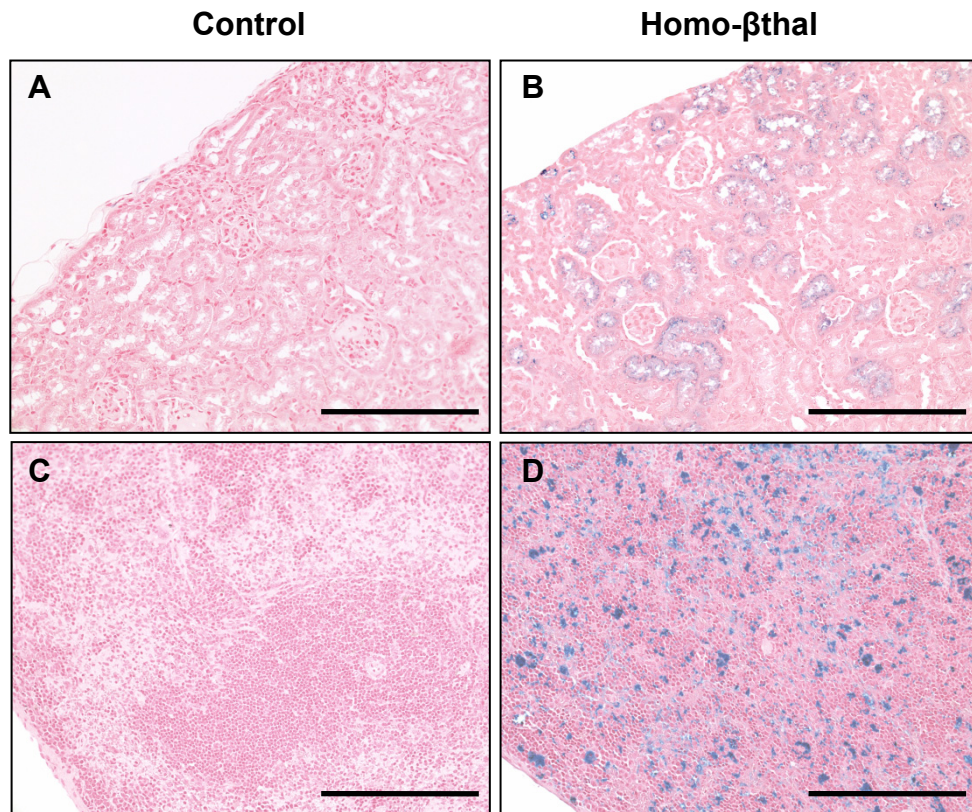


Figure 4.1: Histopathologic analysis of iron deposition in kidney (A) and spleen (B) tissue sections of control and homo- β thal mice stained with Prussian blue and a nuclear fast red counterstain. Iron deposits were found in the spleen and in renal proximal tubule cells of homo- β thal mice. (Magnification $\times 20$; bars, 200 μm)

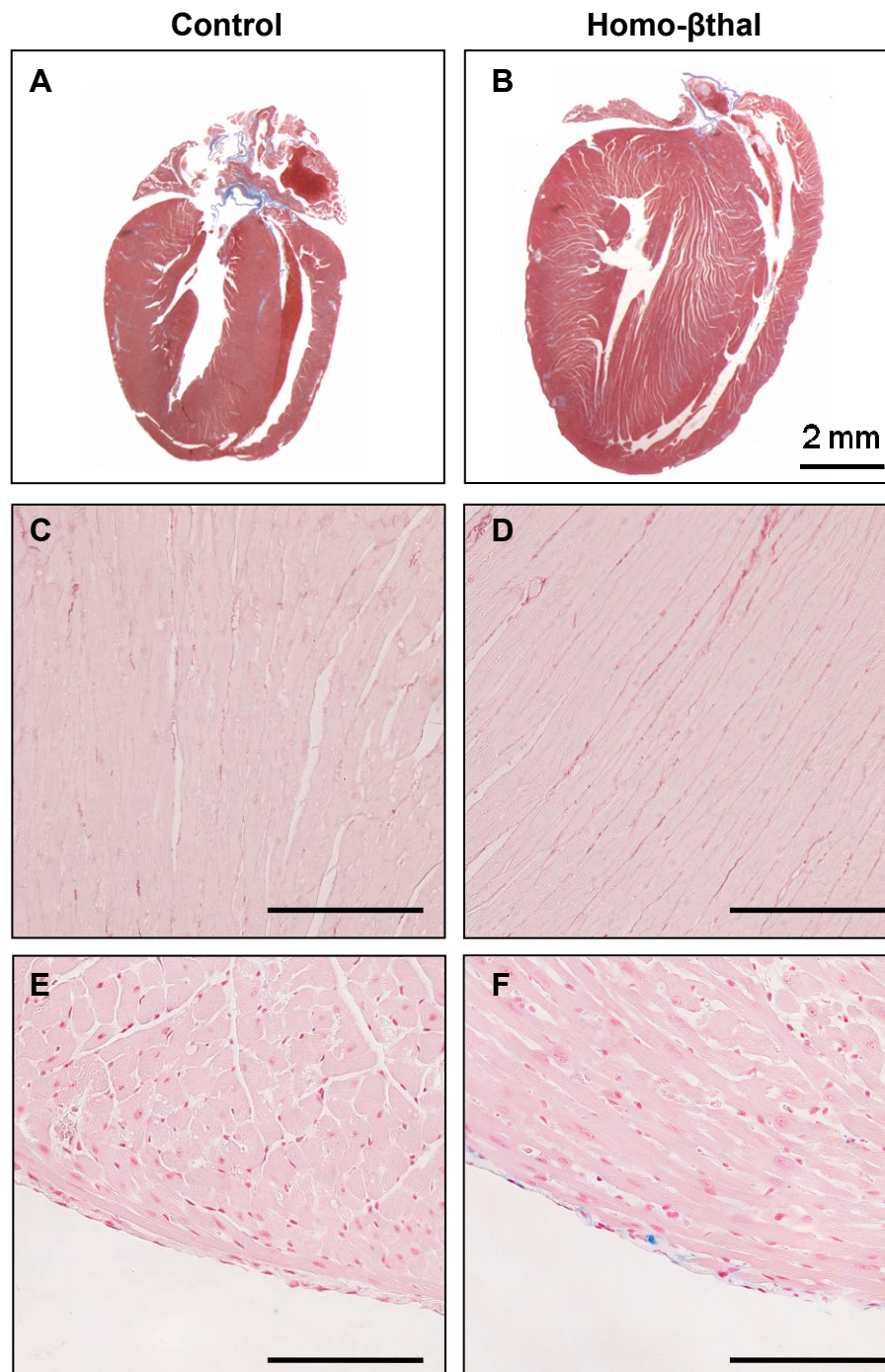
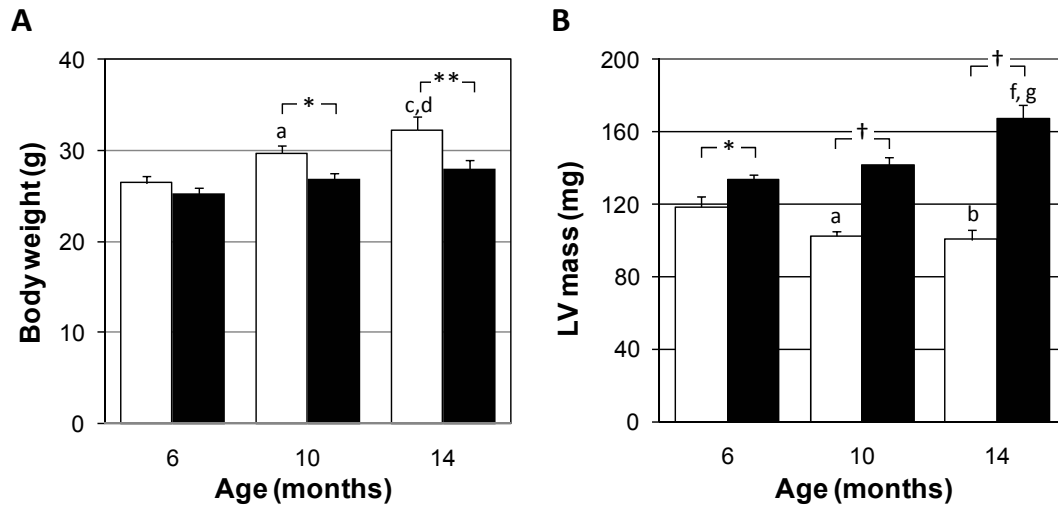


Figure 4.2: Histological analysis of control (A, C, E) and homo- β thal mouse hearts (B, D, F). Representative sections were stained hematoxylin-eosin for macroscopic morphological phenotype (A, B), Sirius red for collagen evaluation (C, D) and with Prussian blue with counterstaining of nuclear fast red for iron analysis (E, F). (Magnification $\times 40$; Bars, 100 μm).

4.5.3 Early onset of left ventricle structural alterations in homo- β thal mice

In addition to the molecular cardiac changes observed in homo- β thal mice by histopathological analysis, we investigated cardiac morphology and function by echocardiography. Since complete engraftment was observed at 5 months, our longitudinal echocardiography analyses were initiated from 6 months of age. Left ventricle (LV) mass estimation and dimension measurements were assessed by M-mode tracings (Figure 4.3B, C and Supplemental Figure S1). At 6 months, homo- β thal mice revealed a mild LV mass increase of 13% in comparison to controls ($p < 0.05$), indicating early development of LV hypertrophy. Despite no body weight increase in homo- β thal mice, LV mass was significantly and progressively increased in 10 and 14 month-old mice by 38% and 67%, respectively (Figure 4.3B). This LV mass increase was similar to the 56% increase at 14-month old native homo- β thal mice (n=3). Control mice displayed similar LV mass at 10 and 14 months with a slight (~13%) decrease compared to 6 months. Consistent with the LV mass increase in homo- β thal mice, detailed echocardiographic measurements showed an important and significant increase of LV diameters in both systole and diastole at all age groups (Figure 4.3C and Supplemental Figure S1). In addition, interventricular septum and posterior wall thicknesses tended to increase in homo- β thal mice at 10 and 14 months of age, further supporting age-dependent progression of LV hypertrophy. To evaluate the geometric pattern of LV chamber dilation and wall thickening, we calculated relative wall thickness with respect to LV cavity diameter. Compared to controls, the relative wall thickness was decreased in homo- β thal mice at all ages (~12 to ~9%), thereby characterizing the LV remodeling pattern as an eccentric hypertrophy.



	6 months		10 months		14 months	
	Control	Homo-βthal	Control	Homo-βthal	Control	Homo-βthal
LVDd mm	3.67 ± 0.09	4.04 ± 0.05**	3.43 ± 0.07	3.95 ± 0.07 [†]	3.27 ± 0.10 ^b	4.19 ± 0.09 [†]
LVDs mm	2.59 ± 0.09	2.99 ± 0.06**	2.31 ± 0.10	2.71 ± 0.09**	2.09 ± 0.11 ^c	3.00 ± 0.50 [†]
IVS mm	1.18 ± 0.04	1.18 ± 0.03	1.16 ± 0.03	1.26 ± 0.02*	1.18 ± 0.04	1.26 ± 0.03
PW mm	0.94 ± 0.03	0.87 ± 0.02	0.93 ± 0.03	1.00 ± 0.03 ^d	0.98 ± 0.03	1.04 ± 0.04 ^e

Figure 4.3: Longitudinal measurements in control (open bars) and homo-βthal mice (filled bars). Body weight (A) and echocardiographic evaluation of LV mass (B), and detailed echocardiographic measurements (C) at ages 6, 10 and 14 months in homo-βthal (n=23, 22, 19) and control (n=18) mice. Values are means ± SEM. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$ vs. 6 month-old mice in the control group; ^d $p < 0.05$ vs. 10 month-old mice in the control group; ^e $p < 0.01$ and ^f $p < 0.001$ vs. 6 month-old mice in the homo-βthal group; ^g $p < 0.01$ vs. 10 month-old mice in the homo-βthal group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and [†] $p < 0.001$ vs. same age control mice.

4.5.4 Progressive cardiovascular impairment in homo- β thal mice

To investigate whether the cardiac hypertrophic alterations in homo- β thal mice were associated with functional impairment, we evaluated cardiac output normalized to body weight (CI) and LV contractile function. The longitudinal CI analysis of control mice highlighted a mild but non-significant decrease. In contrast, cardiac indices (CI) in homo- β thal mice were significantly increased by 16% ($p < 0.05$), 35% ($p < 0.001$) and 39% ($p < 0.001$) at 6, 10 and 14 months, respectively, when compared with age-matched controls (Figure 4.4A).

Cardiac function was evaluated by EF and FS calculations (Figure 4.4C and D). EF was decreased in all age groups of homo- β thal mice and declined further with age up to 20% loss relative to controls. FS seemed unaffected in 6 month-old homo- β thal mice, but was considerably decreased by 10 months of age compared with age-matched controls. The decrease in EF and FS was comparable to that of native homo- β thal mice ($n=3$) at 12 and 14% respectively. These results indicated the development of a progressive left ventricle contractile dysfunction in homo- β thal mice without evidence of hemosiderosis.

As shown in Figure 4.4B, MAP was slightly lower ($p < 0.05$) in 6 month-old homo- β thal mice when compared with age-matched controls. At all other ages no difference in MAP was observed. In addition, local common carotid vascular hemodynamics was monitored to have insight into vascular compliance and resistance to blood flow by using the Pourcelot resistive index (PI). As shown in Figure 4.4E, homo- β thal mice displayed significantly higher PI at 10 ($p < 0.01$) and 14 ($p < 0.05$) months compared to age-matched controls, suggesting impaired carotid vascular hemodynamics.

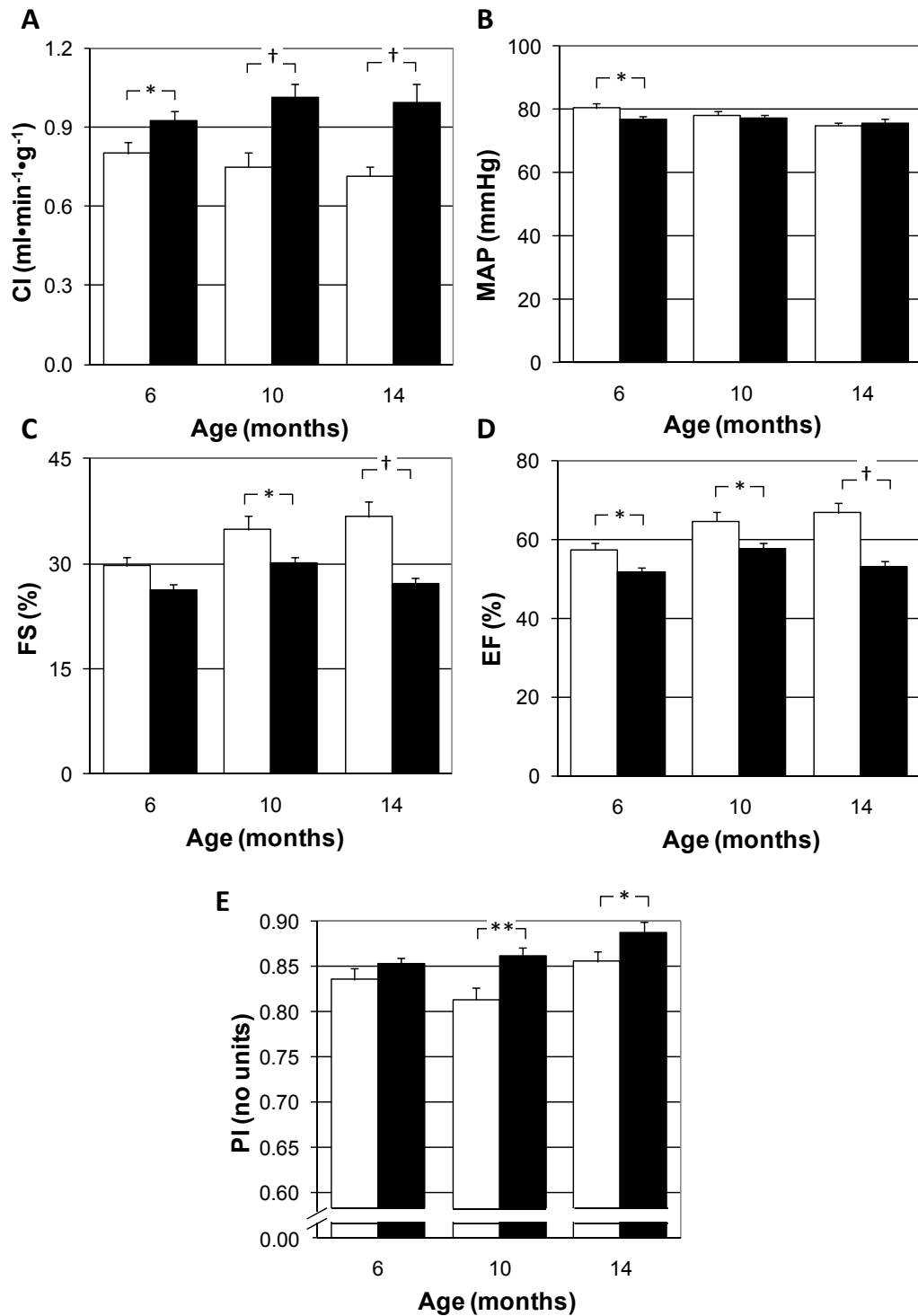


Figure 4.4: Longitudinal measurements of cardiac index (CI) (A), tail-cuff evaluated mean arterial pressure (MAP) (B), left ventricle fractional shortening (FS) (C), left ventricle ejection fraction (EF) (D) and Doppler Pourcelot indices (PI, no units) in the common carotid artery (E) in 6, 10 and 14 month-old control (open bars) and homo- β thal mice (filled bars). Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and $\dagger p < 0.001$ vs. same age control mice.

4.6 DISCUSSION

Our longitudinal and systematic study of thalassemia heart pathophysiology provides evidence of novel determinants for progression of cardiac structure remodeling and dysfunction leading to insufficiency. Herein, we demonstrate for the first time that untreated β -thalassemia major mice display severe cardiac complications. In addition to compensated left ventricular dilation and hypertrophy, our thalassemic homo- β thal mouse model develops sequentially progressive impairment of systolic contractile function with decreased LV fractional shortenings. Importantly, this process occurred independently of myocardial iron loading. Since our homo- β thal mouse dissociated the thalassemic cardiopathy from presence of myocardial iron, these findings argue for the existence of distinct mechanism(s) that are major contributors to thalassemic cardiac pathogenesis.

Characterization of the primary events occurring in β -thalassemia major cardiac pathogenesis from our mouse model revealed early onset of morphologic adverse changes. In response to reduced oxygen-carrying potential of β -thalassemic erythrocytes and tissue hypoxia in engrafted homo- β thal mice, a compensatory mechanism is induced by increasing the cardiac index or output. This normal hemodynamic adaptation mechanism results from elevated cardiac preload and venous return and decreased afterload via reduced blood viscosity and blood pressure as detected in homo- β thal mice early on^(110; 137; 200). Within 4 months of exposure to progressive anemia, the homo- β thal mice developed a rapidly enhanced LV mass and decreased body weight comparable to that of the 12-weeks anemia-induced iron deficiency in rat⁽¹⁰⁹⁾. In parallel, a gradual increase in LV diameter at diastole and systole in homo- β thal mice showed early dilatation consistent with a sustained anemic state^(95; 97; 104; 107). These morphologic alterations lead in the initial phase to a typical eccentric LV pattern of hypertrophy in the homo- β thal mice. A primary event in homo- β thal mice is early cardiac morphologic remodeling presumably as a compensatory mechanism for the anemia and/or ischemia. This physiologic mechanism should lead to the apparent correction of the hypoxic state by stationary increased cardiac index.

In contrast to findings in chronic anemia states^(107; 201; 202), the cardiac index in homo- β thal mice rose further and reached a maximum at 10 months of age. Moreover, a persistent increase in LV mass and diameter demonstrate LV remodeling throughout life with progressive deterioration of the homo- β thal cardiac geometry/structure. From 10 months of age, the homo- β thal mice displayed a combined pattern of eccentric LV hypertrophy and of wall thickening. Such cardiac hypertrophy transitioned to cardiac dysfunction in homo- β thal mice, with gradual alteration and decline of LV function. The mild decrease in cardiac function, as defined by fractional shortening and ejection fraction, at 6 months with no major impact in hemodynamic function indicated that LV hypertrophy in homo- β thal mice preceded cardiovascular functional alterations. Notably by 10 months of age and onwards, significant degeneration of cardiac function suggested that additional or secondary factors or events are triggered at later stage. An important contributor to the thalassemic pathophysiology of cardiac dysfunction is likely the impaired circulatory flow hemodynamics as indicated by the mild but significant increase in Pourcelot carotid index despite decreased blood viscosity. This process is likely to arise from vascular endothelial dysfunction and structural wall remodeling (Stoyanova et al in preparation). In addition, increased ventricular stress caused by cardiac dilatation from anemia-induced conditions similar to homo- β thal mice was associated with myocyte hypertrophy and hyperplasia⁽¹⁰⁴⁾. Long-term exposure to ventricular stress is likely to exert adverse cellular and molecular effect as evidenced by presence of substantial fibrosis deposits in the myocardium of homo- β thal. Consequently, this interstitial fibrosis is expected to impact on ventricular contractility and cause myocardial stiffness⁽²⁰³⁾. Importantly, our characterization of homo- β thal mice showed severe myocardial dysfunction despite virtual absence of cardiac iron.

In the chronically transfused human β -thalassemia major, iron is considered the main factor responsible for cardiac failure^(189; 191) while our study uncovered the existence of distinct mechanism(s) critical in β -thalassemia cardiac dysfunction independently from myocardial iron loading. Previous reports on thalassemic patients have attributed cardiac mortality to important iron accumulation, from chronic blood transfusions and increased gastrointestinal absorption rate, whereas lifespan improved significantly upon optimal iron-chelation therapy^(23; 204). Presently, cardiac dysfunction

detected in chelated patients has been assumed to result from low therapy compliance⁽²⁰⁵⁾ and/or from differential heart and liver iron-loading kinetics^(141; 206). Indeed, the standard assessment of iron or ferritin levels in serum of patients do not adequately reflect differential iron storage levels in different organs and are limited by low reproducibility⁽²⁰⁷⁾. More recently, nuclear magnetic resonance relaxometry was shown to be highly sensitive to the presence of iron in tissues⁽²⁰⁸⁻²¹⁰⁾ and was validated in heart by comparison to biopsy with 80% reliability⁽²¹¹⁾. The T2* approach is now favored to evaluate chelator efficacy in patients⁽³⁰⁾. While only direct tissue biopsy can quantify iron rigorously, it is invasive, heterogeneous and impractical for follow-up of chronic thalassemic conditions. Analogous to the human pattern of iron organ distribution, homo- β thal mice had excess iron in vital organs such as spleen, lungs and kidney, probably originating from increased gastrointestinal absorption⁽¹⁹²⁾. Of importance, iron in the heart of homo- β thal mice was almost absent. This finding shows that development of LV hypertrophy and the later onset of LV dysfunction in homo- β thal mice occurs independently of myocardial iron deposition. This murine thalassemic iron-independent LV dysfunction is consistent with the cardiac dysfunction reported in untransfused thalassemia intermedia⁽¹²⁹⁾ and in occasional thalassemic major transfused patients without cardiac siderosis⁽¹³¹⁾. Hence, a different mechanism is most likely responsible for the cardiac dysfunction in these non-transfused homo- β thal mice. Our results show that additional critical determinant(s) are at the basis of the thalassemic cardiac pathophysiology and argue that iron is a contributor and likely a precipitating factor in human cardiac dysfunction.

An important finding from this longitudinal analysis is the unraveling of a novel pathophysiologic mechanism independent of direct myocardial iron deposition that leads to cardiac complications in β -thalassemia major and possibly, in β -thalassemia intermedia. Our results show that the thalassemic heart primarily adapts by increasing cardiac output state as in all anemias. The chronic anemic state of thalassemia induced rapidly a secondary response of morphologic alterations including LV dilation and hypertrophy. In thalassemia however, the cardiac function progressively deteriorates to LV decompensation, dysfunction and eventually heart failure. This process can result from the contribution of several potential factors successively or cooperatively: 1. the compensated LV structural remodeling itself, 2.

loss of contractile reserve due to myocardial stiffness, 3. cardiac hypoperfusion leading to oxidative stress^(212; 213), 4. chronic systemic inflammatory state due to ineffective erythropoiesis as well as RBC hemolysis and iron^(123; 127; 214; 215), 5. vascular endothelial dysfunction and vasculopathy as described in SCD another hemolytic condition^(169; 216; 217). Most importantly, studies should be directed at identification of the molecular pathophysiologic determinants of thalassemic cardiac pathogenesis. While major efforts for optimization of chelation therapy are essential for β -thalassemia, our data predict premature cardiac morbidity and mortality in thalassemic patients despite strict lifelong optimal chelation therapy.

