

Université de Montréal

**CARACTÉRISATION DES DÉSORDRES MICROCIRCULATOIRES PAR
TECHNIQUES D'IMAGERIE CHEZ DES SOURIS TRANSGÉNIQUES
BÊTA-THALASSÉMIQUES ET DRÉPANOCYTAIRES**

par

Ekathérina Stoyanova

Institut de Génie Biomédical

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences appliquées (M.Sc.A.)
en Génie Biomédical

Décembre, 2004

© Ekathérina Stoyanova, 2004



W

4

U58

2005

V.074

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**CARACTÉRISATION DES DÉSORDRES MICROCIRCULATOIRES PAR
TECHNIQUES D'IMAGERIE CHEZ DES SOURIS TRANSGÉNIQUES
BÊTA-THALASSÉMIQUES ET DRÉPANOCYTAIRES**

présenté par :

Ekathérina Stoyanova

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

M. Denis deBlois, Ph.D.,
Président-rapporteur

M. Guy Cloutier, Ing., Ph.D.,
Directeur de recherche

M. Philippe Pibarot, Ph.D.,
Membre du jury

RÉSUMÉ

La molécule d'hémoglobine est essentielle pour le transport de l'oxygène dans les tissus. Les hémoglobinopathies telles que la β -thalassémie et l'anémie falciforme (ou drépanocytose) sont des maladies affectant la structure, la fonction et la production de l'hémoglobine. Ces désordres sont héréditaires et leurs sévérités sont diverses, variant de conditions asymptomatiques à la mort infantile. Leurs manifestations cliniques incluent l'anémie hémolytique, les attaques ischémiques transitoires, les événements thromboemboliques et l'occlusion vasculaire microcirculatoire causant des dommages à plusieurs organes.

L'objectif de ce mémoire était d'évaluer les altérations microcirculatoires et cardiovasculaires associés à la β -thalassémie et à l'anémie falciforme chez des modèles de souris transgéniques.

Un système d'imagerie ultrasonore à hautes-fréquences a été employé afin d'évaluer la résistance périphérique à l'écoulement sanguin. Deux différentes approches ont été employées : l'évaluation de l'index de résistance de Pourcelot et la mesure de la résistance périphérique totale. La fonction cardiaque a également été évaluée par échocardiographie.

L'utilisation de l'échographie à hautes fréquences a permis de confirmer la présence de perturbations circulatoires chez des modèles de souris β -thalassémiques et drépanocytaires. Les méthodes proposées dans ce travail pourraient être utilisées pour détecter des altérations hémodynamiques chez ces modèles animaux et ainsi permettre le phénotypage des souris malades.

Mots clés : bêta-thalassémie, anémie falciforme, échographie à hautes fréquences, index de résistance de Pourcelot, résistance périphérique totale, fonction ventriculaire gauche cardiaque.

ABSTRACT

The molecule of hemoglobin is essential for the delivery of oxygen to the tissues. Hemoglobinopathies such as β -thalassemia and sickle cell anemia are diseases affecting the structure, function, or production of hemoglobin. These disorders are inherited and their severity is diverse, ranging from an asymptomatic condition to infantile death. Clinical manifestations include hemolytic anemia, transitory ischemic attacks, thromboembolic events and microcirculatory obstruction causing damage to various organs.

The objective of this study was to evaluate the microcirculatory and cardiovascular alterations related to the β -thalassemia and sickle cell anemia of transgenic mouse models.

A high-frequency imaging system was used in order to evaluate peripheral vascular resistance to blood flow. Two different approaches were used: the evaluation of the Pourcelot resistive index and the assessment of the total peripheral resistance. Cardiac function was also assessed by echocardiography.

High-frequency ultrasound imaging confirmed the presence of circulatory perturbations in mouse models of β -thalassemia and sickle cell anemia. The methods presented in this work are valuable potential tools for monitoring hemodynamic perturbations in small animals, which should help the phenotyping of diseased animals.