In summary, our study on β -thalassemic mouse models is the first to show a cardiopathological mechanism independent of iron overload. These findings are likely to revolutionize our cardiac β -thalassemia biomedical basic concepts and influence clinical practice. Our β -thalassemia model also provides a mean to investigate the molecular determinants responsible for pathophysiologic structural and functional cardiac anomalies and for assessment of innovative therapeutic interventions that could be pertinent for RBC disorders at large and even other cardiopathologies.

4.7 ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the National Institute of Health to M. T. and G. C. and the Canadian Blood Services (CBS)/Canadian Institute for Health Research (CIHR) to M. T.. H.F. is a recipient from the Programme canadien des bourses de la francophonie (PCBF) studentship and W. L. is a recipient from CBS/CIHR fellowship award. We thank Noumeira Hamoud for assistance.

4.8 SUPPLEMENTAL RESULTS

	C57Bl/6J (n = 5)	Hbb ^{th-1/th-1} (n = 5)
RBC (10 ⁶ /μL)	10.6 ± 0.2	8.2 ± 0.2†
Hb (g/dL)	16.0 ± 0.3	8.6 ± 0.2†
Hct (%)	52.4 ± 1.0	31.9 ± 0.8†
MCV (fL)	49.3 ± 0.3	37.7 ± 1.4†
MCH (pg/RBC)	15.0 ± 0.1	10.6 ± 0.1†
Retics (%)	3.2 ± 0.1	28.1 ± 1.0†

Tableau IV-III, Supplementary Table S1: Hematologic parameters in C57Bl/6J and Hbb^{th-1/th-1} mice. Values are means ± SEM. † $p < 0.001$ vs. control mice. RBC, red blood cell count; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean RBC cellular volume; MCH, mean RBC cellular hemoglobin; Retics, Reticulocytes.

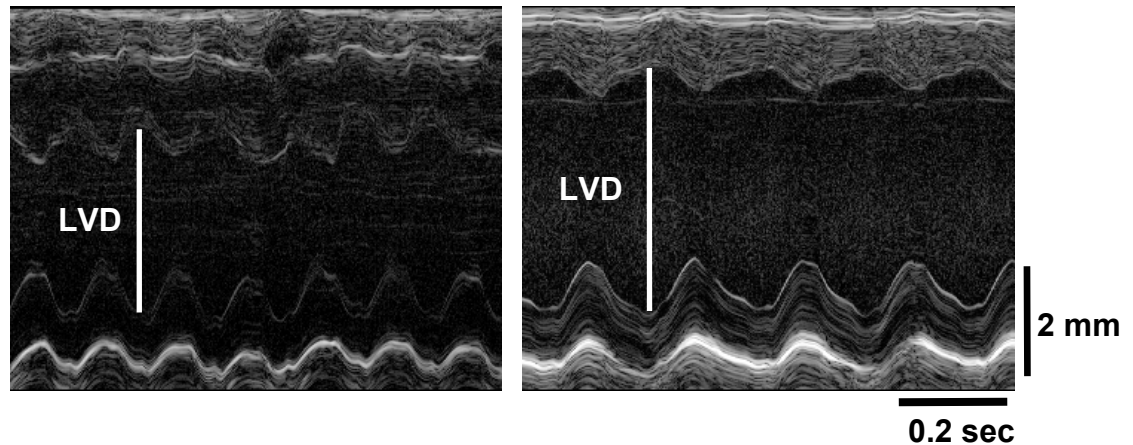


Figure 4.5: Supplementary Figure S1: Representative transthoracic M-mode tracings of the left ventricle in 14 month-old BMT control (left) and homo-βthal (right) mice. LVD is the left ventricular diameter in diastole (white line).

Total peripheral vascular resistance (TPVR)

Total peripheral vascular resistance (TPVR) was calculated as:
 $TPVR = MAP / CO$.

The increase in cardiac index versus time reported in homo- β thal mice (Section 4.5.4) might result from changes in loading conditions such as increased preload, secondary to elevated venous return, and decreased afterload, due to lower peripheral vascular resistance. The TPVR was significantly smaller in homo- β thal mice at all ages when compared with age-matched controls (Figure 4.6), thus confirming decreased afterload which possibly results from anemia related reduced blood viscosity.

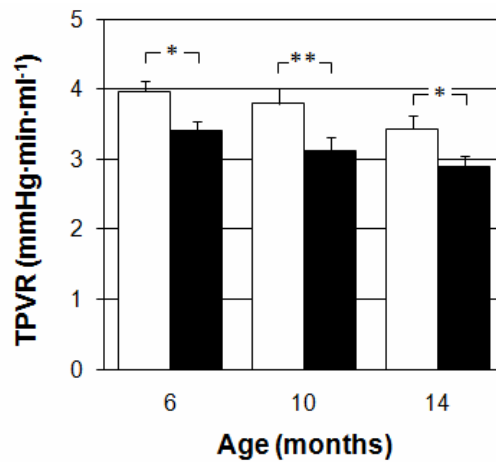


Figure 4.6: Longitudinal measurements of total peripheral vascular resistance (TPVR) in 6, 10 and 14 month-old BMT control (open bars) and homo- β thal mice (filled bars). Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. same age BMT control mice.

CHAPITRE 5: ARTICLE 4

Irradiation-induced long-term cardiovascular complications in mice: insights on hematopoietic transplantation

5.1 AVANT-PROPOS

L'irradiation corporelle totale ou partielle est principalement employée pour le pré-conditionnement médullaire requis lors de la transplantation de moelle osseuse. La greffe de CSH représente une stratégie thérapeutique importante pour le traitement de nombreuses maladies génétiques et hématopoïétiques telles que l'anémie falciforme et la β -thalassémie. De plus, cette stratégie est également employée pour le développement de divers modèles de souris, dont notamment les hémoglobinopathies. Tel que décrit précédemment, les souris β -thalassémiques présentant un phénotype sévère similaire à la β -thalassémie majeure humaine montrent une importante difficulté de reproduction et un taux élevé de mortalité fœtale. Ainsi, nous avons employé, dans le cadre des expérimentations décrites précédemment, un modèle de souris généré par greffe de CSH provenant de souris $Hbb^{th-1/th-1}$. L'objectif du quatrième article présenté dans ce chapitre, visant à être soumis au journal *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, était d'évaluer les conséquences cardiovasculaires causées par l'irradiation corporelle totale combinée à la greffe de CSH. Les résultats de cet article montrent que l'irradiation corporelle totale entraîne d'importantes modifications structurelles et fonctionnelles cardiovasculaires caractérisées par une atrophie cardiaque tardive ainsi que par une diminution du débit cardiaque, une augmentation de la résistance vasculaire à l'écoulement sanguin et un délai dans la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium. La compréhension des mécanismes de dommages cardiovasculaires radio-induits pourrait permettre d'améliorer les traitements cliniques de pré-conditionnement requis pour la greffe médullaire. De plus, l'identification de ces mécanismes favoriserait également l'élaboration de stratégies visant à limiter la toxicité de la radiothérapie.

Ayant effectué l'ensemble des expérimentations à l'exception du protocole de transplantation de CSH, ma contribution à cet article a été majeure. Dr Hady Felfly et Dre Wafaa Lemsaddek ont généré les souris transplantées, Dr Damien Garcia a participé à l'analyse des résultats de mécanique vasculaire, alors que Dre Marie Trudel et Dr Guy Cloutier ont contribué à la révision et la correction du manuscrit.

Nous aimerions également remercier le Dr Eric Thorin d'avoir proposé l'approfondissement de la réflexion sur les conséquences cardiovasculaires de l'irradiation corporelle totale.

Cardiovascular effects of total body irradiation preconditioning regimen for bone marrow transplantation in C57BL/6J mice

Ekatherina Stoyanova^{1,2}, Hady Felfly², Wafaa Lemsaddek², Damien Garcia¹, Guy Cloutier¹, Marie Trudel²

¹Laboratory of Biorheology and Medical Ultrasonics, University of Montreal Hospital Research Center (CRCHUM), Montreal, Quebec, Canada,

²Molecular Genetics and Development, Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

5.2 ABSTRACT

Objective: Bone marrow (BM) transplantation is an important therapeutic strategy for a wide range of diseases and remains the only potential cure of hematologic disorders such as aplastic anemia, β -thalassemia major and sickle cell anemia. Moreover, BM transplantation is also used for the development of murine models of various conditions, including hemoglobinopathies. However, BM transplantation generally requires a myelosuppressive regimen of chemotherapy and/or irradiation. The purpose of this study was to evaluate long-term cardiovascular effects of total body irradiation combined with BM rescue transplantation in C57Bl/6J mice. **Methods and Results:** Two month-old C57Bl/6J mice were lethally irradiated and transplanted with hematopoietic stem cells (HSC) of congenic littermates. Cardiovascular modifications were assessed in 6-, 10- and 14-month-old mice. Cardiac morphology and function, and vascular hemodynamics were determined by transthoracic echocardiography. Left ventricle (LV) mass and diameters were significantly smaller in 10 and 14 month-old irradiated mice when compared to age-matched non-irradiated controls. In these same age groups, irradiated mice exhibited a decreased cardiac output (CO) state despite increased

heart rates and left ventricular contractility. Total peripheral vascular resistance was increased in irradiated mice of all ages. *Ex vivo* evaluation of mesenteric arteriolar vasomotor function showed delayed responses to endothelium-dependent agonist acetylcholine (ACh) with preserved maximal relaxation combined with increased smooth muscle cell reactivity to direct nitric oxide (NO) stimulation. Pre-incubation of irradiated mouse arterioles with NO synthase inhibitor *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) failed to inhibit ACh-induced vasodilation to the same extent as in non-irradiated arterioles, indicating that ACh response was not entirely mediated by the NO pathway. Carotid morphology and mechanical properties were similar in both mouse groups. **Conclusions:** Total body irradiation induces important cardiovascular alterations characterized by late cardiac atrophy and decreased CO state, increased vascular resistance to blood flow and decreased sensitivity to endothelium-dependent vasodilator stimulation. These findings must be considered when elaborating BM transplantation therapeutic strategies and interpreting cardiovascular parameters in BM transplanted mouse models.

5.3 INTRODUCTION

Total body irradiation (TBI) remains an important part of the myelosuppressive pre-conditioning regimen required for bone marrow (BM) transplantation since it creates space for donor hematopoietic stem cells (HSCs) or, in the case of allogeneic BM transplantation, provides host immunosuppression for donor BM engraftment⁽²¹⁸⁾. Since the advent of radiotherapy for the treatment of several cancers, such as breast cancer and Hodgkin's lymphoma, clinical and experimental studies have demonstrated that irradiation causes immediate and delayed injury to several organs including gastrointestinal, vascular, pulmonary and cardiac tissues⁽²¹⁹⁾. The heart is considered as one of the most radiosensitive and dose-limiting organs⁽²²⁰⁾. Radiation potentially causes direct damage to all structures of the heart resulting in a broad spectrum of early and late clinical features such as pericarditis, cardiomyopathy with pericardial and myocardial fibrosis, conduction abnormalities, valvular changes, and vascular alterations including coronary artery disease and accelerated atherosclerosis⁽²²¹⁾. Although most clinical studies evaluated radiation-induced cardiotoxicity in patients exposed to high therapeutic chest radiation ≥ 30

Gy⁽²²⁰⁾, investigations of Japanese atomic bomb survivors exposed to low radiation also report significantly increased risk of cardiovascular disease, more than 10 years after irradiation, at doses well below 10 Gy⁽²²²⁾.

Most studies investigating long-term radiation damage to normal tissues have focused on results from controlled-dose local radiotherapy, uncontrolled accidental radiation exposure (atomic-bomb and nuclear accident survivors) or controlled-dose TBI pre-conditioning for BM transplantation therapy for a pre-existing disease, which might additionally contribute to tissue lesions. However, relatively few studies have evaluated long-term effects of a pre-determined TBI dose on healthy tissues without the confounding bias of pre-existing conditions. To address this issue, we have investigated specifically long-term cardiac and vascular effects of TBI and BM rescue transplantation in wild-type C57BL/6J mice.

5.4 METHODS

5.4.1 Mouse strains

Experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care Committees of the Clinical Research Institute of Montreal and the University of Montreal Hospital Research Center, and were conducted in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Congenic C57BL/6J donor, recipient and nontransplanted mice were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). All mice were maintained in microisolator cages.

5.4.2 Production of irradiated mice

Femoral BM cells were harvested from wild-type C57BL/6J-*Gpi1*^a donors. Two month-old C57BL/6J-*Gpi1*^b recipients were exposed to a lethal dose of irradiation of 8.75Gy (Mark I-68A-1 Research Irradiator, San Francisco, CA) and injected with 1.8×10^6 BM-derived HSCs for BM rescue. Following transplantation, mice were maintained in microisolator cages and allowed to recover for 4 months, in a pathogen-free facility, before further investigations. The specific glucose phosphate isomerase isotype (*Gpi1*) marker was used to confirm total HSC engraftment, by electrophoresis.

5.4.3 Non invasive echocardiography examinations of cardiac morphology and function

Irradiated mice and age-matched C57 controls were studied at 3 different ages: 6 months (n=18 and n=24, respectively), 10 months (n=18 and 19) and 14 months (n=18 and 19). Transthoracic echocardiography measurements were performed using a high-resolution ultrasound biomicroscope Vevo 770 (Visualsonics, Toronto, ON, Canada) equipped with a 35 MHz central frequency probe having a focal length of 10 mm. Mice were weighed and anesthetized with an intraperitoneal injection of 0.0125 mL/g of Avertin 2.5% (2,2,2-tribromoethanol). Body hair of the thoracic region was removed using a commercial depilatory cream (Nair, Church & Dwight Co., Princeton, NJ, USA). Mice were laid in the supine position on a warming platform under a heating lamp and legs were taped on ECG electrodes. The body temperature was monitored using a rectal thermometer (THM100, Indus Instruments, Houston, TX, USA) and maintained at 37 ± 1 °C. Mean arterial blood pressure (MAP) was estimated using a tail-cuff monitoring system (XBP-1000, Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Prewarmed ultrasound gel (Aquasonic 100, Parker Laboratories, Orange, NJ, USA) was applied on the chest region to provide an acoustic coupling medium for the probe.

5.4.3.1 Cardiac structural and functional M-mode measurements

The left ventricle (LV) was imaged in B-mode parasternal long-axis view. The M-mode sampling line was positioned, perpendicular to the ascending aorta, at the aortic root and time-varying tracings of the aortic diameter (AoD) were recorded. AoD was measured in systole and diastole and averaged over 5 cardiac cycles. Then, the M-mode sampling line was positioned at the level of the papillary muscles and M-mode tracings were recorded for the measurement of wall thicknesses and chamber dimensions. All measures were done according to the American Society of Echocardiography guidelines⁽¹⁹⁵⁾ and averaged over 5 cardiac cycles. End-diastolic (LVDd) and end-systolic (LVDs) left ventricle internal diameters, and interventricular septum (IVS) and posterior wall (PW) thicknesses were measured. LV fractional shortening (FS), a measure of LV systolic function, was calculated from the LV dimensions using the equation:

$$FS (\%) = [(LVDd - LVDs) / LVDd] \times 100$$

LV mass was estimated using the following equation⁽¹⁹⁷⁾:

$$LV \text{ mass} = 1.055 \times [(IVSd + LVDd + PWd)^3 - (LVDd)^3]$$

where 1.055 is a constant related to the specific gravity of the myocardium, IVSd is the diastolic interventricular septal thickness, and PWd is the diastolic posterior wall thickness. LV dimensions and mass were normalized for body weight and expressed as millimeters per gram (mm g^{-1}) and milligram per gram (mg g^{-1}), respectively.

5.4.3.2 Doppler measurements of cardiac output and vascular hemodynamics

The heart was imaged in parasternal long-axis view and the probe was oriented to obtain an angle below 60° between the ascending aorta and the ultrasound beam. Doppler velocity waveforms were recorded in the aortic root by positioning the sample volume at the same location where the M-mode tracings of the AoD were obtained. The velocity-time integral (VTI) was determined by semiautomatic tracings of the envelope of the Doppler velocity waveforms. VTI was averaged over 5 cardiac cycles. The stroke volume (SV) was then measured as follows⁽¹⁵³⁾:

$$SV = (AoD / 2)^2 \times \pi \times VTI$$

The cardiac output (CO) was calculated as the product of SV with the heart rate (HR), where HR was directly obtained by ECG. The cardiac index (CI) was calculated by normalizing CO for body weight and expressed in milliliters per minute per gram of body weight ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$). Total peripheral vascular resistance (TPVR) was calculated as: $TPVR = MAP / CO$.

Because no differences were expected between the left and right sides, only the right common carotid artery was imaged longitudinally in B-mode and the Doppler sample volume was positioned 1–2 mm before the carotid bifurcation to record the time-varying velocity waveforms for 2 s. Measurements of the peak systolic velocity (S) and of the end-diastolic velocity (D) were made using the Vevo 770 analysis software (ver. 2.3.0, Visualsonics, Toronto, Canada). The Pourcelot index (PI), a commonly used parameter reflecting local vascular resistance to blood flow

and vascular compliance⁽¹⁶⁷⁾, was calculated using $PI = (S - D) / S$, and averaged over 10 cardiac cycles.

5.4.4 *Ex vivo* vascular function studies of resistance arterioles

14-month old mice were euthanized by CO₂ inhalation. The entire intestine was quickly dissected from the mouse and placed in ice cold physiological saline solution (PSS). Second-order branches of mesenteric arterioles (~150-250 μm in diameter) from 10 irradiated mice and 8 age-matched controls were carefully dissected from all adherent connective tissue and bathed in a 5 mL organ chamber containing PSS of the following composition (in mmol/L): 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.18 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 0.026 EDTA and 5.5 glucose, maintained at pH 7.4, warmed to 37°C and continuously bubbled with 12% O₂, 5% CO₂, and 83% N₂. Each arterial segment was mounted and secured on two glass microcannulas using nylon ties, in a video-monitored pressure arteriograph system (Living Systems, Burlington, VT). The distal cannula was occluded to prevent flow, after residual blood was gently washed out of the vessel lumen. The proximal cannula was connected to a pressure transducer to maintain a constant intraluminal pressure using a servo-control unit and a peristaltic pump. The arteriograph system was placed on the stage of an inverted microscope equipped with a video camera to monitor and measure the lumen diameter. The distance between cannulas was carefully adjusted to obtain a horizontal vessel alignment without further stretch. Experimental measures were started 1h after equilibration at 45 mmHg intraluminal pressure. Between each protocol described next, the system was washed out with PSS, reequilibrated for 30 min and the resting lumen diameter was measured. The vascular contractile reactivity was evaluated by dose-response curves to norepinephrine (NE, Sigma, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ mol/L). Endothelium-dependent and independent relaxations to cumulative concentrations of acetylcholine (ACh, Sigma, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ mol/L) and sodium nitroprusside (SNP, Sigma, 10⁻⁹ to 10⁻³ mol/L), respectively, were assessed by measuring dilatory responses in vessels pre-contracted with a sub-maximal concentration of NE (the concentration that produced 75 to 80% of maximal contraction, i.e. EC₇₅-EC₈₀). To study the contribution of NO to the ACh-induced relaxations, concentration-response measurements were repeated after a 30 min pre-

incubation with *N* ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, Sigma, 10^{-4} mol/L). The relaxation was determined as a percentage of increase in lumen diameter from the resting diameter. The concentration of drug inducing a half-maximal response, or EC₅₀, was determined for ACh and SNP dose-response curves by non-linear regression.

5.4.5 *Ex vivo* mechanical studies of carotid arteries

Left common carotid arteries were quickly dissected from 14-month old euthanized mice and placed in ice cold physiological saline solution (PSS). Carotid arteries of 13 irradiated and 9 age-matched control mice were mounted onto the pressure arteriograph filled with a warmed and continuously bubbled Ca²⁺-free PSS containing 10 mmol/L EGTA. After equilibration for 45 min at 45 mmHg, the intraluminal pressure was raised 3 times from 3 mmHg to 140 mmHg allowing to unbuckle and adjust vessels to their *in vivo* length by displacing cannulas. Vascular mechanics were evaluated by increasing intraluminal pressure from 3 to 180 mmHg by steps of 10 mmHg (except for the first step which was from 3 to 10 mmHg). For each pressure step, lumen diameter and wall thickness were measured by microscopy at 3 different positions along the vessel.

Carotid vascular wall cross-sectional area (CSA) was calculated at 80mmHg: $(\pi/4) \times (D_e^2 - D_i^2)$, where D_e and D_i represent external and intraluminal diameters, respectively. Circumferential strain (ϵ) was determined as $(D_i - D_{i(0)}) / D_{i(0)}$, where $D_{i(0)}$ is the lumen diameter at 3 mmHg. Circumferential stress (σ) was given by $\sigma = (P \times D_i) / (2W)$, where P is the intraluminal pressure in dynes/cm², and W the wall thickness. An exponential fitting regression was performed on the stress-strain relationship of each vessel with the following equation: $\sigma = \sigma_0 e^{\beta \epsilon}$, where the amplitude σ_0 stands for the stress at the diameter $D_{i(0)}$ and the exponent β is the rate of increase of the stress-strain curve. This exponential model was used to reduce the tangential elastic modulus ET to $d\sigma/d\epsilon = \beta\sigma$. Therefore, β also represents the slope of ET-to-stress relationship and thus reflects non-linear elastic properties of vascular wall components. An increase in β indicates increased local stiffness. The incremental distensibility, expressed as the fractional change in lumen diameter ($\Delta D_i / D_{i(0)}$) per

change in intraluminal pressure (ΔP), was calculated as: $100 \times \Delta D_i / (D_{i(0)} \times \Delta P)$. Distensibility reflects global vascular mechanical properties.

5.4.6 Hematological analysis

Blood was obtained by sub-mandibular vein bleeding before sacrifice of 15 month-old non-irradiated and irradiated mice (n=8 per group) and collected in tubes containing EDTA (Capiject, Terumo Medical Corp., Elkton, Maryland, USA). Red blood cell and reticulocyte counts, hemoglobin and hematocrit levels, mean cellular volume (MCV) and mean cellular hemoglobin (MCH) were evaluated using a Bayer Advia 120 cell analyzer (Bayer; Bayer Corp., Tarrytown, NY, USA) with an analysis reporting software version 2.2.06 (IRCM, Montreal, Canada).

5.4.7 Histopathological examinations

15 month-old irradiated mice and age-matched controls were sacrificed for pathologic analysis (n=9 for each group). Several organs including heart, liver, kidneys, spleen and lungs were excised and weighed. Organ-to-body weight ratios were calculated. Hearts, lungs, kidneys and spleens (n=5 for each group) were fixed overnight in 10% phosphate-buffered formalin and paraffin embedded. Tissue sections of 5 μm thickness were stained with hematoxylin and eosin, Prussian blue staining for iron analysis and Sirius red staining for interstitial fibrosis evaluation. For Prussian blue and Sirius red stainings, photographs were taken under standard light microscopy at the same light intensity and exposition settings, for each staining, in at least 8 fields at a magnification of 100 \times . The percentage of iron and collagen contents in each field were evaluated automatically using a computer assisted color threshold analysis.

At the end of vascular mechanical study experiments, common carotid arteries from control and irradiated mice (n=8 for each group) were fixed overnight in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin and cut serially in 5 μm cross-sections. Tissue sections were stained with Sirius red for collagen or Verhoeff van Gieson for elastin. For all sections of a specific staining, images were taken at the same light intensity and exposure time settings (polarized light for Sirius red and transmitted light for Verhoeff's van Gieson). CSA of the media (MCSA) and relative

surface of medial elastin and collagen were measured in post-processing (Matlab software, ver. 7, release 14, Natick, MA). For each staining, 6 sections per vessel were analyzed.

5.4.8 Statistical analysis

Data were averaged and reported as means \pm standard error of the mean (SEM) over n observations, where n represents the number of mice per group. Longitudinal comparisons of cardiovascular parameters were assessed using a two-way ANOVA. Analysis of dose-response curves and mechanical parameters were carried out by use of two-way ANOVA for repeated measures. The concentration of ACh and SNP (expressed as $-\log [M]$) required to produce EC_{50} was determined by computer-assisted nonlinear regression analysis (Prism Software, GraphPad, San Diego, USA). Comparisons in LV dimensions were made inside an individual age group using Student's unpaired t -tests. The latter statistical test was also used for the comparison of hematological and histopathological parameters. All statistical analyses were performed using Sigma Stat (ver. 3.1, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) with statistical significance considered at $p < 0.05$.

5.5 RESULTS

5.5.1 Generation of irradiated mice

To investigate the late effects of TBI on cardiovascular physiology, C57BL/6J mice underwent a lethal dose of 8.75 Gy of irradiation followed by bone marrow-derived HSC transplantation for hematopoietic rescue. Four months following irradiation and transplantation, at the age of 6 months, complete engraftment was evaluated by electrophoresis. Irradiated mice displayed a highly significant decrease in body weight when compared to age-matched non-irradiated controls (Fig. 5.1A). Subsequently, irradiated mice presented a progressive body weight gain, reaching a significant weight increase at 14 months when compared to non-irradiated age-matched controls. Considering these differences, body weight measures were taken into account for the interpretation of cardiac structural and functional alterations in irradiated mice.

Basic hematological profile was evaluated in 15-month-old sub-groups of irradiated mice and their non-irradiated littermates. Although mean cellular volume (MCV) and mean cellular hemoglobin (MCH) were similar in both mouse groups, irradiated mice demonstrated a slight anemia with decreased red blood cell count (RBC), hemoglobin (Hb) and hematocrit levels (Hct) (*Table V-I*). A 2-fold increase in reticulocyte count ($p < 0.01$) was indicative of an up-regulation of the erythropoietic rate⁽²²³⁾. These results might be indicative of perturbation of HSC survival or their marrow niches.

	Non-irradiated ($n = 8$)	Irradiated ($n = 8$)
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9.5 ± 0.2	$8.2 \pm 0.4^*$
Hb (g/dL)	14.7 ± 0.3	$12.4 \pm 0.6^\dagger$
Hct (%)	45.9 ± 0.5	$40.7 \pm 1.4^\dagger$
MCV (fL)	48.3 ± 1.0	49.7 ± 1.5
MCH (pg/RBC)	15.4 ± 0.1	15.0 ± 0.2
Retics (%)	3.1 ± 0.2	$6.6 \pm 1.1^\dagger$

Table V-I: Hematologic parameters in 15-month old non-irradiated and irradiated mice. Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$; $^\dagger p < 0.01$ vs. non-irradiated mice. RBC, red blood cells; Hb, hemoglobin; Hct, hematocrit; MCV, mean cellular volume; MCH, mean cellular hemoglobin; Retics, Reticulocytes.

5.5.2 Echocardiographic assessment of cardiac structure and function

6, 10 and 14 month-old non-irradiated and irradiated mice underwent echocardiography examinations to assess left ventricle (LV) structure and function. LV dimension measurements and LV mass estimation revealed important LV morphology differences between non-irradiated and irradiated mice. LV mass was initially decreased by 14% in irradiated mice at 6 months when compared to age-matched controls (Fig. 5.1B). Despite gradual body weight gains in irradiated mice, LV mass was further decreased in 10 month-old mice of this group ($p < 0.05$ vs. 6 month-old irradiated mice) and remained stable at 14 months. Normalization for BW indicated that initial LV mass decrease at 6 months was possibly attributable to BW decrease; however, further LV mass differences were independent of BW.

Accordingly, echocardiographic dimension measurements of systolic and diastolic LV diameters as well as LV wall thickness showed significant reduction in 10 and 14 month-old irradiated mice (Supplemental *Table V-IV*; Section 5.7), indicating the delayed development of atrophic LV remodeling following TBI. These findings additionally point out the irreversibility of radiation-related cardiac tissue lesions.

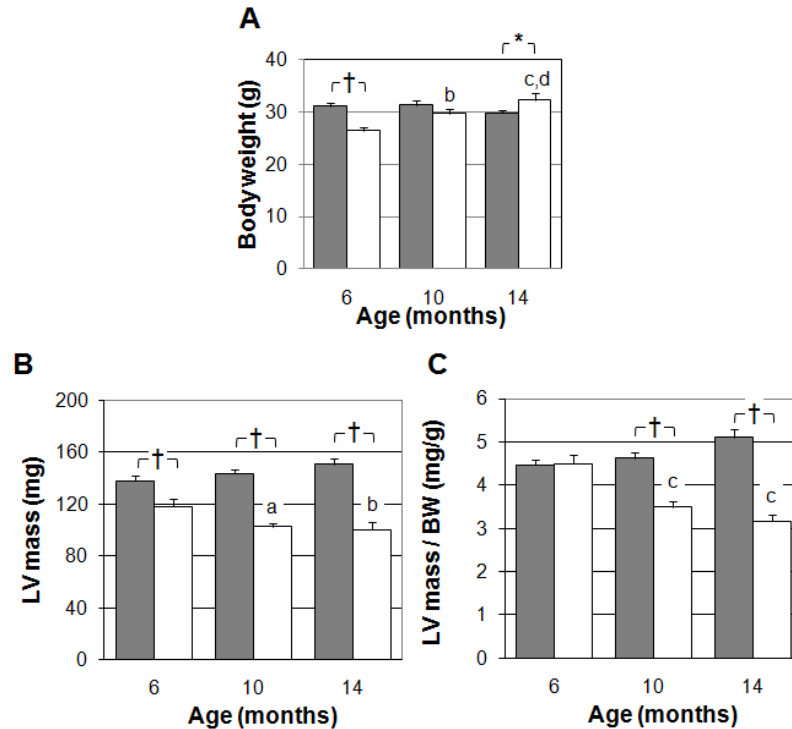


Figure 5.1: Longitudinal measurements of body weight (A), and echocardiographic evaluation of left ventricle (LV) mass (B) and LV mass normalized to BW (C) in non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice. Values are means \pm SEM. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$ vs. 6 month-old mice in the irradiated group; ^d $p < 0.05$ vs. 10 month-old mice in the irradiated group. ^{*} $p < 0.05$ and [†] $p < 0.001$ vs. same age non-irradiated mice.

FS calculations were performed for the evaluation of myocardial contractile function. This parameter showed a progressive increase in LV contractility of irradiated mice reaching a significant difference at 14 months when compared to age-matched controls (Fig. 5.2A). The heart rates were faster in irradiated mice at all ages when compared to their non-irradiated littermates (Fig. 5.2B). These results may reveal a potential compensation for the decrease in LV volumes secondary to cardiac atrophy. Despite these positive inotropic and chronotropic changes, the cardiac output normalized to body weight was 22% and 40% lower in 10 and 14 month-old

irradiated mice, respectively, when compared to age-matched controls (Fig. 5.2C). Within non-irradiated control mice, CI was significantly increased by 25% and 32% at 14 months when compared with results at 10 and 6 months, respectively. Our findings of decreased cardiac index in irradiated mice might be secondary to changes in loading conditions such as a decreased preload possibly resulting from the reduction of LV volumes, as well as an increased afterload due to changes in peripheral vascular resistance.

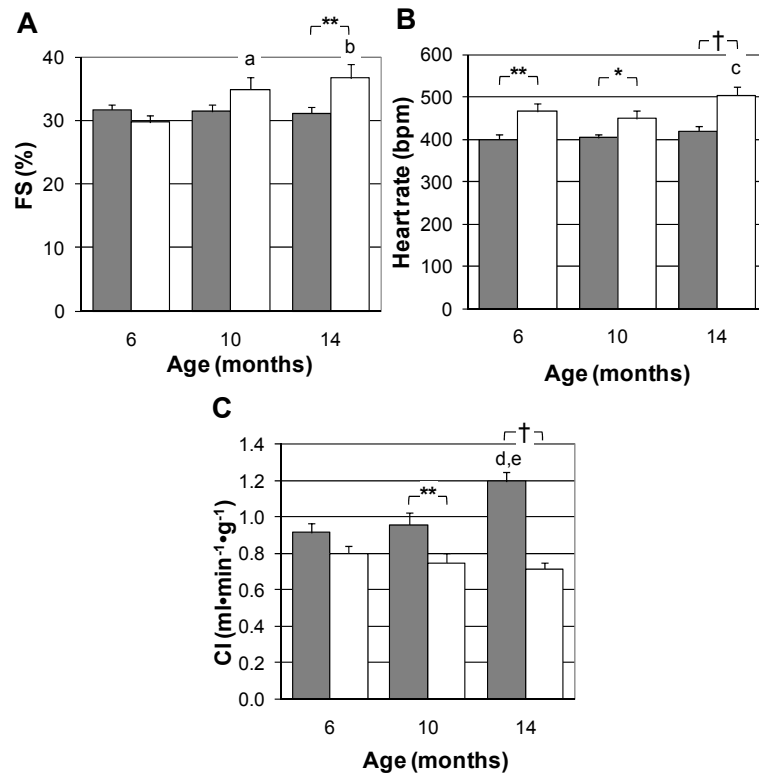


Figure 5.2: Longitudinal measurements of cardiac function in non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice. Fractional shortening (FS) (A), heart rate (HR) (B) and cardiac index (CI) (C) at ages 6, 10 and 14 months. Values are means \pm SEM. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ vs. 6 month-old mice in the irradiated group; ^c $p < 0.05$ vs. 10 month-old mice in the irradiated group; ^d $p < 0.001$ vs. 6-month old mice in the non-irradiated group; ^e $p < 0.01$ vs. 10 month-old mice in the non-irradiated group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and [†] $p < 0.001$ vs. same age in the non-irradiated mice.

5.5.3 Echographic assessment of vascular hemodynamics

While MAP remained similar for irradiated and non-irradiated mice at all ages (Fig. 5.3A), total peripheral vascular resistance (TPVR) was significantly increased by 34%, 50% and 52% in 6, 10 and 14 month-old irradiated mice, respectively, when

compared to age-matched non-irradiated controls (Fig. 5.3B). This finding indicates possible changes in afterload conditions which might contribute to decreases in CI. Note that non-irradiated mice displayed an age related TPVR decrease that became significant at 14 months when compared to same group 6 month-old mice. Local common carotid artery hemodynamics were assessed by Pourcelot index (PI) measurements (Fig. 5.3C). An age related PI increase was noticeable in 14 month-old irradiated mice ($p < 0.05$ vs. 10 month-old irradiated mice); this difference was also significant when compared to age-matched non-irradiated controls ($p < 0.01$). These results suggest that irradiation preconditioning regimen and BM transplantation initiate a global increase in vascular resistance and late impairment of carotid artery vascular hemodynamics.

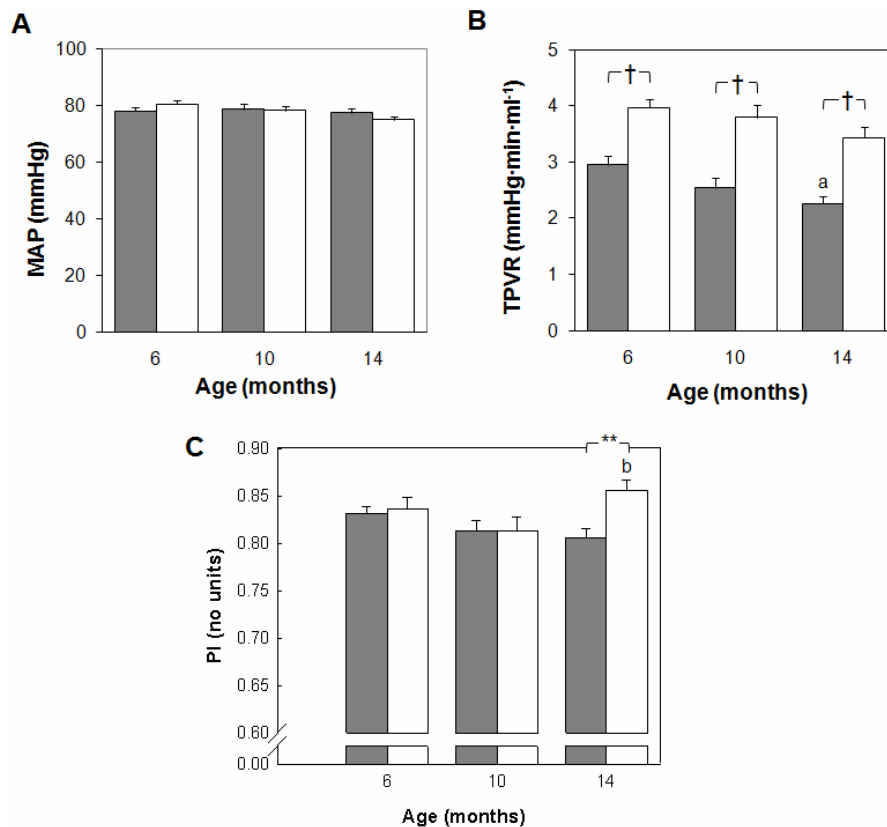


Figure 5.3: Longitudinal hemodynamic measurements of tail-cuff evaluated mean arterial pressure (MAP) (A) and echocardiographic assessment of total peripheral vascular resistance (TPVR) (B) and Doppler Pourcelot index (PI, no units) in 6, 10 and 14 month-old non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice. Values are means \pm SEM. ^a $p < 0.01$ vs. 6-month old mice in the non-irradiated group; ^b $p < 0.05$ vs. 10-month old mice in the irradiated group. ^{**} $p < 0.01$ and [†] $p < 0.001$ vs. same age non-irradiated mice.

5.5.4 Histopathology analysis

Organ weights were studied in subgroups of 15 month old mice, to investigate the possibility of atrophic changes in other tissues. In addition to a significant reduction in heart-to-body weight ratios (~17%), organ-to-body weight ratios of liver and kidneys were also decreased in the irradiated mouse group, compared with their controls. Spleen and lung weights were similar in both mouse groups. In addition to supporting echocardiographic findings of atrophic cardiac remodeling in irradiated mice, these results indicate variable radiation sensitivity in organs, as shown by differences in the onset of atrophic changes.

	Non-irradiated (<i>n</i> = 9)	Irradiated (<i>n</i> = 9)
Body weight (g)	32.2 ± 0.5	29.5 ± 1.4
<i>Organ-to-body weight ratio</i>		
Heart (mg/g)	6.2 ± 0.2	5.2 ± 0.3*
Spleen (mg/g)	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.2
Lungs (mg/g)	5.8 ± 0.2	5.7 ± 0.4
Liver (mg/g)	52.3 ± 1.2	46.2 ± 1.7†
Kidney (mg/g)	7.4 ± 0.2	6.4 ± 0.2†

Table V-II: Body weight and organ weights in 15 month-old non-irradiated and irradiated mice. Values are means ± SEM. **p* < 0.05; †*p* < 0.01; ‡*p* < 0.001 vs. non-irradiated mice.

While no atrophic changes were noted in the lungs of irradiated mice, histological analysis of Sirius red-stained organ sections revealed the presence of interstitial fibrosis indicating ongoing tissue remodeling. In fact, collagen content in the lungs and kidneys of irradiated mice (Fig 5.4), were increased by 2- and 2.4-fold, respectively, when compared to non-irradiated controls (*Table V-III*). No differences in collagen deposition were found in the heart and spleen of irradiated mice, indicating differences in radiation-induced organ remodeling processes.

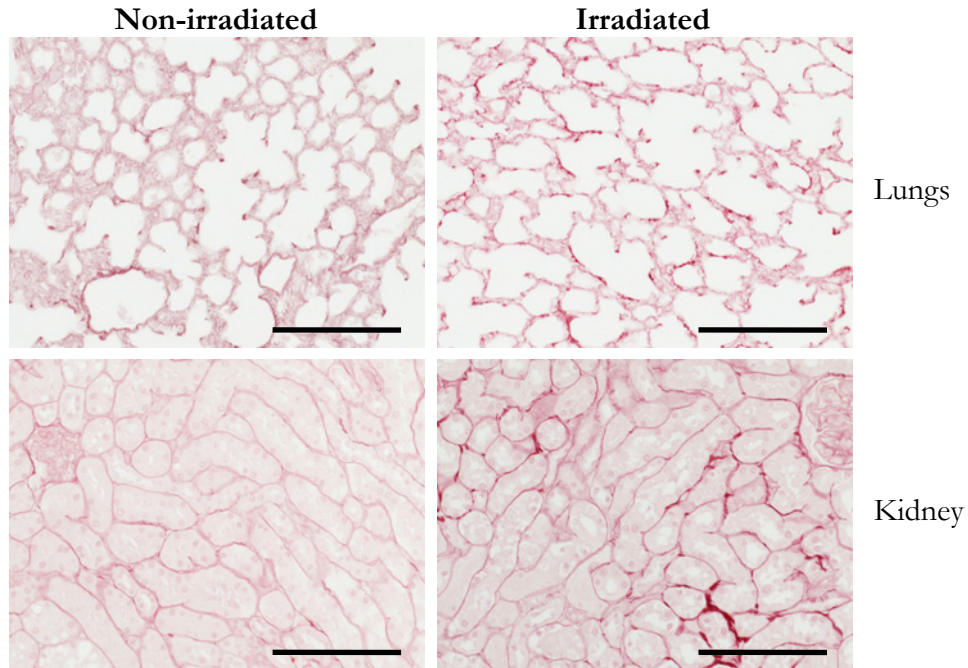


Figure 5.4: Histological analysis of non-irradiated and irradiated mouse. Representative sections of lungs (upper panel) and kidney (lower panel) stained with Sirius red for collagen under transmitted light (magnification $\times 40$; Bars, 100 μm).

TBI is used as preparative regimen for BM transplantation and the investigation of hemoglobinopathies such as sickle cell anemia and β -thalassemia. Iron deposition in several organs, such as the liver and spleen, is a typical feature of these inherited hemolytic anemias^(198; 224). We therefore evaluated, by Prussian blue staining, whether BM transplantation and irradiation were associated with abnormal iron deposits. Interestingly, a significant increase in iron deposits was found in the lungs of irradiated mice ($p < 0.01$). This finding might be secondary to acute and long-term iron loading events that have been reported following HSC transplantation⁽²²⁵⁾.

	Iron deposits (%)		Collagen content (%)	
	Non-irradiated (n = 5)	Irradiated (n = 5)	Non-irradiated (n = 5)	Irradiated (n = 5)
Heart	0.07 ± 0.02	0.25 ± 0.19	3.4 ± 0.8	4.0 ± 0.3
Spleen	3.91 ± 1.16	3.60 ± 1.46	3.3 ± 0.5	3.6 ± 0.6
Lungs	0.04 ± 0.01	0.20 ± 0.05 [†]	2.7 ± 0.6	5.4 ± 0.6*
Kidney	0.04 ± 0.01	0.54 ± 0.50	3.4 ± 0.6	8.0 ± 1.3*

Table V-III: Histopathologic assessment in 15 month-old non-irradiated and irradiated mice. Values are means ± SEM. * $p < 0.05$; [†] $p < 0.01$ vs. non-irradiated mice.

5.5.5 Vascular function studies in mesenteric resistance arterioles

To evaluate late effects of irradiation on vascular function, we studied vasomotor reactivity in isolated segments of mesenteric resistance arterioles from 14 month-old irradiated (n=10) and control (n=8) mice. NE initiated overall similar vascular constrictive responses in both control and irradiated resistance arterioles (Fig. 5.5). An important finding was a rightward shift of the ACh dose-response relationship without an alteration of the maximal vasodilatory response in irradiated mice arterioles when compared to those obtained from non-irradiated controls (with EC_{50} , expressed as $-\log[M]$, of 6.9 ± 0.1 and 6.5 ± 0.1 , respectively; $p < 0.01$) (Fig. 5.6A). In contrast, while maximal relaxation to SNP was also similar between mouse groups, dose-response curve to SNP in irradiated mice was shifted to the left when compared to controls (with EC_{50} of 5.5 ± 0.1 and 6.4 ± 0.2 , respectively; $p < 0.001$) (Fig. 5.6C), indicating increased smooth muscle cell sensitivity to NO-mediated, endothelium-independent, vasodilators. Additionally, pre-incubation with L-NAME, a NO synthase inhibitor, failed to inhibit in irradiated arterioles ACh-mediated vasodilatory response to the same extent as in non-irradiated arterioles (Fig. 5.6B). These results indicate that vasodilatory response to ACh was not entirely mediated by NO in irradiated mice. Therefore, these studies suggest that irradiation induced modifications in vascular reactivity responses, as shown by decreased sensitivity in endothelium-dependent vasodilation, combined with increased smooth muscle cell reactivity to direct NO stimulation.

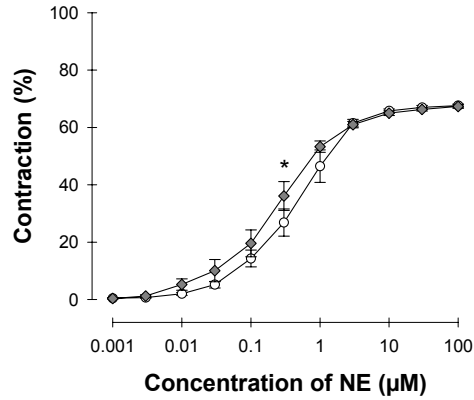


Figure 5.5: Vasoconstrictive response of mesenteric resistance arterioles to norepinephrine (NE) in 14-month old non-irradiated (\blacklozenge ; $n = 8$) and irradiated (\circ ; $n = 10$) mice. Contraction was expressed as percentage change in lumen diameter compared with baseline. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$

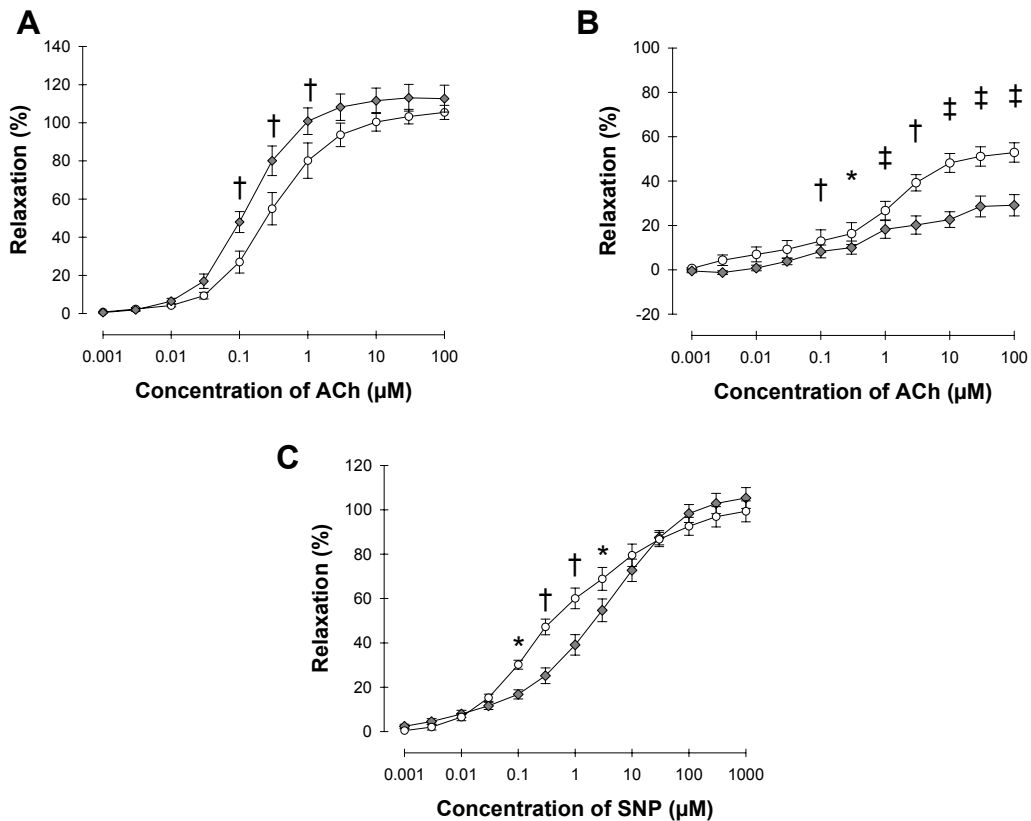


Figure 5.6: Vasodilatory responses of mesenteric resistance arterioles to acetylcholine (ACh) in the absence (A) or presence of L-NAME (B), or to sodium nitroprusside (SNP) (C) in non-irradiated (\blacklozenge ; $n = 8$) and irradiated (\circ ; $n = 10$) mice. Relaxation in norepinephrine contracted arterioles is expressed as a percentage change in lumen diameter compared with baseline. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$; † $p < 0.05$; ‡ $p < 0.001$

5.5.6 Carotid artery structure and mechanical properties

Vascular morphology and mechanical properties were evaluated in carotid arteries of irradiated (n=13) and control (n=9) mice, by correlating stepwise increases in intraluminal pressure to passive changes in vascular diameters and wall dimensions. Luminal diameters at resting pressure (3 mmHg) and at pressures above 50 mmHg were increased in carotid arteries of irradiated mice (Fig. 5.7A). External carotid artery diameter was only decreased at pressures between 80-140 mmHg (Fig. 5.7B), reflecting significant changes in carotid wall thickness as shown by decreased wall CSA at 80 mmHg ($p < 0.001$; Fig. 5.7B, insert). While circumferential strain-to-intraluminal pressure relations in carotid arteries from both groups were similar (Fig. 5.7C), circumferential stress-to-strain curve was slightly but non-significantly shifted leftward in carotid arteries from irradiated mice compared to those from non-irradiated controls (Fig. 5.7E). This finding is related to significantly higher circumferential wall stress values in irradiated compared to non-irradiated control carotid arteries at intraluminal pressures above 80 mmHg (Fig. 5.7D). However, mean values of β , the slope of the tangential elastic modulus-to-stress relation, were not significantly different between non-irradiated and irradiated mice (3.20 ± 0.14 versus 3.43 ± 0.05 with $p=0.08$). Combined with similar wall distensibility results in carotid arteries from both mouse groups, these findings indicate that carotid artery stiffness was not changed in irradiated mice.