Key Words: beta-thalassemia, sickle cell anemia, high frequency ultrasound imaging system, Pourcelot resistive index, total peripheral resistance, left ventricle cardiac function.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xvii
REMERCIEMENTS.....	2
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	4
CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
2.1 SANG.....	5
2.2 CIRCULATION SANGUINE.....	6
2.3 HÉMODYNAMIQUE.....	7
2.3.1 Résistance.....	8
2.4 GLOBULES ROUGES	9
2.5 HÉMATOPOÏÈSE.....	9
2.6 HÉMOGLOBINE.....	12
2.7 HÉMOGLOBINOPATHIES.....	14
2.7.1 β -thalassémie.....	14
2.7.1.1 Classification et génétique	14
2.7.1.2 Distribution mondiale et génétique des populations ...	16
2.7.1.3 Pathophysiologie et manifestations cliniques	17
2.7.1.4 Traitements	24
2.7.2 Anémie falciforme	27
2.7.2.1 Génétique.....	28
2.7.2.2 Distribution mondiale et génétique des populations ...	29
2.7.2.3 Pathogenèse moléculaire.....	31
2.7.2.4 Physiopathologie.....	32

2.7.2.5	Survie	39
2.7.2.6	Traitements	39
2.7.3	Modèles de souris.....	41
2.8	ÉCHOGRAPHIE	43
2.8.1	Techniques d'échographie	44
2.9	OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES.....	46
CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE		48
3.1	MATÉRIEL	48
3.1.1	Imagerie ultrasonore à haute fréquence.....	48
3.1.1.1	Biomicroscope ultrasonore Vevo 660	48
3.1.2	Mesure non effractive de la pression artérielle murine.....	50
3.2	MÉTHODES	52
3.2.1	Procédure de préparation à l'étude échographique.....	52
3.2.2	Évaluation de la résistance périphérique à l'écoulement sanguin .	53
3.2.2.1	Mesure de l'index de résistance de Pourcelot.....	53
3.2.2.2	Mesure de la résistance périphérique totale	55
3.2.3	Évaluation de la fonction cardiaque.....	58
CHAPITRE 4 : RÉSULTATS.....		60
4.1	ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE	60
4.1.1	Caractéristiques des animaux.....	60
4.1.2	Évaluation de l'index de résistance de Pourcelot	61
4.1.2	Évaluation de la résistance périphérique totale	64
4.1.3	Index de résistance de Pourcelot et résistance périphérique totale comme tests diagnostics	67
4.2	ÉVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE.....	71
CHAPITRE 5 : DISCUSSION		74
5.1	CARACTÉRISTIQUES DES ANIMAUX	74
5.1.1	Âge et poids	74
5.1.3	Pression	75
5.2	ÉVALUATION DE L'INDEX DE RÉSISTANCE DE POURCELOT	78
5.2	ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE TOTALE	82

5.2.1	Résistance périphérique totale dans la littérature : chez la souris	.82
5.2.2	Résistance périphérique totale dans la littérature :chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires	83
5.2.2.1	Résultats escomptés et résultats cliniques	88
5.2.3	Interprétation des résultats de résistance périphérique totale chez les souris β -thalassémiques et drépanocytaires	89
5.3	ÉVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE	92
5.3.1	Débit cardiaque	92
5.3.1.1	Débit cardiaque dans la littérature : chez la souris	92
5.3.1.2	Débit cardiaque dans la littérature : chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires	96
5.3.1.3	Interprétation des résultats de débit cardiaque des souris β -thalassémiques et drépanocytaires	96
5.3.2	Fonction du ventricule gauche	97
5.3.2.1	Fonction du ventricule gauche dans la littérature : chez la souris	97
5.3.2.1	Fonction du ventricule gauche dans la littérature : chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires	98
5.2.3	Interprétation des résultats de fonction ventriculaire gauche des souris β -thalassémiques et drépanocytaires	99
5.4	EFFICACITÉ DE L'INDEX DE RÉSISTANCE DE POURCELOT ET DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE TOTALE COMME TEST DIAGNOSTIC	101
5.4	AMÉLIORATIONS POSSIBLES ET TRAVAUX FUTURS	102
CHAPITRE 5 : CONCLUSION		106
RÉFÉRENCES		107
ANNEXE I		xx
ANNEXE II		xxi