Histological analysis of carotid artery sections confirmed *ex vivo* structural and mechanical study results. In fact, total carotid wall CSA was significantly decreased in irradiated mice when compared to non-irradiated controls ($p < 0.05$, Fig. 5.8E). Sirius red and Verhoeff van Gieson stainings did not reveal any changes in relative collagen or elastin surfaces in the carotid wall media (Fig. 5.7A-D), and collagen-to-elastin ratios remained similar in carotid arteries of both mouse groups (Fig. 5.8F).

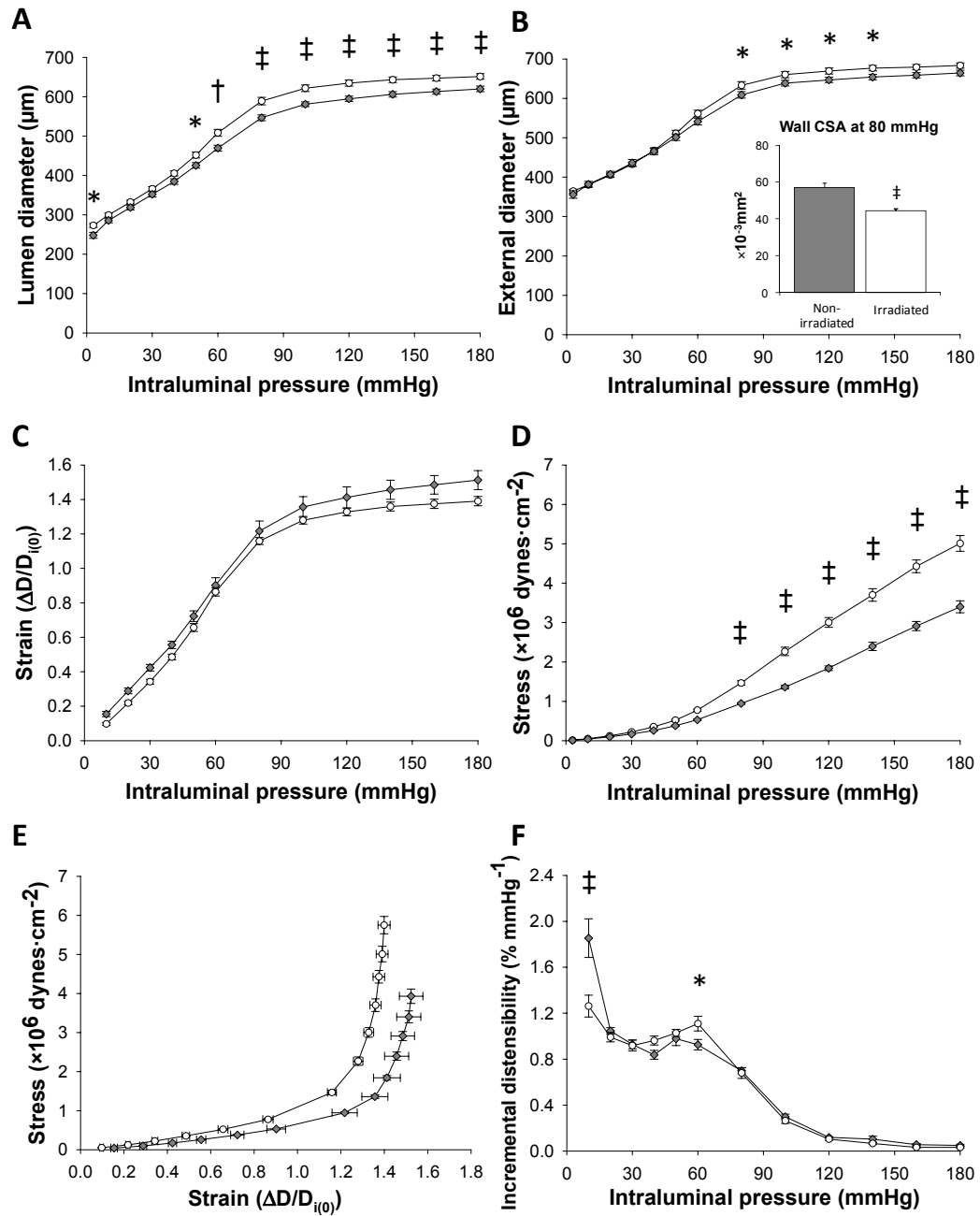


Figure 5.7: Intraluminal diameter (A), external diameter (B), circumferential strain-intraluminal pressure (C) circumferential stress-intraluminal pressure (D) stress-strain (E) and incremental distensibility-intraluminal pressure curves in non-irradiated (\blacklozenge ; $n = 9$) and irradiated (\circ ; $n = 13$) mice. Wall cross-sectional area (CSA) at 80 mmHg is presented as an insert to external diameter. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; † $p < 0.05$; ‡ $p < 0.001$

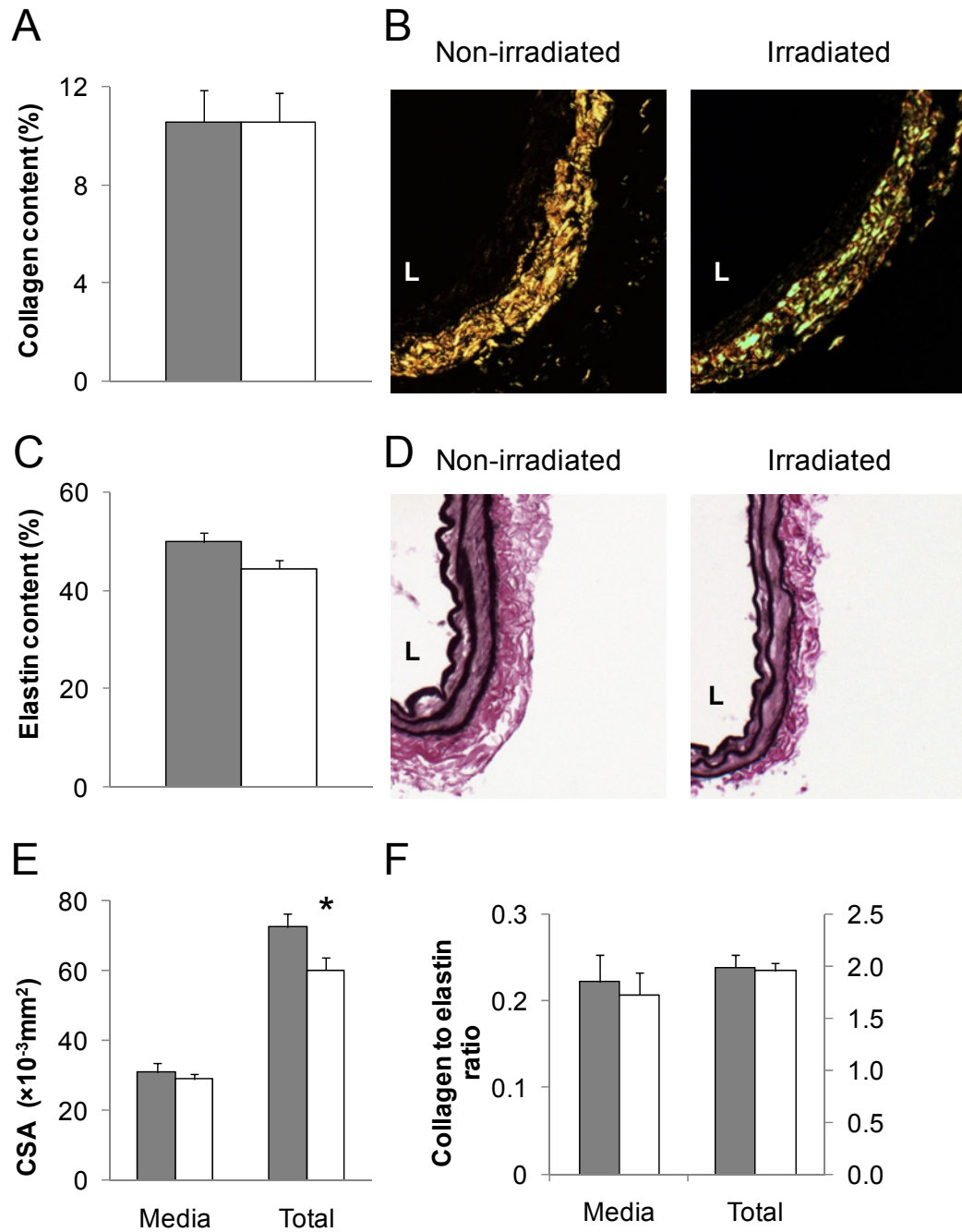


Figure 5.8: Composition of common carotid arteries in non-irradiated (grey bars) and irradiated (open bars) mice (n=8 for both groups). Collagen (A) and elastin (C) content in the media and representative microscopy images of Sirius red stained sections for collagen (B) and Verhoeff van Gieson stained sections for elastin (D) photographed under polarized and transmitted light, respectively. E, Measurements of media and total cross-sectional areas. F, Collagen to elastin ratios in the media and total vascular wall. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$. L, vascular lumen

5.6 DISCUSSION

The purpose of the present investigation was to determine the existence of possible long-term cardiovascular changes following TBI with HSC rescue transplantation in mice. The major findings of this study are that lethally irradiated and HSC transplanted C57BL/6J mice exhibit important late cardiovascular complications. The main features of these radiation-induced effects included induction of left ventricular atrophic remodeling with compromised cardiac output (CO) status and impairment of vascular hemodynamic properties combined with increased systemic vascular resistance. Additionally, we observed changes in endothelium-dependent vasorelaxant responses with increased vascular reactivity to NO.

Late cardiac morphological changes following TBI

In this study, echocardiography results of irradiated mice provide evidence of late atrophic alterations in cardiac morphology following TBI of 8.75 Gy and HSC rescue transplantation. Animal studies have shown that the main pathogenetic mechanism of irradiation induced damage to the heart appears to be related to microcirculatory injury and to functional alterations of the endothelial lining of blood vessels⁽²²¹⁾. In fact, radiation has been reported to induce pro-inflammatory and prothrombotic endothelial cell responses^(226; 227) and a persistent decrease in capillary volume and length⁽²²⁸⁾. The modifications in capillary networks and impairment of microcirculatory flow have also been hypothesized to be the predominant mechanism of radiation injury in various organs⁽²²⁹⁾, which could explain the additional atrophic changes found in livers and kidneys of irradiated mice. Furthermore, studies on cardiac irradiation in rats have shown the involvement of capillary endothelial cell alkaline phosphatase, a membrane-bound endothelial marker enzyme implicated in the regulation of endothelial cell proliferation and in microvascular blood flow, in the development of radiation injury^(220; 230). In fact, experimental findings suggest that a focal loss of alkaline phosphatase activity is related to the injury of the cardiac capillary network, a possible underlying cause of ischemia, myocardial cell death and ultimately heart failure⁽²²⁰⁾.

Long-term TBI induced alterations of cardiac function and vascular hemodynamics

In addition to morphologic changes in hearts of irradiated mice, our study reports lower CO following TBI combined with BM rescue transplantation. Similar findings of decreased CO have been previously reported in rats at 80-100 days following a local heart irradiation of 20Gy (REF). Irradiated Hodgkin's lymphoma survivors also present occasionally hemodynamic restriction due to decreased cardiac output(REF). Interestingly, contrary to the tendency of age-related CO increase in their wild-type littermates, aging was associated with relatively stable CO in irradiated mice, despite compensatory increases of LV contractility and heart rates. While smaller LV dimensions might partially explain the lower CO state in irradiated mice, changes in afterload conditions further contribute to this finding. In fact, TPVR was increased as early as 4 months following irradiation, indicating alteration of global vascular hemodynamics possibly attributable to the aforementioned radiation-induced microcirculatory injury. Late alterations, in 14-month old irradiated mice, were also observed on local carotid artery hemodynamics, despite increased *ex vivo* passive carotid lumen diameters (Fig. 5.7A), as determined by increased Pourcelot indices. These alterations in vascular resistance were not related to a loss of vascular compliance since our findings indicated preserved carotid wall composition (i.e. collagen and elastin content) and mechanical properties in irradiated mice.

TBI related changes in vasoactive responses

Furthermore, our study indicates changes in endothelial responses in irradiated mice, as shown by delayed endothelial-dependent vasodilation in response to ACh with preserved maximal relaxation. Previous animal^(231; 232) and clinical⁽²³³⁾ irradiation studies have reported early and sustained impairment of maximal endothelial vasodilatory function at doses ranging between 10 and 45 Gy. However, radiation doses in these reports were higher than those of our current investigation and, as Qi *et al.* have demonstrated, the degree of impairment of endothelial-dependent relaxations is dose-dependent⁽²³²⁾. Decreased inhibition of ACh-induced dilation in the presence of L-NAME suggests that ACh response, in the resistance arterioles of irradiated mice, was not entirely mediated by the NO pathway. While NO is an important endothelial-derived vasodilator, other endothelial-derived factors,

such as endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)⁽⁶⁷⁾, are likely to contribute, at least in part, to the signaling pathway of ACh-induced vasodilation in irradiated mice 12 months following irradiation and BM transplantation.

Furthermore, while maximal dilation to SNP was preserved in arterioles of irradiated mice, results further indicated increased sensitivity of smooth muscle cells to NO in these vessels. Although deficiency of NO production has been reported to increase response to NO by compensatory upregulation of downstream pathways⁽²³⁴⁾, the mechanism of increased NO sensitivity of smooth muscle cells in mesenteric resistance arterioles of irradiated mice remains unknown. Our findings show that irradiation induces changes in the signaling mechanisms of vascular endothelial cells of irradiated arterioles while preserving maximal vascular vasodilatory function.

The findings of our study are of particular relevance for BM transplantation therapies. BM transplantation remains the only curative therapy for hemoglobinopathies such as β -thalassemia and sickle cell anemia⁽¹⁸⁷⁾. β -thalassemia, an inherited disease of the hemoglobin gene, is characterized by the decrease or absence of synthesis of β -globin chains resulting mainly in hemolysis, ineffective erythropoiesis and a variable degree of anemia⁽¹⁰⁾. Conventional treatment of severely affected patients remains palliative and consists in chronic blood transfusions with iron chelation therapy⁽²³⁵⁾. Allogeneic BM transplantation treatment is possible but limited to patients with available HLA-matched BM donors. As an alternative to allogeneic BM transplantation, globin gene therapy is currently under investigation, mainly in murine models, for the correction of defective genes and the transplantation of autologous hematopoietic BM stem cells⁽¹⁸⁷⁾. Both strategies require a pre-conditioning regimen that includes some level of TBI. Additionally, the development and evaluation of new pharmacological and genetic treatments requires suitable β -thalassemic animal models. Such β -thalassemia mouse models of varying severities have been generated and described. BM transplanted murine models have been reported for the investigation of several diseases such as paroxysmal nocturnal hemoglobinuria⁽²³⁶⁾, polycythaemia vera⁽²³⁷⁾, as well as in sickle cell anemia^(238; 239) and β -thalassemia^(167; 192; 240) hemoglobinopathies. Myeloablative preparative regimen for the generation of these BM or fetal liver transplanted mouse models generally consists in

total TBI doses varying from 8.75 Gy up to 12 Gy given in two fractions. Information from the study of long-term radiation damage in normal tissues is therefore essential and must be considered in the elaboration of BM transplantation strategies and BM transplanted mouse models.

In this study, we have shown that irradiation combined with BM rescue leads to early impairment of vascular hemodynamics combined with late onset of cardiac atrophy, lower CO and delayed endothelium-dependent vasodilatory responses. These irradiation-induced complications following BM transplantation should be taken into account in the interpretation of cardiovascular findings in BM transplanted mouse models and in the development of future BM transplantation therapeutic strategies.

5.7 SUPPLEMENTAL RESULTS

Age	6 months		10 months		14 months	
	Non-irradiated (n = 24)	Irradiated (n = 18)	Non-irradiated (n = 19)	Irradiated (n = 18)	Non-irradiated (n = 19)	Irradiated (n = 18)
Body weight (g)	31.1 ± 0.5	26.5 ± 0.7 [‡]	31.3 ± 0.8	29.7 ± 0.8 ^b	29.8 ± 0.7	32.3 ± 1.4 ^{c,d,*}
<i>Cardiac dimensions</i>						
LVDd (mm)	3.98 ± 0.05	3.67 ± 0.09 [†]	3.83 ± 0.05	3.43 ± 0.07 ^{b,‡}	4.03 ± 0.05	3.27 ± 0.10 ^{c,‡}
LVDs (mm)	2.73 ± 0.06	2.59 ± 0.09	2.63 ± 0.06	2.31 ± 0.10 ^{a,†}	2.77 ± 0.05	2.09 ± 0.11 ^{c,‡}
IVS (mm)	1.25 ± 0.02	1.18 ± 0.04	1.26 ± 0.03	1.16 ± 0.03 [*]	1.31 ± 0.03	1.18 ± 0.04 [†]
PW (mm)	0.95 ± 0.02	0.94 ± 0.03	1.06 ± 0.03 ^f	0.93 ± 0.03 [†]	0.99 ± 0.02	0.98 ± 0.03
<i>Normalized cardiac dimensions</i>						
LVDd/BW (mm/g)	0.129 ± 0.003	0.141 ± 0.006 [*]	0.124 ± 0.003	0.117 ± 0.004 ^c	0.137 ± 0.003 ^f	0.104 ± 0.005 ^{c,d,‡}
LVDs/BW (mm/g)	0.088 ± 0.002	0.100 ± 0.005 [*]	0.085 ± 0.003	0.079 ± 0.004 ^c	0.094 ± 0.003	0.066 ± 0.004 ^{c,d,‡}
IVS/BW (mm/g)	0.054 ± 0.005	0.045 ± 0.001	0.042 ± 0.001 ^f	0.039 ± 0.001	0.045 ± 0.001 ^e	0.037 ± 0.002 [†]
PW/BW (mm/g)	0.031 ± 0.001	0.036 ± 0.001 [†]	0.035 ± 0.001 ^e	0.032 ± 0.001 ^a	0.033 ± 0.001	0.031 ± 0.002 ^a

Supplementary Table V-IV: Echocardiographic results in 6, 10 and 14 month-old non-irradiated and irradiated mice. Values are means ± SEM. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.001$ vs. same age non-irradiated mice. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$ vs. 6 month-old mice in the irradiated group; ^d $p < 0.05$ vs. 10 month-old mice in the irradiated group; ^e $p < 0.05$ and ^f $p < 0.01$ vs. 6 month-old mice in the non-irradiated group. FS, fractional shortening; LVD, left ventricle interior diameter in diastole (d) and systole (s); IVS, interventricular septum thickness; PW, posterior wall thickness; BW, body weight.

CHAPITRE 6: DISCUSSION

Les thalassémies font partie des maladies génétiques les plus fréquentes se distribuant mondialement, et ayant une incidence plus élevée chez les populations de l'Afrique, de l'Inde, de l'Asie du sud-est et de la région méditerranéenne. La β -thalassémie est un désordre de la synthèse de l'hémoglobine caractérisée par une diminution ou une absence totale de la synthèse de la β -globine résultant en une anémie hémolytique. Les transfusions sanguines chroniques demeurent le principal traitement permettant de prolonger significativement la survie des patients atteints de β -thalassémie majeure. Cependant, à long terme, les transfusions érythrocytaires combinées à une augmentation de l'absorption gastro-intestinale de fer entraînent, chez les patients β -thalassémiques, une surcharge du fer se déposant dans plusieurs tissus, tels que le foie, la rate et le cœur, et initiant une dysfonction et éventuellement une défaillance de ces organes.

Le système cardiovasculaire des patients β -thalassémiques semble subir des complications secondaires aux dépôts de fer. En effet, plusieurs études suggèrent qu'en plus de son implication dans la pathologie cardiaque thalassémique, le fer pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale et au remodelage vasculaire. De plus, les anomalies érythrocytaires β -thalassémiques combinées à cette dysfonction endothéliale vasculaire peuvent entraîner un état d'hypercoagulation et une incidence d'évènements thromboemboliques. Cependant, bien que l'administration de traitements chélateurs du fer augmente grandement le taux de survie des patients β -thalassémiques transfusés, ce traitement ne permet pas d'éliminer complètement les complications cardiovasculaires et l'insuffisance cardiaque demeure la principale cause de décès chez ces patients. Ces résultats soulèvent une question fondamentale : la β -thalassémie majeure entraîne-t-elle des complications cardiovasculaires en l'absence de transfusions sanguines et de la surcharge de fer transfusionnelle sous-jacente? Afin de tenter de répondre à cette question, nous avons présenté dans cette thèse de doctorat trois études évaluant l'hémodynamique vasculaire, la fonction endothéliale et la structure vasculaire ainsi que la fonction et structure cardiaques chez des souris β -thalassémiques non transfusées, portant un phénotype sévère comparable aux patients

atteints de β -thalassémie majeure. Ce modèle de souris a été généré par transplantation de moelle osseuse combinée à un traitement de conditionnement d'irradiation corporelle totale. Ainsi, nous nous sommes également intéressés aux effets cardiovasculaires causés par l'irradiation corporelle totale et leur impact potentiel pour la greffe thérapeutique de CSH. Les principales conclusions de ces travaux seront discutées dans cette section.

6.1 EFFETS CARDIOVASCULAIRES TARDIFS DE L'IRRADIATION CORPORELLE TOTALE

L'irradiation ionisante est employée en médecine d'une part dans le cadre du traitement des cancers par radiothérapie et d'autre part comme méthode de conditionnement préalable à la transplantation de moelle osseuse. Plusieurs études cliniques et animales ont évalué les effets tissulaires délétères de l'irradiation conduisant à des complications aiguës et chroniques. Cependant, ces études rapportent soit les effets localisés d'une forte dose de radiation (≥ 30 Gy) utilisée en radiothérapie, les effets systémiques suite à une exposition accidentelle dont la dose reçue est le plus souvent imprécise, ou les effets systémiques chez des patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse pour le traitement d'une maladie pouvant également contribuer à entraîner des complications. Nous avons donc évalué spécifiquement les effets systémiques cardiovasculaires latents de l'irradiation corporelle totale d'une dose contrôlée, soit 8.75Gy, chez des souris saines de type sauvage C57BL/6J.

Nos travaux démontrent que l'irradiation corporelle totale entraîne à long terme le développement de lésions tissulaires irréversibles se présentant sous la forme d'atrophies tissulaires cardiaque, hépatique et rénale. Ces anomalies sont accompagnées d'une altération des propriétés hémodynamiques, d'une augmentation de la résistance vasculaire et d'une modification des réponses vasomotrices dépendantes ou non de l'endothélium. Il est également à noter que malgré l'absence d'atrophie pulmonaire, une importante fibrose tissulaire est observée, soit une augmentation de 2.4 fois des dépôts de collagène (*Tableau V-III*), ce qui indique le développement d'une lésion radio-induite comparable à un processus de cicatrisation pathologique. À l'inverse, la rate démontre la plus forte résistance à l'irradiation. La

compréhension des mécanismes pathologiques de la lésion radio-induite est indispensable pour l'interprétation de l'ensemble des résultats.

Bien que les processus pathologiques des dommages radio-induits débutent immédiatement lors de l'irradiation, les lésions morphologiques et manifestations cliniques n'apparaissent que plusieurs semaines, mois, voire même années suite au traitement⁽²⁴¹⁾. Ainsi, les lésions tissulaires radio-induites sont généralement classées en dommages aigus, sub-aigus et latents, selon le délai d'apparition des symptômes⁽²⁴²⁾. Les dommages cellulaires directs et la formation de radicaux libres produits par l'irradiation entraînent en premier lieu des lésions à l'ADN qui altèrent la progression du cycle cellulaire et de la capacité proliférative causant ainsi la mort cellulaire. Cette dernière peut survenir par nécrose, lyse cellulaire, mort mitotique ou apoptose. La réponse tissulaire suite à l'irradiation se caractérise par l'activation d'une séquence complexe d'événements de cicatrisation impliquant le système de coagulation, d'inflammation, d'accumulation de matrice extracellulaire et de remodelage⁽²²⁷⁾. Ces mécanismes impliquent l'activation de multiples voies de signalisation cellulaire conduisant à la production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Malgré leur variabilité, la pathologie des lésions résultantes implique toujours la fibrose, la nécrose, l'atrophie et les dommages vasculaires.

À ce jour, il est clairement établi que la radiosensibilité varie entre les différents tissus selon le type cellulaire impliqué. Les cellules épithéliales et les cellules endothéliales vasculaires sont particulièrement sensibles au stress ionisant. L'irradiation active les cellules endothéliales, entraîne leur dysfonctionnement et initie leur apoptose. Ces phénomènes mènent au développement de lésions vasculaires qui contribuent à l'initiation, la progression et au maintien des dommages tissulaires aigus et latents suivant l'irradiation. Les réseaux microcirculatoires sont considérés particulièrement vulnérables à l'irradiation, puisqu'en plus de l'apoptose endothéliale, ils subissent des phénomènes tels que les ruptures capillaires, le détachement de cellules endothéliales de la membrane basale et la thrombose⁽²⁴³⁾. Les études suggèrent donc que la réduction du réseau microvasculaire, rapportée entre autres dans le myocarde⁽²⁴⁴⁾ et le système nerveux central⁽²⁴⁵⁾, pourrait causer une ischémie et des zones d'hypoxie tissulaire pouvant entraîner la mort cellulaire et subséquentement

la fibrose. L'hypoxie entraîne la production supplémentaire de radicaux libres qui perturberaient davantage la guérison de la lésion pouvant ainsi contribuer à son irréversibilité.

Ces mécanismes peuvent expliquer en partie le développement de l'atrophie tissulaire observée également dans nos travaux portant sur l'irradiation corporelle totale. L'atrophie cardiaque, hépatique et rénale s'accompagne d'importantes modifications vasculaires, notamment une augmentation soutenue de la résistance vasculaire périphérique et une altération tardive de l'hémodynamie vasculaire carotidienne, telle que montrée par l'augmentation de l'index de résistance de Pourcelot (PI). Nos études de la réactivité vasculaire, montrant une sensibilité accrue des cellules musculaires lisses à un donneur de NO combinée à une perte de la sensibilité en réponse à un vasodilatateur dépendant de l'endothélium, suggèrent également des modifications de la signalisation endothéliale menant à la production de NO. L'ensemble de ces résultats pourrait indiquer l'implication des dommages vasculaires dans les lésions atrophiques induites par l'irradiation corporelle totale chez les souris C57BL/6J.

6.1.1 β -thalassémie : une condition favorisant des effets protecteurs contre les dommages tissulaires de l'irradiation?

L'observation comparative des résultats histologiques, obtenus auprès des groupes de souris contrôles non-irradiées, contrôles irradiés et β -thalassémiques homo- β thal (irradiés et générés par greffe de CSH), nous a permis d'observer une différence dans le développement des lésions tissulaires radio-induites (Annexe II, Tableau A-III). En effet, les organes des souris homo- β thal ne démontrent pas d'atrophie, mais plutôt une hypertrophie tissulaire. De plus, les évaluations hémodynamiques révèlent une augmentation de la résistance périphérique totale (TPVR) nettement plus élevée chez les souris contrôles irradiées que chez les souris homo- β thal, et ce dans tous les groupes d'âge (Annexe II, Fig. 6.4 pour les résultats à 14 mois). Ces résultats, relèvent une différence fondamentale entre les groupes contrôles et β -thalassémiques, soit une atténuation des lésions tissulaires atrophiques irréversibles chez les souris irradiées ayant reçu des CSH β -thalassémiques. Cette

conclusion intéressante suggère la présence d'un mécanisme radioprotecteur relié à l'initiation et l'évolution de la pathologie β -thalassémique.

En se basant sur les mécanismes de développement des dommages tissulaires radio-induits, nous proposons un modèle permettant possiblement d'expliquer cette absence de lésions tissulaires atrophiques irréversibles chez la souris homo- β thal (Figure 6.1). Le remplacement des CSH saines par des CSH provenant de donneurs β -thalassémiques $Hbb^{th-1/th-1}$ permet de reproduire les caractéristiques pathophysiologiques de ce modèle de souris incluant une anémie microcytaire et hypochrome sévère. Ainsi, la diminution conséquente rapide de la capacité de transport de l'oxygène par le sang entraîne une hypoxie tissulaire systémique qui stimule la production de plusieurs protéines dont l'érythropoïétine (EPO) et le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, « vascular endothelial growth factor »). En effet, des études cliniques ont démontré une augmentation des taux plasmatiques d'EPO^(246; 247) et de VEGF^(122; 248) chez les patients β -thalassémiques. L'EPO joue un rôle crucial dans la régulation de l'érythropoïèse. Le VEGF, quant à lui, est un facteur de croissance spécifique aux cellules endothéliales. Ces deux molécules exercent également des effets anti-apoptotiques et angiogéniques⁽²⁴⁹⁻²⁵¹⁾. Nous proposons donc que l'EPO et le VEGF puissent exercer un effet protecteur en inhibant une étape importante dans le développement des dommages tissulaires suite à l'irradiation, soit l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires et la réduction du réseau microcirculatoire. En conséquence, les organes radiosensibles subiraient un remodelage plutôt qu'une atrophie tissulaire.

Il est également intéressant de noter que l'hypoxie est considérée un élément majeur dans la résistance tumorale à l'irradiation^(252; 253) et que l'anémie, chez les patients atteints de cancer, est considérée comme un facteur limitant l'efficacité de la radiothérapie⁽²⁵⁴⁾.

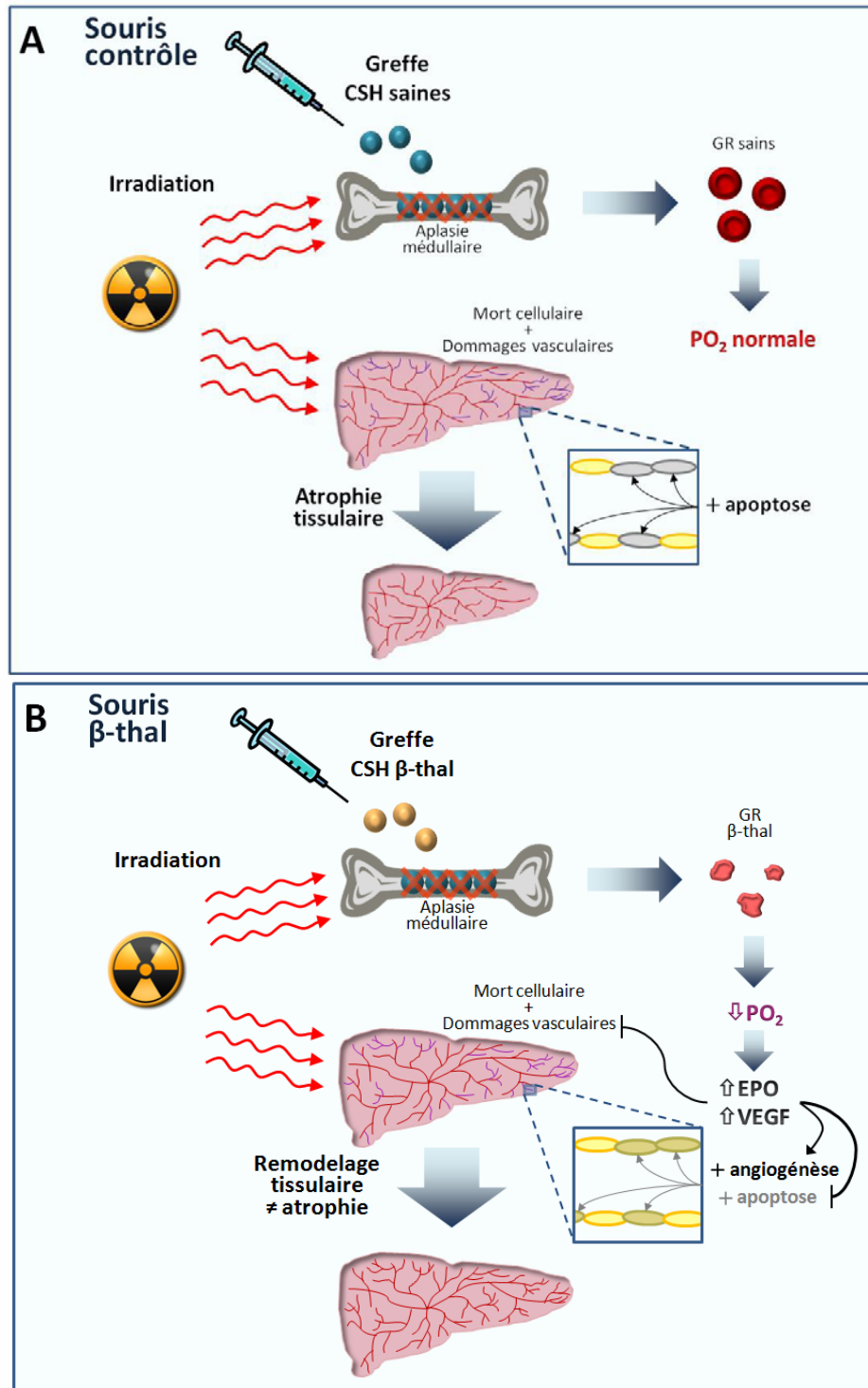


Figure 6.1: Schéma modélisant le développement des lésions radio-induites atrophiques tissulaires (A) et l'effet possiblement radio-protecteur des tissus lors de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) β -thalassémiques (β -thal) (B). GR, globules rouges; PO_2 , pression partielle d' O_2 dans le sang; EPO, érythropoïétine; VEGF, « vascular endothelial growth factor ».

6.2 COMPLICATIONS VASCULAIRES DE LA β -THALASSÉMIE

Le globule rouge β -thalassémique joue potentiellement un rôle central dans l'initiation des désordres vasculaires et circulatoires. En effet, plusieurs phénomènes intra- et extra-érythrocytaires peuvent être impliqués dans la vasculopathie β -thalassémique, notamment les phénomènes thrombotiques stimulés par les membranes cellulaires érythrocytaires et l'hémolyse intravasculaire de ces globules rouges. Ces mécanismes seront discutés dans cette section.

L'anomalie de la synthèse des chaînes de β -globine entraîne l'accumulation d'un excès d' α -globine dans le globule rouge. Ces α -globines sont dégradées plus rapidement que les chaînes de β -globines en hémichromes ce qui libère le fer qu'elles contiennent et catalyse ainsi la formation d'espèces radicalaires de l'oxygène. L'étude de globules rouges β -thalassémiques confirme cet état pro-oxydant reflété par une diminution de la concentration du système de défense anti-oxydant intracellulaire du glutathion réduit⁽²⁵⁵⁾. L'oxydation du cytosquelette membranaire est considérée responsable de la rigidité accrue des érythrocytes thalassémiques, limitant leur déformabilité lors du passage dans les étroites structures vasculaires, dont le réseau capillaire sinusoïde des organes réticuloendothéliaux tels que la rate^(9; 145; 256). De plus, l'oxydation peut également causer une altération de l'organisation des phospholipides membranaires en exposant la phosphatidylsérine (PS) sur la surface extracellulaire.

Généralement, la bicouche membranaire des cellules normales présente une asymétrie de la répartition de ces phospholipides. Ainsi, les phospholipides à tête choline, tels que la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline se localisent principalement sur la monocouche externe alors que la PS et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont majoritairement présentes sur la couche interne endoplasmique⁽²⁵⁷⁾. Une des conséquences de l'exposition des PS sur la surface externe membranaire de l'érythrocyte β -thalassémique est sa reconnaissance et sa phagocytose par les macrophages⁽²⁵⁷⁾. Ce processus est aussi impliqué dans l'élimination des érythrocytes sénescents.

En outre, la présence de PS sur la monocouche exoplasmique explique partiellement l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire rapportée chez les patients β -thalassémiques⁽⁴⁸⁾ ainsi que l'adhésion de ces érythrocytes aux cellules endothéliales et leur activation subséquente^(113; 258). Lorsqu'exposés à la surface de la membrane érythrocytaire, les PS fournissent également un site de liaison pour des complexes de facteurs de la coagulation et contribuent ainsi à la conversion de la prothrombine en thrombine⁽²⁵⁷⁾. La production accrue de thrombine contribuerait au processus thrombotique en entraînant l'activation des plaquettes, des monocytes, des granulocytes et des cellules endothéliales, en plus de stimuler la production de facteur tissulaire par ces-dernières⁽¹¹³⁾. Chez les patients atteints de β -thalassémie intermédiaire et majeure, l'ensemble de ces phénomènes contribue à un état d'hypercoagulation chronique pouvant se manifester par des accidents vasculaires cérébraux ou des événements thromboemboliques veineux, tels que la thrombose veineuse profonde et l'embolie pulmonaire^(143; 144; 259-261).

D'autre part, l'hémolyse érythrocytaire contribue davantage à la pathologie vasculaire β -thalassémique. L'hémolyse intravasculaire chronique libère dans la circulation sanguine l'hémoglobine, les chaînes d' α -globine, leurs produits de dégradation ainsi que l'arginase érythrocytaire. Généralement, l'hémoglobine plasmatique est rapidement liée par l'haptoglobine et ce complexe est reconnu puis éliminé par les monocytes/macrophages. Cependant, puisque l'haptoglobine n'est pas recyclée, une libération soutenue de l'hémoglobine dans le compartiment vasculaire, telle qu'occasionnée par un désordre hémolytique chronique, entraîne la déplétion d'haptoglobine⁽¹⁷⁶⁾. La présence de fer dans les tubules rénaux démontrée par nos études du modèle de souris β -thalassémique suggère une saturation du système d'élimination de l'hémoglobine par l'haptoglobine. En effet, ces résultats histologiques témoignent possiblement d'une filtration glomérulaire de l'hémoglobine sérique réabsorbée par les tubules rénaux proximaux. L'hémoglobine plasmatique libre réagit rapidement avec le NO et l'inactive en générant le nitrate (NO₃), un produit d'oxydation inactif, ainsi que la méthémoglobine, une forme oxydée d'hémoglobine. L'arginase érythrocytaire contribue également à limiter la production du NO en dégradant la L-arginine, substrat nécessaire à sa synthèse. Chez les individus β -thalassémiques, ces réactions pourraient occasionner la réduction de la

biodisponibilité du NO et en limiter les effets vasculaires incluant la vasodilatation et les propriétés anti-adhérentes, anti-thrombotiques et anti-oxydantes⁽²⁶²⁾. Finalement, la dégradation de l'hémoglobine et des chaînes de globines plasmatiques libère l'hème et son noyau de fer ferrique (Fe^{3+}) qui sont classiquement éliminés grâce à l'hémopexine et la ferritine, respectivement⁽¹⁷⁶⁾. Puisque la β -thalassémie se caractérise par une hémolyse chronique, la capacité de ces mécanismes d'élimination pourrait être saturée ce qui augmenterait la concentration plasmatique en hème et fer ferrique contribuant conséquemment à accroître le stress oxydatif en générant des espèces réactives de l'oxygène. Il est également important de noter qu'une diminution de la disponibilité de L-arginine peut contribuer au stress oxydatif en entraînant le découplage de l'enzyme NOS, ce qui induit la production de O_2^- en lieu du NO⁽⁷⁷⁾.

6.2.1 Dysfonctions endothéliales dans la β -thalassémie

Ces phénomènes de stress oxydatif et de diminution de la biodisponibilité du NO associés à l'hémolyse érythrocytaire expliqueraient l'altération de la fonction endothéliale vasculaire dans la β -thalassémie. En effet, des études cliniques rapportent une diminution de la dilatation dépendante du débit dans l'artère brachiale de patients atteints de β -thalassémie majeure^(124; 125). Nos études *ex vivo* de la vasoréactivité des artérioles de résistance de souris β -thalassémiques confirment un dysfonctionnement endothélial caractérisé par une diminution significative de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Nos analyses rapportent également que l'altération de la réponse vasomotrice n'était pas secondaire à une diminution de la réponse des cellules musculaires lisses au NO. Ces observations suggèrent que l'altération de la vasoréactivité dans la β -thalassémie serait consécutive à une biodisponibilité réduite du NO. De plus, nos résultats révèlent pour la première fois une augmentation significative de l'expression de l'enzyme permettant la synthèse du NO, soit la eNOS, démontrant ainsi que la dysfonction endothéliale vasomotrice β -thalassémique n'est pas causée par une déficience de cette protéine. En condition pathologique, l'expression accrue de la eNOS représente un mécanisme compensatoire associé à une diminution de la biodisponibilité du NO ainsi qu'à l'augmentation de la production de O_2^- et d'autres espèces réactives de l'oxygène⁽⁸⁰⁾.

La réduction de la disponibilité du NO peut non seulement entraîner une vasoconstriction, mais peut également stimuler l'agrégation plaquettaire, l'inflammation et la prolifération des cellules musculaires lisses. Des études cliniques et nos observations chez des souris β -thalassémiques supportent cette hypothèse de pathologie proliférative vasculaire β -thalassémique en montrant, respectivement, une augmentation de l'épaisseur intima-média⁽¹⁸⁰⁾ et de la surface totale de la paroi carotidienne. Cependant, bien que les résultats cliniques montrent une augmentation de la rigidité artérielle carotidienne⁽¹⁸⁰⁾, aortique⁽¹⁸¹⁾ et brachiale⁽¹²⁴⁾ chez des patients β -thalassémiques, nos travaux indiquent plutôt une distensibilité carotidienne préservée chez les souris β -thalassémiques. Ces différences des propriétés mécaniques artérielles laissent entrevoir la possibilité d'un mécanisme distinct de remodelage vasculaire entre les souris et les patients β -thalassémiques. Mentionnons cependant que l'équipe d'Ulger *et al.* rapporte une relation directe entre la rigidité artérielle aortique et la charge de fer occasionnée par la thérapie transfusionnelle⁽¹⁸¹⁾. L'absence de traitement et conséquemment de surcharge de fer chez la souris β -thalassémique pourrait être la cause de cette divergence, toutefois cette contribution demeure à être clarifiée.

6.2.2 Désordres circulatoires dans la β -thalassémie

Les phénomènes thrombotiques combinés à une adhérence accrue des érythrocytes et des monocytes/macrophages à l'endothélium vasculaire ainsi qu'une dysfonction endothéliale vasomotrice suggèrent l'existence de perturbations circulatoires dans la pathologie cardiovasculaire de la β -thalassémie. Nos travaux corroborent cette hypothèse en révélant une augmentation de la résistance périphérique totale à l'écoulement sanguin chez la souris β -thalassémique en comparaison avec le groupe de souris contrôle non-irradié. Cette altération était également observée dans la circulation locale de la carotide et de l'aorte abdominale, tel que démontrée par une augmentation des PI. Afin d'écartier l'influence des effets de la greffe de CSH sur ces résultats, nous avons comparé les valeurs de TPVR et de PI carotidiens et aortiques des souris homo- β thal âgées de 14 mois (transplantées avec des CSH provenant de souris Hbb^{th-1/th-1}) avec celles des souris Hbb^{th-1/th-1}. Le *Tableau A-I* de l'annexe I rapporte cette comparaison et permet de constater l'absence de différences entre ces résultats. De plus, la comparaison des résultats de PI de

l'artère carotide entre les souris C57Bl/6J (non-irradiées), les souris contrôles irradiées, et les souris β -thalassémiques (irradiés et générés par greffe de CSH) confirment qu'il y a une augmentation plus importante de la résistance locale carotidienne dans ce dernier groupe de souris (Annexe II, Figure 6.5).

D'autre part, la diminution de TPVR rapportée au chapitre 4 (Fig. 4.2B) refléterait en réalité une augmentation moindre de cette résistance que celle des souris contrôles irradiées, lorsque l'on compare aux TPVR des souris contrôles non-irradiées (voir Fig.6.4, Annexe II). Cette observation pourrait s'expliquer par une différence des mécanismes entraînant l'altération des propriétés hémodynamiques chez les souris contrôles irradiées et les souris β -thalassémiques. Tel que décrit à la section 6.1, les souris contrôles irradiées subiraient des dommages vasculaires radio-induits qui entraînent l'atrophie tissulaire par l'intermédiaire de lésions aux réseaux microcirculatoires. Ces lésions, causées possiblement par l'apoptose des cellules endothéliales des capillaires et petites artérioles, résulteraient en une raréfaction microvasculaire et une obstruction progressive de la lumière de ces vaisseaux irriguant plusieurs organes, tels que le foie, les reins et le cœur^(221; 228; 241; 263). Ces phénomènes seraient donc responsables de l'augmentation de la résistance périphérique. Selon notre modèle, proposé à la section 6.1.1, la souris β -thalassémique bénéficierait des effets protecteurs des substances produites en réponse à l'anémie, telles que l'EPO et le VEGF. Ce mécanisme serait responsable d'une réduction importante de l'incidence de ces dommages microvasculaires radio-induits. Ainsi, l'altération des propriétés hémodynamiques chez les souris β -thalassémiques serait principalement consécutive à une interaction entre les mécanismes physiopathologiques décrits ci-dessus, soit la dysfonction endothéliale, l'agrégation érythrocytaire, l'adhérence accrue des monocytes/macrophages et érythrocytes à l'endothélium ainsi que la thrombose.

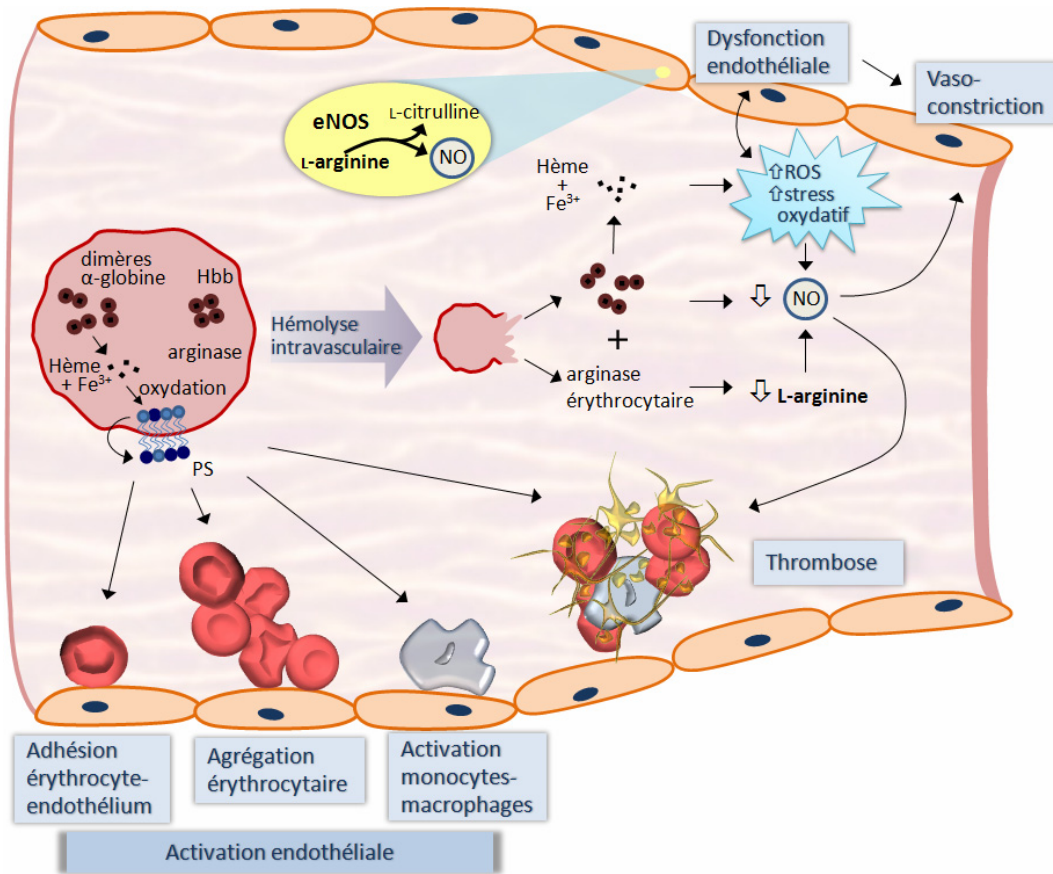


Figure 6.2: Résumé des complications vasculaires de la β -thalassémie. L'excès de chaînes d' α -globine contenus dans les érythrocytes β -thalassémiques entraîne des dommages oxydatifs membranaires et une perte de l'asymétrie de la répartition des phospholipides membranaires. L'exposition subséquente des phosphatidylsérines (PS) peut expliquer en partie l'adhérence accrue des érythrocytes à l'endothélium, l'activation des monocytes-macrophages, l'agrégation érythrocytaire accrue et l'hypercoagulation ainsi que la thrombose. L'hémolyse intravasculaire des globules rouges β -thalassémiques libère l'hémoglobine, l'hème et l'arginase érythrocytaire dans le plasma. Puisque l'hémolyse est chronique, il y a potentiellement une saturation des systèmes d'élimination intravasculaires de ces dernières substances entraînant leur accumulation. La présence d'hème dans le plasma exerce des effets oxydants sur les cellules endothéliales et peut conduire au dysfonctionnement endothélial. Le monoxyde d'azote (NO) est généré par l'enzyme eNOS des cellules endothéliales à partir de la L-arginine. L'hémolyse intravasculaire peut diminuer la disponibilité du NO soit directement par sa réaction avec l'hémoglobine ou par la dégradation du substrat L-arginine par l'arginase érythrocytaire. L'insuffisance de NO peut conduire à l'activation et l'agrégation plaquettaire et entraîner la perturbation de la régulation du tonus vasculaire provoquant la vasoconstriction.

6.3 β -THALASSÉMIE ET PATHOLOGIE CARDIAQUE

Le développement des désordres cardiaques chez les patients β -thalassémiques est généralement attribué à un mécanisme pathophysiologique impliquant les effets compensatoires d'une anémie chronique combinée aux dépôts myocardiques d'excès de fer transfusionnel^(124; 264-266). Notre étude de la pathophysiologie cardiovasculaire chez la souris β -thalassémique non-transfusée, nous a permis de proposer un mécanisme complémentaire de développement de la pathologie cardiaque dans la β -thalassémie. Ce modèle, schématisé à la figure 6.4, comporte deux composantes principales, soit l'effet direct de l'anémie chronique additionné aux complications vasculaires décrites dans la section 6.2.

Dans la β -thalassémie, l'anémie chronique est occasionnée par un effet combiné d'une érythropoïèse inefficace, d'une élimination des érythrocytes reconnus par les macrophages et d'une hémolyse érythrocytaire persistante. Une conséquence directe de cette anémie est une diminution de la capacité de transport de l'O₂ par le sang résultant en une hypoxie tissulaire. Afin de compenser les défauts d'oxygénation tissulaire, le cœur β -thalassémique est stimulé à élever son débit afin de tenter d'augmenter le transport en O₂. Puisque l'anémie occasionnée par la β -thalassémie est de nature chronique, l'augmentation soutenue de la charge de travail cardiaque, secondaire à l'état de débit élevé, induit une hypertrophie. Nos résultats d'échocardiographie, rapportés au chapitre 4, confirment une importante augmentation de la masse du ventricule gauche et du débit cardiaque chez les souris β -thalassémiques et ce en l'absence de dépôts myocardiques de fer. De plus, les observations histologiques témoignent du développement d'un remodelage cardiaque accompagné de fibrose interstitielle. Subséquemment, plusieurs facteurs sont susceptibles d'entraîner une décompensation de la fonction cardiaque. D'une part, les anomalies érythrocytaires conduisant à un état d'hypercoagulation et de dysfonction endothéliale systémique peuvent altérer les propriétés hémodynamiques périphériques et coronaires, ce qui contribue à limiter l'oxygénation du myocarde. D'autre part, l'hémolyse chronique peut induire une augmentation du stress oxydatif qui contribue à l'altération de la fonction contractile des cardiomyocytes. Notre étude de la fonction cardiaque confirme la diminution de la contractilité ventriculaire gauche chez les

souris β -thalassémiques se traduisant par une altération de la fraction de raccourcissement à 10 et 14 mois. L'ensemble de ces événements peut conduire à la progression graduelle de la décompensation cardiaque menant ultimement vers l'insuffisance cardiaque.

Finalement, il est essentiel de noter que les travaux rapportés dans le présent document étaient concentrés sur la structure et la fonction du ventricule gauche. Cependant, plusieurs études suggèrent l'implication de la dysfonction du ventricule droit dans la cardiomyopathie β -thalassémique. En effet, une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire, menant à l'hypertension pulmonaire et ultimement à l'insuffisance du ventricule droit, était rapportée chez les patients atteints de β -thalassémie intermédiaire et majeure^(133; 264; 267). L'hypertension pulmonaire occasionnée par la β -thalassémie est un processus multifactoriel pouvant impliquer les mécanismes de vasculopathie causés par l'hémolyse intravasculaire chronique et l'état d'hypercoagulation⁽²⁶⁸⁻²⁷⁰⁾. De plus, d'autres mécanismes, tels que la myocardite et les désordres valvulaires, peuvent également contribuer à la détérioration de la fonction cardiaque dans la β -thalassémie^(130; 136; 264).

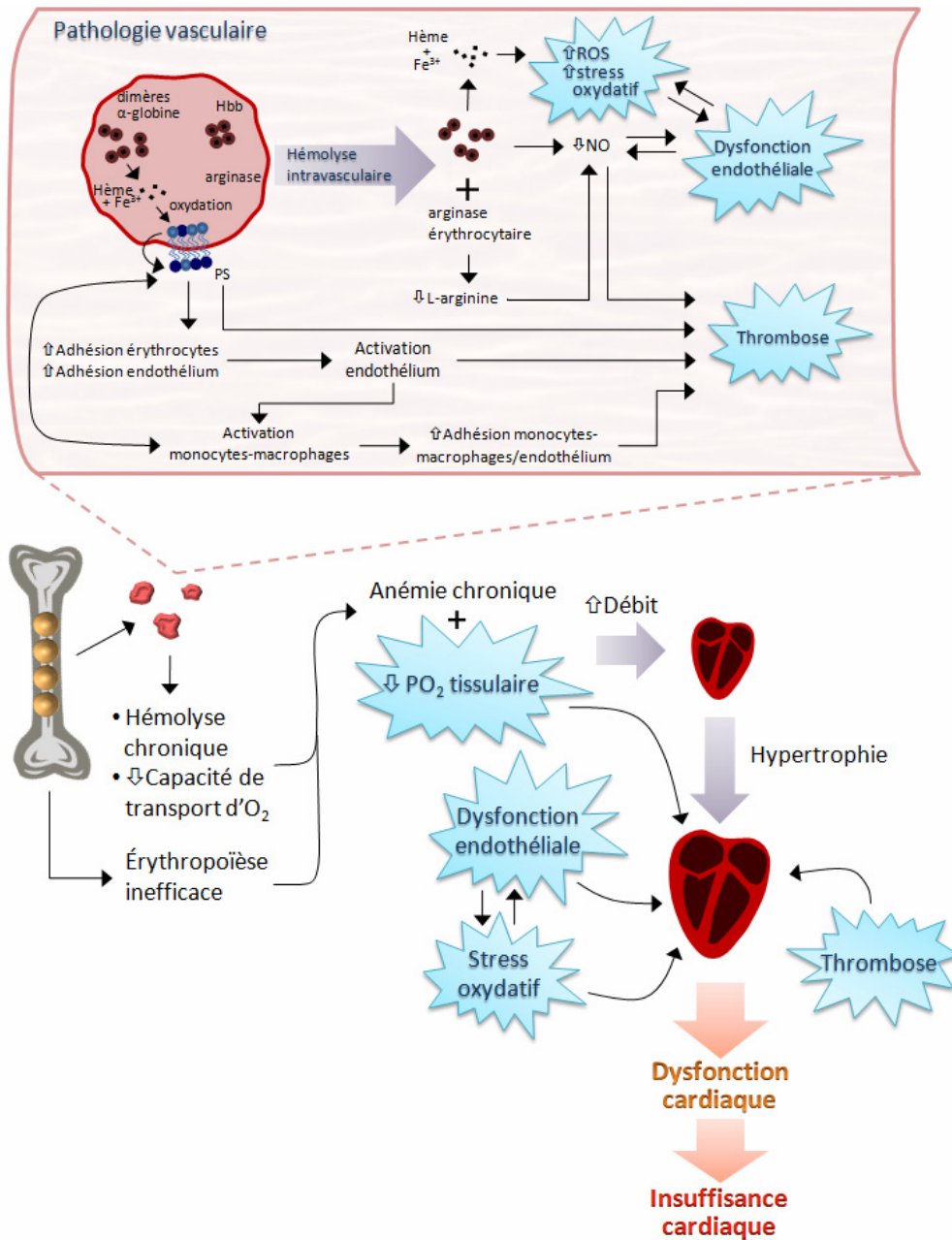


Figure 6.3: Modèle récapitulatif du développement des désordres cardiaques de la β -thalassémie. Hbb, hémoglobine ; PS, phosphatidylsérine ; NO, monoxyde d'azote ; PO₂, pression partielle d' O_2 .

6.4 PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

À ce jour, il paraît évident que la β -thalassémie n'est pas caractérisée uniquement par une anémie chronique mais plutôt par une pathologie systémique secondaire aux anomalies érythrocytaires. Considérant la sévérité de la β -thalassémie majeure, il est difficile de concevoir des études cliniques sans l'administration d'une thérapie de transfusion. Classiquement, la charge de fer, occasionnée par ce type de thérapie et par une absorption intestinale accrue, est considérée au centre de l'étiologie cardiovasculaire β -thalassémique. Conséquemment, la majorité des études cliniques et des stratégies thérapeutiques cardiovasculaires de la β -thalassémie se concentrent sur la physiopathologie liée à la toxicité du fer. Néanmoins, les résultats parfois peu concluants d'une réduction de la charge de fer myocardique sur la fonction cardiaque des patients β -thalassémiques⁽²⁷¹⁾ indiquent la nécessité de préciser les mécanismes additionnels impliqués dans le développement de la cardiopathie afin de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. L'utilisation d'un modèle murin β -thalassémique non-transfusé a permis, dans le cadre de cette thèse, de faciliter l'exploration de ces mécanismes pathologiques en conditions contrôlées permettant ainsi de suggérer plusieurs cibles thérapeutiques complémentaires.

Une thérapie anti-oxydante semble envisageable puisque le stress oxydatif représenterait à la fois une cause et une conséquence de l'hémolyse intravasculaire dans la β -thalassémie. La libération de fer par les chaînes d' α -globine excédentaires diminuerait le potentiel anti-oxydant à l'intérieur des érythrocytes β -thalassémiques ce qui accélérerait leur destruction. Le déversement du contenu érythrocytaire dans le compartiment vasculaire pourrait contribuer à la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Les substances anti-oxydantes tels que la vitamine E⁽²⁷²⁾, les flavonoïdes incluant la rutine, la curcumine et les polyphénols contenus dans les thés⁽²⁷³⁾, pourraient non seulement protéger les globules rouges thalassémiques des dommages oxydatifs mais aussi contribuer à la prévention d'évènements thrombotiques. Par ailleurs, les thérapies combinées de vitamine E, substance protégeant de l'oxydation lipidique, et d'un anti-oxydant protéinique tel que la N-acétylcystéine pourraient être plus efficaces dans le contrôle du stress oxydant⁽¹¹¹⁾. Des études supplémentaires sont

requis afin d'évaluer l'effet de ces traitements sur la pathologie cardiovasculaire β -thalassémique.

De plus, l'altération de la biodisponibilité du NO semble une étape importante dans la pathologie vasculaire occasionnée par la β -thalassémie, suggérant ainsi un rôle potentiellement bénéfique des stratégies thérapeutiques permettant d'en accroître la synthèse ou d'en diminuer la dégradation. L'hémolyse intravasculaire entraîne le décroisement de l'hémoglobine et de l'arginase érythrocytaire ce qui peut contribuer directement et indirectement au déficit local ou général en NO. Une supplémentation orale en arginine pourrait combler un possible déficit plasmatique en L-arginine afin de rétablir indirectement la biodisponibilité du NO. Kaul *et al.* ont étudié cette voie thérapeutique dans un modèle murin de la drépanocytose, une hémoglobinopathie caractérisée également par une hémolyse chronique⁽²⁷⁴⁾. Leurs travaux démontrent plusieurs effets bénéfiques associés à une administration alimentaire d'arginine, soit une augmentation de la biodisponibilité du NO, une amélioration considérable de la fonction microvasculaire, ainsi qu'une diminution de l'hémolyse et du stress oxydatif⁽²⁷⁴⁾. Des substances permettant de diminuer l'élimination du NO par l'hémoglobine libre plasmatique pourraient également démontrer un bénéfice thérapeutique. Les nitrites possèdent non seulement la capacité de générer du NO en réagissant avec la désoxyhémoglobine, mais ils bloquent également la séquestration additionnelle du NO par l'hémoglobine libre en la transformant en méthémoglobine⁽²⁷⁵⁾. Récemment, les résultats d'une étude clinique auprès de patients drépanocytaires suggèrent que l'infusion de nitrite de sodium permet d'augmenter le débit sanguin local par l'intermédiaire d'une vasodilatation potentialisée par l'hypoxie⁽²⁷⁶⁾. Ces composés ne représentent qu'un exemple de traitements pouvant améliorer la biodisponibilité du NO et indiquent la nécessité d'évaluer leur efficacité thérapeutique cardiovasculaire dans la β -thalassémie.

Finalement, nos travaux révèlent des éléments intéressants concernant les mécanismes de développement de lésions aux tissus sains induites par l'irradiation. Des études plus poussées permettraient de caractériser l'importance de l'EPO, du VEGF, ou d'autres substances potentiellement anti-apoptotiques ou angiogéniques stimulées par l'hypoxie, dans la prévention des dommages tissulaires radio-induits.

Ces connaissances pourraient contribuer significativement à l'élaboration de traitements de greffe de cellules souches hématopoïétiques utilisant l'irradiation comme pré-conditionnement médullaire.

En conclusion, les mécanismes physiopathologiques de la β -thalassémie n'impliquent pas uniquement une anémie chronique combinée à une surcharge de fer mais également une vasculopathie complexe initiée par les érythrocytes endommagés. L'ensemble des résultats présentés dans le cadre de cette thèse contribue à améliorer la compréhension du développement de la pathologie cardiovasculaire β -thalassémique. Ces travaux démontrent la nécessité d'explorer des stratégies thérapeutiques complémentaires et laissent entrevoir la possibilité d'améliorer la qualité de vie des patients β -thalassémiques. L'évolution constante des options thérapeutiques nous permet d'envisager que la tendance croissante de l'espérance de vie de ces patients sera maintenue durant les années à venir.

RÉFÉRENCES

1. **Guyton A.C. and Hall J.E.** *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001.
2. **Sherwood L.** *Human physiology: from cells to systems*. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1997.
3. **Young NS, Gerson SL and High KA.** *Clinical hematology*. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2006.
4. **Weatherall DJ and Provan AB.** Red cells I: inherited anaemias. *Lancet* 355: 1169-1175, 2000.
5. **Weatherall DJ.** Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews Genetics* 2: 245-255, 2001.
6. **Steinberg MH, Benz Jr. EJ, Adewoye AH and Ebert BL.** Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In: *Hematology: basic principles and practice*, 5th ed., edited by Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P and Heslop HE. New York: Churchill-Livingstone, 2008.
7. **Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto and N.** *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
8. **Schechter AN.** Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 112: 3927-3938, 2008.
9. **Weatherall DJ and Clegg JB.** *The thalassaemia syndromes*. Oxford: Blackwell Science, 2001.
10. **Weatherall DJ.** Disorders of globin synthesis: The thalassaemias. In: *Williams hematology*, edited by Lichtman M.A., Beutler E., Coller B.S., Kipps T.J., Seligsohn U., Kaushansky K and Prchal JT. New York: McGraw Hill, Medical publishing division, 2006, p. 633-666.

11. **Giardina PJ and Forget BG.** Thalassemia Syndromes. In: Hematology: basic principles and practice, 5th ed., edited by Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, Furie B, Silberstein LE, McGlave P and Heslop HE. New York: Churchill-Livingstone, 2008.
12. **Tuzmen S and Schechter AN.** Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations. *Blood Reviews* 15: 19-29, 2001.
13. **Stamatoyannopoulos G., Majerus P.W., Perlmutter R.M. and Varmus H.** The Molecular Basis of Blood Diseases. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001, p. 183-273.
14. **Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK, Casals-Pascual C and Roberts DJ.** Malaria and the red cell. *Hematology* 35-57, 2002.
15. **Olivieri NF.** The beta-thalassemias. *New England Journal of Medicine* 341: 99-109, 1999.
16. **Schrier SL.** Pathophysiology of thalassemia. *Current Opinion in Hematology* 9: 123-126, 2002.
17. **Yuan J, Angelucci E, Lucarelli G, Aljurf M, Snyder LM, Kiefer CR, Ma L and Schrier SL.** Accelerated programmed cell death (apoptosis) in erythroid precursors of patients with severe beta-thalassemia (Cooley's anemia). *Blood* 82: 374-377, 1993.
18. **Centis F, Tabellini L, Lucarelli G, Buffi O, Tonucci P, Persini B, Annibali M, Emiliani R, Iliescu A, Rapa S, Rossi R, Ma L, Angelucci E and Schrier SL.** The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with beta -thalassemia major. *Blood* 96: 3624-3629, 2000.
19. **Sorensen S, Rubin E, Polster H, Mohandas N and Schrier S.** The role of membrane skeletal-associated alpha-globin in the pathophysiology of beta-thalassemia. *Blood* 75: 1333-1336, 1990.
20. **Kuypers FA, Yuan J, Lewis RA, Snyder LM, Kiefer CR, Bunyaratvej A, Fucharoen S, Ma L, Styles L, Jong K and Schrier SL.** Membrane Phospholipid Asymmetry in Human Thalassemia. *Blood* 91: 3044-3051, 1998.

21. **Vogiatzi MG, Macklin EA, Fung EB, Vichinsky E, Olivieri N, Kwiatkowski J, Cohen A, Neufeld E and Giardina PJ.** Prevalence of fractures among the Thalassemia syndromes in North America. *Bone* 38: 571-575, 2006.
22. **Olivieri NF and Brittenham GM.** Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 89: 739-761, 1997.
23. **Aessopos A, Berdoukas V, Tsironi M, Aessopos A, Berdoukas V and Tsironi M.** The heart in transfusion dependent homozygous thalassaemia today - prediction, prevention and management. *European Journal of Haematology* 80: 93-106, 2008.
24. **Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, Romeo MA, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A and Cnaan A.** Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* 89: 1187-1193, 2004.
25. **Modell B, Khan M, Darlison M, Westwood MA, Ingram D and Pennell DJ.** Improved survival of thalassaemia major in the UK and relation to T2* cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson* 10: 42, 2008.
26. **Rund D and Rachmilewitz E.** Advances in the pathophysiology and treatment of thalassemia. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 20: 237-254, 1995.
27. **Rund D and Rachmilewitz E.** New trends in the treatment of beta-thalassemia. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 33: 105-118, 2000.
28. **Neufeld EJ.** Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood* 107: 3436-3441, 2006.
29. **Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Romeo MA, Zhao H and Cnaan A.** Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine- or deferiprone-treated patients with thalassemia major. *Blood* 107: 3733-3737, 2006.
30. **Pennell DJ, Berdoukas V, Karagiorga M, Ladis V, Piga A, Aessopos A, Gotsis ED, Tanner MA, Smith GC, Westwood MA, Wonke B and**

- Galanello R.** Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. *Blood* 107: 3738-3744, 2006.
31. **Cappellini MD, Cohen A, Piga A, Bejaoui M, Perrotta S, Agaoglu L, Aydinok Y, Kattamis A, Kilinc Y, Porter J, Capra M, Galanello R, Fattoum S, Drelichman G, Magnano C, Verissimo M, thanassiou-Metaxa M, Giardina P, Kourakli-Symeonidis A, Janka-Schaub G, Coates T, Vermynen C, Olivieri N, Thuret I, Opitz H, Ressayre-Djaffer C, Marks P and Alberti D.** A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. *Blood* 107: 3455-3462, 2006.
32. **Cohen A, Masera G, Zoumbos N, Uysal Z, Boulet D, Watman N, Loggetto S, Opitz H, Gathmann I and Alberti D.** Effect of Iron Intake on Control of Body Iron in Patients with Thalassemia Major Treated with Deferasirox (Exjade(R), ICL670). *ASH Annual Meeting Abstracts* 106: 822, 2005.
33. **Nisbet-Brown E, Olivieri NF, Giardina PJ, Grady RW, Neufeld EJ, Séchaud R, Krebs-Brown AJ, Anderson JR, Alberti D, Sizer KC and Nathan DG.** Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *The Lancet* 361: 1597-1602, 2003.
34. **Lucarelli G, Andreani M and Angelucci E.** The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Reviews* 16: 81-85, 2002.
35. **Skow LC, Burkhart BA, Johnson FM, Popp RA, Popp DM, Goldberg SZ, Anderson WF, Barnett LB and Lewis SE.** A mouse model for beta-thalassemia. *Cell* 34: 1043-1052, 1983.
36. **Yang B, Kirby S, Lewis J, Detloff PJ, Maeda N and Smithies O.** A mouse model for beta 0-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 11608-11612, 1995.
37. **Whitelaw E, Tsai SF, Hogben P and Orkin SH.** Regulated expression of globin chains and the erythroid transcription factor GATA-1 during erythropoiesis in the developing mouse. *Mol Cell Biol* 10: 6596-6606, 1990.

38. **Papakonstantinou O, Drakonaki E, Maris T, Vasiliadou A, Papadakis A and Gourtsoyiannis N.** MR imaging of spleen in beta-thalassemia major. *Abdominal Imaging* 2006.
39. **Shehee WR, Oliver P and Smithies O.** Lethal Thalassemia After Insertional Disruption of the Mouse Major Adult {beta}-Globin Gene. *PNAS* 90: 3177-3181, 1993.
40. **Lewis J, Yang B, Kim R, Sierakowska H, Kole R, Smithies O and Maeda N.** A Common Human beta Globin Splicing Mutation Modeled in Mice. *Blood* 91: 2152-2156, 1998.
41. **Fuster V, O'Rourke RA, Walsh RA and Poole-Wilson P.** *Hurst's the heart.* New York: McGraw Hill Medical, 2008.
42. **Levick JR.** *An Introduction to cardiovascular physiology.* London: Arnold, 2003.
43. **Nichols WW and O'Rourke MF.** *McDonald's blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles.* London, New York: Oxford University Press, 1998.
44. **Li JK.** *The arterial circulation : physical principles and clinical applications.* New Jersey: Humana Press, 2000.
45. **Burton AC.** Relation of Structure to Function of the Tissues of the Wall of Blood Vessels. *Physiol Rev* 34: 619-642, 1954.
46. **Fung YC.** *Biomechanics: circulation.* New York, Berlin, Heidelberg ...: Springer, 1997.
47. **Chien S.** Biophysical behavior of red cells in suspensions. In: The red blood cell, edited by Surgenor DM. New York: Academic Press, 1975.
48. **Chen S, Eldor A, Barshtein G, Zhang S, Goldfarb A, Rachmilewitz E and Yedgar S.** Enhanced aggregability of red blood cells of beta-thalassemia major patients. *American Journal of Physiology* 270: H1951-H1956, 1996.
49. **Klabunde RE.** *Cardiovascular physiology concepts.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

50. **Burton AC.** On the Physical Equilibrium of Small Blood Vessels. *Am J Physiol* 164: 319-329, 1951.
51. **Porth CM.** *Pathophysiology: concepts of altered health states.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
52. **Safar ME, Blacher J, Mourad JJ and London GM.** Stiffness of Carotid Artery Wall Material and Blood Pressure in Humans : Application to Antihypertensive Therapy and Stroke Prevention. *Stroke* 31: 782-790, 2000.
53. **Dobrin PB.** Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev* 58: 397-460, 1978.
54. **Laurent S, Boutouyrie P and Lacolley P.** Structural and Genetic Bases of Arterial Stiffness. *Hypertension* 45: 1050-1055, 2005.
55. **Van Bortel LM and Spek JJ.** Influence of aging on arterial compliance. *Journal of Human Hypertension* 12: 583-586, 1998.
56. **Gaballa MA, Jacob CT, Raya TE, Liu J, Simon B and Goldman S.** Large Artery Remodeling During Aging : Biaxial Passive and Active Stiffness. *Hypertension* 32: 437-443, 1998.
57. **De Caterina R and Libby P.** *Endothelial Dysfunctions and Vascular Disease.* Malden: Blackwell Futura, 2007.
58. **Malek AM, Alper SL and Izumo S.** Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 282: 2035-2042, 1999.
59. **Féltou M and Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: 985-1002, 2006.
60. **Wu MD and Thiagarajan MD.** Role of the endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annual Review of Medicine* 47: 315-331, 1996.
61. **Michiels C.** Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* 196: 430-443, 2003.

62. **Dandona P.** Endothelium, inflammation, and diabetes. *Current Diabetes Reports* 2: 311-315, 2002.
63. **Scott-Burden T and Vanhoutte PM.** The Endothelium as a Regulator of Vascular Smooth Muscle Proliferation. *Circulation* 87: V51-V55, 1993.
64. **Furchgott RF and Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
65. **Stamler JS, Singel DJ and Loscalzo J.** Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms. *Science* 258: 1898-1902, 1992.
66. **Behrendt D and Ganz P.** Endothelial function: From vascular biology to clinical applications. *The American Journal of Cardiology* 90: L40-L48, 2002.
67. **Mombouli JV and Vanhoutte PM.** Endothelial Dysfunction: From Physiology to Therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 31: 61-74, 1999.
68. **Feletou M and Vanhoutte PM.** Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Where Are We Now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1215-1225, 2006.
69. **Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ and Weston AH.** K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269-272, 1998.
70. **Quilley J and McGiff JC.** Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid? *Trends in Pharmacological Sciences* 21: 121-124, 2000.
71. **Shimokawa H and Morikawa K.** Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39: 725-732, 2005.
72. **Edwards G, Feletou M, Gardener MJ, Thollon C, Vanhoutte PM and Weston AH.** Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries. *Br J Pharmacol* 128: 1788-1794, 1999.

73. **Koller A.** Flow-Dependent Remodeling of Small Arteries: The Stimuli and the Sensors Are (Still) in Question. *Circ Res* 99: 6-9, 2006.
74. **Gibbons GH and Dzau VJ.** The Emerging Concept of Vascular Remodeling. *N Engl J Med* 330: 1431-1438, 1994.
75. **Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R and Kolettis GJ.** Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 316: 1371-1375, 1987.
76. **Pinet F, Babuty D, Carrier L, Duperray A, Grynberg A, Loirand G and Samuel J-L.** *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 2002.
77. **Forstermann U and Munzel T.** Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* 113: 1708-1714, 2006.
78. **Sydow K and Mnnzel T.** ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis Supplements* 4: 41-51, 2003.
79. **Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE and Harrison DG.** Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111: 1201-1209, 2003.
80. **Li H, Wallerath T, Mnnzel T and Forstermann U.** Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* 7: 149-164, 2002.
81. **Harrison DG.** Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 108: 2153-2157, 1997.
82. **Deanfield JE, Halcox JP and Rabelink TJ.** Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 115: 1285-1295, 2007.
83. **Widlansky ME, Gokce N, Keaney Jr JF and Vita JA.** The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 42: 1149-1160, 2003.

84. **Hill JA and Olson EN.** Cardiac Plasticity. *N Engl J Med* 358: 1370-1380, 2008.
85. **Cohn JN, Ferrari R and Sharpe N.** Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 35: 569-582, 2000.
86. **Swynghedauw B.** Molecular Mechanisms of Myocardial Remodeling. *Physiol Rev* 79: 215-262, 1999.
87. **Hunter JJ and Chien KR.** Signaling Pathways for Cardiac Hypertrophy and Failure. *N Engl J Med* 341: 1276-1283, 1999.
88. **Lorell BH and Carabello BA.** Left Ventricular Hypertrophy : Pathogenesis, Detection, and Prognosis. *Circulation* 102: 470-479, 2000.
89. **Jessup M and Brozena S.** Heart Failure. *N Engl J Med* 348: 2007-2018, 2003.
90. **Camelliti P, Borg TK and Kohl P.** Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65: 40-51, 2005.
91. **Sadoshima J and Izumo S.** The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annual Review of Physiology* 59: 551-571, 1997.
92. **Ritter O, Hack S, Schuh K, Rothlein N, Perrot A, Osterziel KJ, Schulte HD and Neyses L.** Calcineurin in Human Heart Hypertrophy. *Circulation* 105: 2265-2269, 2002.
93. **Olson EN.** A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med* 10: 467-474, 2004.
94. **Diwan A and Dorn GW, II.** Decompensation of Cardiac Hypertrophy: Cellular Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Physiology* 22: 56-64, 2007.
95. **Pereira AA and Sarnak MJ.** Anemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Kidney Int* 64: S32-S39, 2003.

96. **Rao M and Pereira BJG.** Optimal anemia management reduces cardiovascular morbidity, mortality, and costs in chronic kidney disease. *Kidney Int* 68: 1432-1438, 2005.
97. **Metivier F, Marchais SJ, Guerin AP, Pannier B and London GM.** Pathophysiology of anaemia: focus on the heart and blood vessels. *Nephrol Dial Transplant* 15: 14-18, 2000.
98. **Levin A.** Anemia and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease populations: A review of the current state of knowledge. *Kidney Int* 61: S35-S38, 2002.
99. **Fowler NO and Holmes JC.** Blood viscosity and cardiac output in acute experimental anemia. *J Appl Physiol* 39: 453-456, 1975.
100. **Spotswood TC, Kirberger RM, Koma LM, Thompson PN and Miller DB.** Changes in echocardiographic variables of left ventricular size and function in a model of canine normovolemic anemia. *Vet Radiol Ultrasound* 47: 358-365, 2006.
101. **VATNER SF, HIGGINS CB, FRANKLIN DEAN and MCKOWN DP.** Regional Circulatory Adjustments to Moderate and Severe Chronic Anemia in Conscious Dogs at Rest and during Exercise. *Circ Res* 30: 731-740, 1972.
102. **Varat MA, Adolph RJ and Fowler NO.** Cardiovascular effects of anemia. *Am Heart J* 83: 415-426, 1972.
103. **Hebert PC, Van der Linden P, Biro G and Hu LQ.** Physiologic aspects of anemia. *Critical Care Clinics* 20: 187-212, 2004.
104. **Olivetti G, Quaini F, Lagrasta C, Ricci R, Tiberti G, Capasso JM and Anversa P.** Myocyte cellular hypertrophy and hyperplasia contribute to ventricular wall remodeling in anemia-induced cardiac hypertrophy in rats. *American Journal of Pathology* 141: 227-239, 1992.
105. **Rakusan K, Cicutti N and Kolar F.** Effect of anemia on cardiac function, microvascular structure, and capillary hematocrit in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H1407-H1414, 2001.

106. **Schunkert H and Hense HW.** A heart price to pay for anaemia. *Nephrol Dial Transplant* 16: 445-448, 2001.
107. **Bahl VK, Malhotra OP, Kumar D, Agarwal R, Goswami KC, Bajaj R and Shrivastava S.** Noninvasive assessment of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic severe anemia: A combined M-mode, two-dimensional, and Doppler echocardiographic study. *American Heart Journal* 124: 1516-1523, 1992.
108. **Florenzano F, Diaz G, Regonesi C and Escobar E.** Left ventricular function in chronic anemia: Evidence of noncatecholamine positive inotropic factor in the serum. *The American Journal of Cardiology* 54: 638-645, 1984.
109. **Naito Y, Tsujino T, Matsumoto M, Sakoda T, Ohyanagi M and Masuyama T.** Adaptive response of the heart to long-term anemia induced by iron deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H585-H593, 2009.
110. **Anand IS.** Heart failure and anemia: mechanisms and pathophysiology. *Heart Failure Reviews* 13: 379-386, 2008.
111. **Panigrahi I and Agarwal S.** Thromboembolic complications in [beta]-thalassemia: Beyond the horizon. *Thrombosis Research* 120: 783-789, 2007.
112. **Borgna-Pignatti C, Carnelli V, Caruso V, Dore F, De Mattia D, Di Palma A, Di Gregorio F, Romeo MA, Longhi R, Mangiagli A, Melevendi C, Pizzarelli G and Musumeci S.** Thromboembolic events in beta thalassemia major: an Italian multicenter study. *Acta Haematologica* 99: 76-79, 1998.
113. **Eldor A and Rachmilewitz EA.** The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood* 99: 36-43, 2002.
114. **Eldor A, Krausz Y, Atlan H, Snyder D, Goldfarb A, Hy-Am E, Rachmilewitz EA, Kotze HF and Heyns AD.** Platelet survival in patients with beta-thalassemia. *American Journal of Hematology* 32: 94-99, 1989.
115. **Winichagoon P, Fucharoen S and Wasi P.** Increased circulating platelet aggregates in thalassaemia. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* 12: 556-560, 1981.

116. **Eldor A, Lellouche F, Goldfarb A, Rachmilewitz EA and Maclouf J.** In vivo platelet activation in beta-thalassemia major reflected by increased platelet-thromboxane urinary metabolites. *Blood* 77: 1749-1753, 1991.
117. **FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK and Brash AR.** Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 310: 1065-1068, 1984.
118. **Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA and FitzGerald GA.** Role of Prostacyclin in the Cardiovascular Response to Thromboxane A₂. *Science* 296: 539-541, 2002.
119. **Shinar E and Rachmilewitz EA.** Haemoglobinopathies and red cell membrane function. *Bailliere's Clinical Haematology* 6: 357-369, 1993.
120. **Hovav T, Goldfarb A, Artmann G, Yedgar S and Barshtein G.** Enhanced adherence of beta-thalassaemic erythrocytes to endothelial cells. *British Journal of Haematology* 106: 178-181, 1999.
121. **Kaul DK, Nagel RL, Chen D and Tsai HM.** Sickle erythrocyte-endothelial interactions in microcirculation: the role of von Willebrand factor and implications for vasoocclusion. *Blood* 81: 2429-2438, 1993.
122. **Butthep P, Rummavas S, Wisedpanichkij R, Jindadamrongwech S, Fucharoen S and Bunyaratvej A.** Increased circulating activated endothelial cells, vascular endothelial growth factor, and tumor necrosis factor in thalassemia. *Am J Hematol* 70: 100-106, 2002.
123. **Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Kyriakou ES, Liapi D, Kourelis TV, Passam F and Papadakis A.** Activated peripheral blood and endothelial cells in thalassemia patients. *Annals of Hematology* 80: 577-583, 2001.
124. **Cheung YF, Chan GC and Ha SY.** Arterial stiffness and endothelial function in patients with beta-thalassemia major. *Circulation* 106: 2561-2566, 2002.
125. **Hahalis G, Kremastinos DT, Terzis G, Kalogeropoulos AP, Chrysanthopoulou A, Karakantza M, Kourakli A, Adamopoulos S, Tselepis AD, Grapsas N, Siablis D, Zoumbos NC and Alexopoulos D.** Global vasomotor dysfunction and accelerated vascular aging in [beta]-thalassemia major. *Atherosclerosis* 198: 448-457, 2008.

126. **Stakos DA, Tavridou A, Margaritis D, Tziakas DN, Kotsianidis I, Chalikias GK, Tsatalas K, Bourikas G, Manolopoulos VG and Boudoulas H.** Oxidised low-density lipoprotein and arterial function in beta-thalassemia major. *Eur J Haematol* 82: 477-483, 2009.
127. **Aggeli CJ, Antoniadis C, Cosma C, Chrysohoou C, Tousoulis D, Ladis V, Karageorga M, Pitsavos CE and Stefanadis C.** Endothelial dysfunction and inflammatory process in transfusion-dependent patients with beta-thalassemia major. *International Journal of Cardiology* 105: 80-84, 2005.
128. **Gedikli O, Altinbas A, Orucoglu A, Dogan A, Ozaydin M, Aslan SM, Acar G and Canatan D.** Elastic properties of the ascending aorta in patients with beta-thalassemia major. *Echocardiography* 24: 830-836, 2007.
129. **Aessopos A, Farmakis D, Deftereos S, Tsironi M, Tassiopoulos S, Moysakakis I and Karagiorga M.** Thalassemia Heart Disease: A Comparative Evaluation of Thalassemia Major and Thalassemia Intermedia. *Chest* 127: 1523-1530, 2005.
130. **Hahalis G, Alexopoulos D, Kremastinos DT and Zoumbos NC.** Heart failure in beta-thalassemia syndromes: A decade of progress. *The American Journal of Medicine* 118: 957-967, 2005.
131. **Aessopos A, Farmakis D, Hatziliami A, Fragodimitri C, Karabatsos F, Joussef J, Mitilineou E, Diamanti-Kandaraki E, Meletis J, Karagiorga M, Aessopos A, Farmakis D, Hatziliami A, Fragodimitri C, Karabatsos F, Joussef J, Mitilineou E, Diamanti-Kandaraki E, Meletis J and Karagiorga M.** Cardiac status in well-treated patients with thalassemia major. *European Journal of Haematology* 73: 359-366, 2004.
132. **Bosi G, Crepaz R, Gamberini MR, Fortini M, Scarcia S, Bonsante E, Pitscheider W and Vaccari M.** Left ventricular remodelling, and systolic and diastolic function in young adults with {beta} thalassaemia major: a Doppler echocardiographic assessment and correlation with haematological data. *Heart* 89: 762-766, 2003.
133. **Hahalis G, Manolis AS, Apostolopoulos D, Alexopoulos D, Vagenakis AG and Zoumbos NC.** Right ventricular cardiomyopathy in [beta]-thalassaemia major. *European Heart Journal* 23: 147-156, 2002.

134. **Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Piga A, Di Gregorio F, Gamberini MR, Sabato V, Melevendi C, Cappellini MD and Verlatto G.** Survival and disease complications in thalassemia major. *Ann NY Acad Sci* 850: 227-231, 1998.
135. **Aessopos A and Farmakis D.** Pulmonary hypertension in beta-thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 1054: 342-349, 2005.
136. **Kremastinos DT, Tiniakos G, Theodorakis GN, Katritsis DG and Toutouzas PK.** Myocarditis in beta-Thalassemia Major : A Cause of Heart Failure. *Circulation* 91: 66-71, 1995.
137. **Blumgart HL and Altschule MD.** Clinical significance of cardiac and respiratory adjustments in chronic anemia. *Blood* 3: 329-348, 1948.
138. **Ferrara M, Matarese SMR, Borrelli B, Perrotta A, Simeone G, Greco N, Iarussi D and Esposito L.** Cardiac Involvement in Beta-Thalassemia Major and Beta-Thalassemia Intermedia. *Hemoglobin* 28: 123-129, 2004.
139. **Kremastinos DT, Tsiapras DP, Tsetsos GA, Rentoukas EI, Vretou HP and Toutouzas PK.** Left ventricular diastolic Doppler characteristics in beta-thalassemia major. *Circulation* 88: 1127-1135, 1993.
140. **Vaccari M, Crepaz R, Fortini M, Gamberini MR, Scarcia S, Pitscheider W and Bosi G.** Left Ventricular Remodeling, Systolic Function, and Diastolic Function in Young Adults With {beta}-Thalassemia Intermedia : A Doppler Echocardiography Study. *Chest* 121: 506-512, 2002.
141. **Wood JC, Tyszka JM, Carson S, Nelson MD and Coates TD.** Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 103: 1934-1936, 2004.
142. **Origa R, Barella S, Argiolas GM, Bina P, Agus A and Galanello R.** No evidence of cardiac iron in 20 never- or minimally-transfused patients with thalassemia intermedia. *Haematologica* 93: 1095-1096, 2008.
143. **Borgna PC, Carnelli V, Caruso V, Dore F, De Mattia D, Di Palma A, Di Gregorio F, Romeo MA, Longhi R, Mangiagli A, Melevendi C, Pizzarelli G and Musumeci S.** Thromboembolic events in beta thalassemia major: an Italian multicenter study. *Acta Haematologica* 99: 76-79, 1998.

144. **Gillis S, Cappellini MD, Goldfarb A, Ciceri L, Fiorelli G and Rachmilewitz EA.** Pulmonary thromboembolism in thalassemia intermedia patients. *Haematologica* 84: 959-960, 1999.
145. **Schrier SL, Rachmilewitz E and Mohandas N.** Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. *Blood* 74: 2194-2202, 1989.
146. **Krege JH, Hodgkin JB, Hagan JR and Smithies O.** A Noninvasive Computerized Tail-Cuff System for Measuring Blood Pressure in Mice. *Hypertension* 25: 1111-1115, 1995.
147. **Zhou YQ, Foster FS, Nieman BJ, Davidson L, Chen XJ and Henkelman RM.** Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging. *Physiol Genomics* 18: 232-244, 2004.
148. **Pourcelot L.** Indications of Doppler's ultrasonography in the study of peripheral vessels. *Revue du Praticien* 25: 4671-4680, 1975.
149. **Loudon C and Tordesillas A.** The use of the dimensionless Womersley number to characterize the unsteady nature of internal flow. *Journal of Theoretical Biology* 191: 63-78, 1998.
150. **Doursout MF, Wouters P, Kashimoto S, Hartley CJ, Rabinovitz R and Chelly JE.** Measurement of cardiac function in conscious rats. *Ultrasound in Medicine & Biology* 27: 195-202, 2001.
151. **Cheung YF, Ha SY and Chan GCF.** Ventriculo-vascular interactions in patients with {beta} thalassaemia major. *Heart* 91: 769-773, 2005.
152. **Janssen BJA, De Celle T, Debets JJM, Brouns AE, Callahan MF and Smith TL.** Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1618-H1624, 2004.
153. **Yang XP, Liu YH, Rhaleb NE, Kurihara N, Kim HE and Carretero OA.** Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* 277: H1967-H1974, 1999.

154. **Milnor WR.** *Hemodynamics*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989.
155. **Bude RO and Rubin JM.** Effect of Downstream Cross-sectional Area of an Arterial Bed on the Resistive Index and the Early Systolic Acceleration. *Radiology* 212: 732-738, 1999.
156. **Shiga T, Maeda N, Kon K, Shiga T, Maeda N and Kon K.** Erythrocyte rheology. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 10: 9-48, 1990.
157. **Shinar E, Shalev O, Rachmilewitz EA and Schrier SL.** Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe beta-thalassemia. *Blood* 70: 158-164, 1987.
158. **Bude RO and Rubin JM.** Relationship between the Resistive Index and Vascular Compliance and Resistance. *Radiology* 211: 411-417, 1999.
159. **Mackenzie IS, Wilkinson IB and Cockcroft JR.** Assessment of arterial stiffness in clinical practice. *QJM* 95: 67-74, 2002.
160. **Khiri AW and Parker KH.** Measurements of wave speed and reflected waves in elastic tubes and bifurcations. *Journal of Biomechanics* 35: 775-783, 2002.
161. **Sonin AA.** A generalization of the {Pi}-theorem and dimensional analysis. *PNAS* 101: 8525-8526, 2004.
162. **Molino P, Cerutti C, Julien C, Cuisinaud G, Gustin MP and Paultre C.** Beat-to-beat estimation of windkessel model parameters in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: H171-H177, 1998.
163. **Westerhof N and Elzinga G.** Normalized input impedance and arterial decay time over heart period are independent of animal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 261: R126-R133, 1991.
164. **Modell B, Khan M and Darlison M.** Survival in beta-thalassaemia major in the UK: data from the UK Thalassaemia Register. *Lancet* 355: 2051-2052, 2000.

165. **Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS and Sessa WC.** Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101: 731-736, 1998.
166. **Stakos DA, Margaritis D, Tziakas DN, Kotsianidis I, Chalikias GK, Tsatalas K, Bourikas G and Boudoulas H.** Cardiovascular involvement in patients with [beta]-thalassemia major without cardiac iron overload. *International Journal of Cardiology* 134: 207-211, 2009.
167. **Stoyanova E, Trudel M, Felfly H, Garcia D and Cloutier G.** Characterization of circulatory disorders in beta-thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiol Genomics* 29: 84-90, 2007.
168. **Schiffrin EL and Hayoz D.** How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *Journal of Hypertension* 15: 571-584, 1997.
169. **Morris CR.** Mechanisms of Vasculopathy in Sickle Cell Disease and Thalassemia. *Hematology* 2008: 177-185, 2008.
170. **Gladwin MT, Lancaster JR, Freeman BA and Schechter AN.** Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* 9: 496-500, 2003.
171. **Minnecci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, Schechter AN, Natanson C, Gladwin MT and Solomon SB.** Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 115: 3409-3417, 2005.
172. **Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr. and Gladwin MT.** Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension, and Mortality in Sickle Cell Disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 294: 81-90, 2005.
173. **Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S, Haj Khelil A, Feki M, Amri F, Selmi H, Bejaoui M and Miled A.** Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clinica Chimica Acta* 338: 79-86, 2003.

174. **Gladwin MT and Kato GJ.** Cardiopulmonary Complications of Sickle Cell Disease: Role of Nitric Oxide and Hemolytic Anemia. *Hematology* 2005: 51-57, 2005.
175. **Frei AC, Guo Y, Jones DW, Pritchard KA, Jr., Fagan KA, Hogg N and Wandersee NJ.** Vascular dysfunction in a murine model of severe hemolysis. *Blood* 112: 398-405, 2008.
176. **Rother RP, Bell L, Hillmen P and Gladwin MT.** The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin: A Novel Mechanism of Human Disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 293: 1653-1662, 2005.
177. **Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA, Bivalacqua TJ, Mancini EA, Diwan BA, Schimel DM, Cochard AE, Wang X, Schechter AN, Noguchi CT and Gladwin MT.** Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood* 109: 3088-3098, 2007.
178. **Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH and Zweier JL.** Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 6770-6774, 1996.
179. **Wood KC, Hsu LL and Gladwin MT.** Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radical Biology and Medicine* 44: 1506-1528, 2008.
180. **Cheung YF, Chow PC, Chan GC and Ha SY.** Carotid intima-media thickness is increased and related to arterial stiffening in patients with beta-thalassaemia major. *Br J Haematol* 135: 732-734, 2006.
181. **Ulger Z, Aydinok Y, Gurses D, Levent E and Ozyurek AR.** Stiffness of the abdominal aorta in beta-thalassemia major patients related with body iron load. *J Pediatr Hematol Oncol* 28: 647-652, 2006.
182. **Day SM, Duquaine D, Mundada LV, Menon RG, Khan BV, Rajagopalan S and Fay WP.** Chronic Iron Administration Increases Vascular Oxidative Stress and Accelerates Arterial Thrombosis. *Circulation* 107: 2601-2606, 2003.

183. **Faller DV.** Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 74-84, 1999.
184. **Fortuno A, Jose GS, Moreno MU, Diez J and Zalba G.** Oxidative stress and vascular remodelling. *Experimental Physiology* 90: 457-462, 2005.
185. **Engle MA, Ehlers KH, O'Loughlin JE, Giardina PJ and Hilgartner MW.** Beta thalassemia and heart disease: three decades of gradual progress. *Transactions of the American Clinical & Climatological Association* 96: 24-33, 1984.
186. **Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, Wayne AS, Liu PP, McGee A, Martin M, Koren G and Cohen AR.** Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *New England Journal of Medicine* 331: 574-578, 1994.
187. **Schrier SL and Angelucci E.** New strategies in the treatment of the thalassemias. *Annual Review of Medicine* 56: 157-171, 2005.
188. **Rivella S.** Ineffective erythropoiesis and thalassemias. *Curr Opin Hematol* 16: 187-194, 2009.
189. **Cogliandro T, Derchi G, Mancuso L, Mayer MC, Pannone B, Pepe A, Pili M, Bina P, Cianciulli P, De S, V and Maggio A.** Guideline recommendations for heart complications in thalassemia major. *Journal of Cardiovascular Medicine* 9: 515-525, 2008.
190. **Cunningham MJ, Macklin EA, Neufeld EJ, Cohen AR and Thalassaemia Clinical Research Network.** Complications of {beta}-thalassaemia major in North America. *Blood* 104: 34-39, 2004.
191. **Brili SV, Tzonou AI, Castelanos SS, Aggeli CJ, Tentolouris CA, Pitsavos CE and Toutouzas PK.** The effect of iron overload in the hearts of patients with beta-thalassemia. *Clinical Cardiology* 20: 541-546, 1997.
192. **Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A, Liu Y, Amariglio N, Rechavi G, Rachmilewitz EA, Breuer W, Cabantchik ZI, Wrighting DM, Andrews NC, de Sousa M, Giardina PJ, Grady RW and Rivella S.** Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood* 109: 5027-5035, 2007.

193. **Ciavatta DJ, Ryan TM, Farmer SC and Townes TM.** Mouse model of human beta zero thalassemia: targeted deletion of the mouse beta maj- and beta min-globin genes in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9259-9263, 1995.
194. **Moi P and Sadelain M.** Towards the genetic treatment of {beta}-thalassemia: new disease models, new vectors, new cells. *Haematologica* 93: 325-330, 2008.
195. **Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J and Weyman A.** Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58: 1072-1083, 1978.
196. **Wandt B, Bojő L, Tolagen K and Wranne B.** Echocardiographic assessment of ejection fraction in left ventricular hypertrophy. *Heart* 82: 192-198, 1999.
197. **Pollick C, Hale SL and Kloner RA.** Echocardiographic and cardiac doppler assessment of mice. *Journal of the American Society of Echocardiography* 8: 602-610, 1995.
198. **Felfly H and Trudel M.** Long-term Correction of [beta]-Thalassemia With Minimal Cellular Requirement and Transplantation Modalities. *Mol Ther* 15: 1701-1709, 2007.
199. **Van Wyck DB, Tancer ME and Popp RA.** Iron homeostasis in beta-thalassemic mice. *Blood* 70: 1462-1465, 1987.
200. **Roy SB, Bhatia ML, Mathur VS and Virmani S.** Hemodynamic Effects of Chronic Severe Anemia. *Circulation* 28: 346-356, 1963.
201. **Aessopos A, Deftereos S, Farmakis D, Corovesis C, Tassiopoulos S, Tsironi M, Georgonikou D and Moyssakis J.** Cardiovascular adaptation to chronic anemia in the elderly: an echocardiographic study. *Clin Invest Med* 27: 265-273, 2004.
202. **Bowens C, Jr., Spahn DR, Frasco PE, Smith LR, McRae RL and Leone BJ.** Hemodilution induces stable changes in global cardiovascular and regional myocardial function. *Anesth Analg* 76: 1027-1032, 1993.

203. **Iimoto DS, Covell JW and Harper E.** Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circ Res* 63: 399-408, 1988.
204. **Telfer PT, Warburton F, Christou S, Hadjigavriel M, Sitarou M, Kolnagou A and Angastiniotis M.** Improved survival in thalassemia major patients on switching from desferrioxamine to combined chelation therapy with desferrioxamine and deferiprone. *Haematologica* 2009.
205. **Lombardo T, Tamburino C, Bartoloni G, Morrone ML, Frontini V, Italia F, Cardaro S, Privitera A and Calvi V.** Cardiac iron overload in thalassemic patients: An endomyocardial biopsy study. *Annals of Hematology* 71: 135-141, 1995.
206. **Tanner MA, Galanello R, Dessi C, Westwood MA, Smith GC, Nair SV, Anderson LJ, Walker JM and Pennell DJ.** Myocardial iron loading in patients with thalassemia major on deferoxamine chelation. *J Cardiovasc Magn Reson* 8: 543-547, 2006.
207. **Jensen PD.** Evaluation of iron overload. *Br J Haematol* 124: 697-711, 2004.
208. **Anderson LJ, Holden S, Davis B, Prescott E, Charrier CC, Bunce NH, Firmin DN, Wonke B, Porter J, Walker JM and Pennell DJ.** Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload. *European Heart Journal* 22: 2171-2179, 2001.
209. **Deborah CS, Geukes-Foppen M, Barry K, Braunstein J, Kalish LA, Neufeld EJ and Powell AJ.** Practical implications of liver and heart iron load assessment by T2*-MRI in children and adults with transfusion-dependent anemias. *Am J Hematol* 83: 781-783, 2008.
210. **Papakonstantinou O, Alexopoulou E, Economopoulos N, Benekos O, Kattamis A, Kostaridou S, Ladis V, Efstathopoulos E, Gouliamos A and Kelekis NL.** Assessment of iron distribution between liver, spleen, pancreas, bone marrow, and myocardium by means of R2 relaxometry with MRI in patients with beta-thalassemia major. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 29: 853-859, 2009.
211. **Mavrogeni SI, Markussis V, Kaklamanis L, Tsiapras D, Paraskevaidis I, Karavolias G, Karagiorga M, Douskou M, Cokkinos DV and Kremastinos DT.** A comparison of magnetic resonance imaging and cardiac

- biopsy in the evaluation of heart iron overload in patients with beta-thalassemia major. *Eur J Haematol* 75: 241-247, 2005.
212. **Essop MF.** Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *The Journal of Physiology* 584: 715-726, 2007.
213. **Seddon M, Looi YH and Shah AM.** Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93: 903-907, 2007.
214. **Kanavaki I, Makrythanasis P, Lazaropoulou C, Tsironi M, Kattamis A, Rombos I and Papassotiriou I.** Soluble endothelial adhesion molecules and inflammation markers in patients with [beta]-thalassemia intermedia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 43: 230-234, 2011.
215. **Taher AT, Otrrock ZK, Uthman I and Cappellini MD.** Thalassemia and hypercoagulability. *Blood Reviews* 22: 283-292, 2008.
216. **Kato GJ, Gladwin MT and Steinberg MH.** Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews* 21: 37-47, 2007.
217. **Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, III, Schechter AN and Gladwin MT.** Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine* 8: 1383-1389, 2002.
218. **Fuchimoto Y, Huang CA, Gleit ZL, Kitamura H, Griesemer A, Melendy E, Scheier-Dolberg R, White-Scharf ME and Sachs DH.** Mixed chimerism using a nonmyelosuppressive regimen in miniature swine. *Transplant Proc* 33: 118-119, 2001.
219. **Jarrett DG, Sedlak RG, Dickerson WE and Reeves GI.** Medical treatment of radiation injuries--Current US status. *Radiation Measurements* 42: 1063-1074, 2007.
220. **Schultz-Hector S and Trott KR.** Radiation-induced cardiovascular diseases: Is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data? *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 67: 10-18, 2007.

221. **Adams MJ, Hardenbergh PH, Constine LS and Lipshultz SE.** Radiation-associated cardiovascular disease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 45: 55-75, 2003.
222. **Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A and Mabuchi K.** Studies of Mortality of Atomic Bomb Survivors. Report 13: Solid Cancer and Noncancer Disease Mortality: 1950–1997. *Radiation Research* 160: 381-407, 2003.
223. **Prchal JT.** Production of erythrocytes. In: Williams hematology, edited by Lichtman M.A., Beutler E., Coller B.S., Kipps T.J., Seligsohn U., Kaushansky K and Prchal JT. New York: McGraw Hill, Medical publishing division, 2006, p. 393-403.
224. **Trudel M, De Paepe ME, Chretien N, Saadane N, Jacmain J, Sorette M, Hoang T and Beuzard Y.** Sick cell disease of transgenic SAD mice. *Blood* 84: 3189-3197, 1994.
225. **Evens AM, Mehta J and Gordon LI.** Rust and corrosion in hematopoietic stem cell transplantation: the problem of iron and oxidative stress. *Bone Marrow Transplant* 34: 561-571, 2004.
226. **Gaugler MH.** A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *Br J Radiol Supplement_27*: 100-105, 2005.
227. **Denham JW and Hauer-Jensen M.** The radiotherapeutic injury - a complex 'wound'. *Radiotherapy and Oncology* 63: 129-145, 2002.
228. **Roth NM, Sontag MR and Kiani MF.** Early Effects of Ionizing Radiation on the Microvascular Networks in Normal Tissue. *Radiation Research* 151: 270-277, 1999.
229. **Rubin P and Casarett GW.** Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer* 22: 767-778, 1968.
230. **Lauck S.** Endothelial Alkaline Phosphatase Activity Loss as an Early Stage in the Development of Radiation-Induced Heart Disease in Rats. *Radiation Research* 110: 118-128, 1987.

231. **Menendez JC, Casanova D, Amado JA, Salas E, Fernandez F, Perez de la Lastra L and Berrazueta JR.** Effects of radiation on endothelial function. *International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics* 41: 905-913, 1998.
232. **Qi F, Sugihara T, Hattori Y, Yamamoto Y, Kanno M and Abe K.** Functional and morphological damage of endothelium in rabbit ear artery following irradiation with cobalt60. *Br J Pharmacol* 123: 653-660, 1998.
233. **Sugihara T, Hattori Y, Yamamoto Y, Qi F, Ichikawa R, Sato A, Liu MY, Abe K and Kanno M.** Preferential Impairment of Nitric Oxide-Mediated Endothelium-Dependent Relaxation in Human Cervical Arteries After Irradiation. *Circulation* 100: 635-641, 1999.
234. **Brandes RP, Kim Dy, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Godecke A, Mulsch A and Busse R.** Increased Nitrovasodilator Sensitivity in Endothelial Nitric Oxide Synthase Knockout Mice : Role of Soluble Guanylyl Cyclase. *Hypertension* 35: 231-236, 2000.
235. **Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ and Vichinsky E.** Thalassemia. *Hematology* 2004: 14-34, 2004.
236. **Murakami Y, Kinoshita T, Maeda Y, Nakano T, Kosaka H and Takeda J.** Different Roles of Glycosylphosphatidylinositol in Various Hematopoietic Cells as Revealed by a Mouse Model of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Blood* 94: 2963-2970, 1999.
237. **James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, naceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N and Vainchenker W.** A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144-1148, 2005.
238. **Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS and Frenette PS.** Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 3047-3051, 2002.
239. **Wood KC, Hebbel RP and Granger DN.** Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1608-H1614, 2004.

240. **Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I and Sadelain M.** A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta - globin gene transfer. *Blood* 101: 2932-2939, 2003.
241. **Stone HB, Coleman CN, Anscher MS and McBride WH.** Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The Lancet Oncology* 4: 529-536, 2003.
242. **Milliat F, François A, Tamarat R and Benderitter M.** Rôle de l'endothélium dans les dommages radio-induits aux tissus sains. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* 57: 139-148, 2008.
243. **Fajardo LF.** The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta Oncol* 44: 13-22, 2005.
244. **Yeung TK, Lauk S, Simmonds RH, Hopewell JW and Trott KR.** Morphological and Functional Changes in the Rat Heart after X Irradiation: Strain Differences. *Radiation Research* 119: 489-499, 1989.
245. **Wong CS and Van der Kogel AJ.** Mechanisms of radiation injury to the central nervous system: implications for neuroprotection. *Molecular Interventions* 4: 273-284, 2004.
246. **Dore F, Bonfigli S, Gaviano E, Pardini S, Cianciulli P, Papa G and Longinotti M.** Serum erythropoietin levels in thalassemia intermedia. *Annals of Hematology* 67: 183-186, 1993.
247. **Nisli G, Kavakli K, Aydinok Y, Oztop S and Cetingul N.** Serum Erythropoietin Levels in Patients with Beta Thalassemia Major and Intermedia. *Pediatric Hematology-Oncology* 14: 161-167, 1997.
248. **Shitrit D, Tamary H, Koren A, Levin C, Bargil-Shitrit A, Sulkes J and Kramer MR.** Correlation of vascular endothelial growth factor with the severity of thalassemia intermedia. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 19: 2008.
249. **van der Meer P, Voors AA, Lipsic E, van Gilst WH and van Veldhuisen DJ.** Erythropoietin in cardiovascular diseases. *European Heart Journal* 25: 285-291, 2004.

250. **Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, Law PY and Hebbel RP.** VEGF Prevents Apoptosis of Human Microvascular Endothelial Cells via Opposing Effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK Signaling. *Experimental Cell Research* 247: 495-504, 1999.

251. **Bates DO and Jones ROP.** The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *International Journal of Lower Extremity Wounds* 2: 107-120, 2003.

252. **Bussink J, Kaanders JHAM and Van der Kogel AJ.** Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiotherapy and Oncology* 67: 3-15, 2003.

253. **Harrison L and Blackwell K.** Hypoxia and Anemia: Factors in Decreased Sensitivity to Radiation Therapy and Chemotherapy? *Oncologist* 9: 31-40, 2004.

254. **Littlewood TJ.** The impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer. *Seminars in Oncology* 28: 49-53, 2001.

255. **Chakraborty D and Bhattacharyya M.** Antioxidant defense status of red blood cells of patients with [beta]-thalassemia and E[beta]-thalassemia. *Clinica Chimica Acta* 305: 123-129, 2001.

256. **Advani R, Sorenson S, Shinar E, Lande W, Rachmilewitz E and Schrier SL.** Characterization and comparison of the red blood cell membrane damage in severe human alpha- and beta-thalassemia. *Blood* 79: 1058-1063, 1992.

257. **Zwaal RFA and Schroit AJ.** Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* 89: 1121-1132, 1997.

258. **Manodori AB, Barabino GA, Lubin BH and Kuypers FA.** Adherence of phosphatidylserine-exposing erythrocytes to endothelial matrix thrombospondin. *Blood* 95: 1293-1300, 2000.

259. **Cappellini MD, Robbiolo L, Bottasso BM, Coppola R, Fiorelli G and Mannucci AP.** Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia. *Br J Haematol* 111: 467-473, 2000.

260. **Michaeli J, Mittelman M, Grisar D, Rachmilewitz EA, Michaeli J, Mittelman M, Grisar D and Rachmilewitz EA.** Thromboembolic complications in beta thalassemia major. *Acta Haematologica* 87: 71-74, 1992.
261. **Senanayake M and Lamabadusuriya S.** Cerebral thrombosis in beta-thalassaemia major. *Indian Journal of Pediatrics* 68: 1081-1082, 2001.
262. **Ataga KI, Cappellini MD and Rachmilewitz EA.** Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability. *Br J Haematol* 139: 3-13, 2007.
263. **Quarmby S, Kumar P and Kumar S.** Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions. *Int J Cancer* 82: 385-395, 1999.
264. **Aessopos A, Kati M and Farmakis D.** Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology. *Haematologica* 92: 658-665, 2007.
265. **Magri D, Sciomer S, Fedele F, Gualdi G, Casciani E, Pugliese P, Losardo A, Ferrazza G, Pasquazzi E, Schifano E, Mussino E, Quaglione R, Piccirillo G, Magri D, Sciomer S, Fedele F, Gualdi G, Casciani E, Pugliese P, Losardo A, Ferrazza G, Pasquazzi E, Schifano E, Mussino E, Quaglione R and Piccirillo G.** Early impairment of myocardial function in young patients with beta-thalassemia major. *European Journal of Haematology* 80: 515-522, 2008.
266. **Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Otto-Duessel M, Aguilar M, Nelson MD, Moats R and Coates TD.** Physiology and pathophysiology of iron cardiomyopathy in thalassemia. *Ann NY Acad Sci* 1054: 386-395, 2005.
267. **Kremastinos DT, Tsetsos GA, Tsiapras DP, Karavolias GK, Ladis VA and Kattamis CA.** Heart failure in beta thalassemia: a 5-year follow-up study. *The American Journal of Medicine* 111: 349-354, 2001.
268. **Morris CR, Kuypers FA, Kato GJ, Lavrisha L, Larkin S, Singer T and Vichinsky EP.** Hemolysis-associated pulmonary hypertension in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 1054: 481-485, 2005.

269. **Morris CR, Gladwin MT and Kato GJ.** Nitric oxide and arginine dysregulation: a novel pathway to pulmonary hypertension in hemolytic disorders. *Curr Mol Med* 8: 620-632, 2008.
270. **Singer ST, Kuypers FA, Styles L, Vichinsky EP, Foote D and Rosenfeld H.** Pulmonary hypertension in thalassemia: association with platelet activation and hypercoagulable state. *Am J Hematol* 81: 670-675, 2006.
271. **Mamtani M, Kulkarni H, Mamtani M and Kulkarni H.** Influence of iron chelators on myocardial iron and cardiac function in transfusion-dependent thalassaemia: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Haematology* 141: 882-890, 2008.
272. **Tesoriere L, D'Arpa D, Butera D, Allegra M, Renda D, Maggio A, Bongiorno A and Livrea MA.** Oral supplements of vitamin E improve measures of oxidative stress in plasma and reduce oxidative damage to LDL and erythrocytes in $\hat{\alpha}$ -thalassemia intermedia patients. *Free Radical Research* 34: 529-540, 2001.
273. **Rund D and Rachmilewitz E.** Beta-Thalassemia. *N Engl J Med* 353: 1135-1146, 2005.
274. **Kaul DK, Zhang X, Dasgupta T and Fabry ME.** Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H39-H47, 2008.
275. **Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, III and Gladwin MT.** Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 9: 1498-1505, 2003.
276. **Mack AK, Gowan Ii VR, Tremonti CK, Ackah D, Barnett C, Machado RF, Gladwin MT and Kato GJ.** Sodium nitrite promotes regional blood flow in patients with sickle cell disease: a phase I/II study. *Br J Haematol* 142: 971-978, 2008.

ANNEXE I

PERTINENCE DU MODÈLE MURIN HOMO- β THAL

Une évaluation comparative des valeurs des paramètres physiologiques et cardiovasculaires étudiés dans ce travail a été effectuée entre des souris $Hbb^{th-1/th-1}$ (β -thalassémiques non-transplantées) et homo- β thal (β -thalassémiques transplantées), âgées de 14 mois, afin d'écarter l'influence des effets de la greffe de CSH sur ces paramètres. Dans l'ensemble, les résultats hémodynamiques, échocardiographiques et histopathologiques obtenus chez les souris homo- β thal et $Hbb^{th-1/th-1}$ montrent une forte similarité (*Tableaux A-I et A-II*). Parmi les différences notables, mentionnons la masse du ventricule gauche estimée par échocardiographie qui était 1.5 fois plus élevée chez les souris $Hbb^{th-1/th-1}$. La masse de la rate des souris $Hbb^{th-1/th-1}$ était également significativement plus élevée (2.4 fois). Il est compréhensible d'observer une splénomégalie plus importante chez les souris $Hbb^{th-1/th-1}$, puisque contrairement aux souris homo- β thal, elles subissent les effets délétères de la pathologie β -thalassémique durant leur développement et leur croissance. Ceci pourrait également expliquer une hypertrophie ventriculaire gauche plus importante dans ce modèle de souris. Cette analyse confirme la validité de l'utilisation d'un modèle murin homo- β thal pour l'évaluation de la physiologie cardiovasculaire dans la β -thalassémie. Par contre, tel que discuté, l'effet confondant de l'irradiation corporelle totale doit être considéré puisqu'il diffère potentiellement entre le modèle contrôle irradié et le modèle homo- β thal.

	Hbb^{th-1/th-1} (n = 3)	Homo-βthal (n = 19)
Poids (g)	26.3 ± 0.8	28.0 ± 0.9
TPVR (mmHg·min·mL ⁻¹)	2.2 ± 0.4	2.3 ± 0.2
PI aortique	0.83 ± 0.03	0.82 ± 0.01
PI carotidien	0.87 ± 0.02	0.87 ± 0.02
MAP (mmHg)	87.7 ± 19.3	84.7 ± 3.9
HR (bmp)	509 ± 30	478 ± 10
CI (mL·min ⁻¹ ·g ⁻¹)	1.17 ± 0.12	0.99 ± 0.07
FS (%)	26.9 ± 1.6	27.1 ± 0.9
LV mass/BW (mg·g ⁻¹)	9.0 ± 2.7	6.1 ± 0.3*
<i>Dimensions cardiaques normalisées</i>		
LVDd/BW (mm·g ⁻¹)	0.167 ± 0.019	0.152 ± 0.005
LVDs/BW (mm·g ⁻¹)	0.122 ± 0.015	0.108 ± 0.005
IVS/BW (mm·g ⁻¹)	0.052 ± 0.007	0.046 ± 0.002
PW/BW (mm·g ⁻¹)	0.046 ± 0.005	0.038 ± 0.002

Tableau A-I : Comparaison des paramètres cardiovasculaires de souris Hbb^{th-1/th-1} (non-transplantées, n = 3) et homo-βthal (transplantées, n = 17). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± erreur-type. CI, débit cardiaque normalisé; FS, fraction de raccourcissement; LV mass, masse estimée du ventricule gauche; BW, masse corporelle; LVDd, diamètre interne du ventricule gauche en diastole; LVDs, diamètre interne du ventricule gauche en systole; IVS, épaisseur du septum interventriculaire; PW, épaisseur de la paroi postérieure. * $p < 0.05$

	Ratio poids d'organe/ poids corporel (mg/g)		Dépôts de collagène (%)		Dépôts de fer (%)	
	Hbb ^{th-1/th-1} (n = 4)	Homo-βthal (n = 8)	Hbb ^{th-1/th-1} (n = 3)	Homo-βthal (n = 5)	Hbb ^{th-1/th-1} (n = 3)	Homo-βthal (n = 5)
Coeur	10.7 ± 0.8	8.8 ± 0.5	8.0 ± 2.2	6.9 ± 0.3	0.21 ± 0.13	0.12 ± 0.03
Rate	28.6 ± 3.5	12.1 ± 1.1**	9.0 ± 2.0	7.0 ± 1.2	10.11 ± 1.92	17.68 ± 4.14
Poumon	6.2 ± 0.3	8.3 ± 0.7	4.2 ± 0.2	4.4 ± 1.0	0.66 ± 0.12	0.81 ± 0.22
Foie	57.0 ± 3.3	54.2 ± 3.6	nd	nd	nd	nd
Rein	7.8 ± 0.8	11.7 ± 1.5	9.4 ± 0.6	7.4 ± 1.1	3.8 ± 1.4	4.47 ± 1.46

Tableau A-II: Comparaison des résultats histopathologiques obtenus chez des souris Hbb^{th-1/th-1} (non-transplantées) et homo-βthal (transplantées). ** $p < 0.01$

ANNEXE II

RÉSULTATS COMPARATIFS ENTRE GROUPES DE SOURIS NON-IRRADIÉES ET IRRADIÉES

	Souris non-irradiées	Souris irradiées	
	Contrôle C57BL/6J (<i>n</i> = 9)	Contrôle irradié (<i>n</i> = 9)	Homo- β thal (<i>n</i> = 8)
Poids (g)	32.2 \pm 0.5	29.5 \pm 1.4	23.9 \pm 0.8
<i>Ratio organe/ poids corporel</i>			
Coeur (mg/g)	6.2 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3	8.8 \pm 0.5
Rate (mg/g)	2.7 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	12.1 \pm 1.1
Poumon (mg/g)	5.8 \pm 0.2	5.7 \pm 0.4	8.3 \pm 0.7
Foie (mg/g)	52.3 \pm 1.2	46.2 \pm 1.7	54.2 \pm 3.6
Rein (mg/g)	7.4 \pm 0.2	6.4 \pm 0.2	11.7 \pm 1.5

Tableau A-III : Comparaison des résultats histopathologiques obtenus chez des souris contrôles et β -thalassémiques ayant ou non subi l'irradiation corporelle totale.

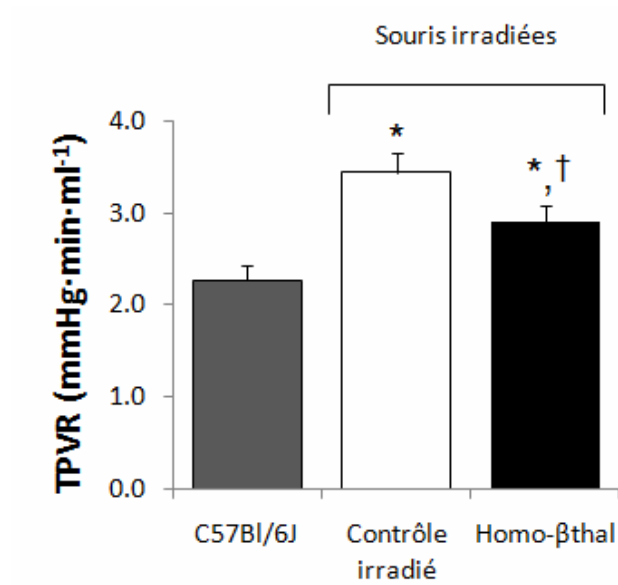


Figure 6.4: Comparaison de la résistance périphérique totale (TPVR) chez des souris contrôles non-irradiées (C57Bl/6J, $n = 19$), irradiées ($n = 18$) et homo- β thal (β -thalassémiques provenant d'une greffe de CSH combinée à l'irradiation) ($n = 19$) âgées de 14 mois. * $p < 0.001$ en comparaison avec groupe C57Bl/6J, † $p < 0.01$ en comparaison avec groupe contrôle irradié (ANOVA).

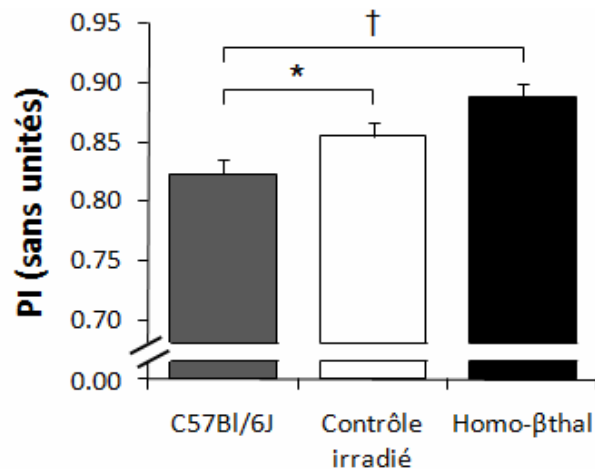


Figure 6.5: Comparaison de l'index de résistance de Pourcelot (PI) chez des souris contrôles non-irradiées (C57Bl/6J, $n = 19$), irradiées ($n = 18$) et homo- β thal (β -thalassémiques provenant d'une greffe de CSH combinée à l'irradiation) ($n = 19$) âgées de 14 mois. * $p < 0.01$ et † $p < 0.01$ (ANOVA).