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Caractéristiques générales du groupe témoin, thalassémique et drépanocytaire. Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne \pm écart-type. Les valeurs entre parenthèse sont les coefficients de variation. L'analyse statistique était un test de Student bilatéral et non pairé (test de t). * $p < 0.01$ et $^{\dagger} p < 0.001$61
- Tableau 2 : Valeurs des paramètres permettant le calcul du débit cardiaque : le diamètre aortique (AoD), l'intégrale de la vitesse aortique en fonction du temps (VTI) et la fréquence cardiaque. Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne \pm écart-type. Les coefficients de variation sont présentés entre parenthèse. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge, le poids et la pression artérielle comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA).....65
- Tableau 3 : Caractéristiques générales du groupe témoin, thalassémique et drépanocytaire ayant permis l'étude de la fonction cardiaque. Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne \pm écart-type. Les valeurs entre parenthèse sont les coefficients de variation. L'analyse statistique était un test de Student bilatéral et non pairé (test de t). * $p < 0.01$ et $^{\dagger} p < 0.001$ 72
- Tableau 4 : Valeurs des paramètres permettant l'évaluation de la fonction du ventricule gauche (LV) : les diamètres diastoliques (LVDD) et systoliques (LVSD) ainsi que la fraction de raccourcissement (FS). Les valeurs sont présentées sous la forme Moyenne \pm écart-type. Les valeurs entre parenthèse sont les coefficients de variation. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge et le poids comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA). * $p < 0.05$ 73
- Tableau 5 : Pression artérielle évaluée sur une période de 24 heures chez des sujets atteints de thalassémie majeure et des sujets témoins sains. Les valeurs expriment la médiane et les valeurs entre parenthèse représentent l'intervalle entre le 25^e et le 75^e centile. Une comparaison statistique était effectuée entre les valeurs des sujets thalassémiques et celles des sujets témoins. * $p < 0.05$ ⁽²⁰¹⁾75

Tableau 6 : Tableau présentant les valeurs de résistance périphérique totale chez des souris témoins provenant de quatre études ainsi que celles de la présente étude pour le groupe de souris témoin. *Valeur tirée de la figure 5 de l'article. **Valeurs tirées de la figure 2 de l'article.....	83
Tableau 7 : Valeurs du débit cardiaque normalisé par le poids (index cardiaque), chez des souris témoins, tirées de 4 études employant différentes méthodes de mesure.	93
Tableau 8 : Fréquences cardiaques mesurées chez des souris témoins anesthésiées au tribromoéthanol. Les résultats de notre étude sont ombragés.....	94
Tableau 9 : Valeurs des diamètres systoliques (LVSD) et diastoliques (LVDD) du ventricule gauche et de la fraction de raccourcissement (FS) mesurés par échocardiographie chez des souris témoins anesthésiées avec différents agents. n.d. : non-disponible, * Cette valeur est calculée à partir des valeurs moyennes de LVDD et LVSD fournies par l'auteur.....	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : A) Microscopie électronique du sang, montrant des érythrocytes (rouge), des plaquettes (beige) et des leucocytes (vert, bleu, lilas) (http://focus.aps.org/story/v10/st28) B) Organisation du sang en couches dans un échantillon additionné d'anticoagulant et centrifugé (adapté de(1)).....	5
Figure 2 : Schéma de l'organisation du système cardiovasculaire ⁽²⁾ . Les pourcentages indiquent la proportion de sang contenue dans chaque section.....	6
Figure 3 : Sites d'érythropoïèse durant le développement humain (adapté de (6))......	10
Figure 4 : Développement érythrocytaire et régulation (adapté de (7))......	11
Figure 5 : Molécule d'hémoglobine (4).....	12
Figure 6 : A) Chaînes de globine produites au cours du développement de l'homme, de la conception à l'âge adulte ⁽⁸⁾ . 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 (adapté de (8))......	13
Figure 7 : Morphologie des globules rouges chez un patient atteint de thalassémie majeure. ⁽⁸⁾	15
Figure 8 : Distribution mondiale de la β -thalassémie ⁽⁹⁾	17
Figure 9 : Résumé des conséquences de production excessive de chaînes d' α -globine. Les processus primaires sont indiqués en orange et les processus compensatoires en jaune (adapté de (13)).....	18
Figure 10 : Processus d'obstruction vasculaire. ⁽²³⁾	22
Figure 11 : Agrégats érythrocytaires observées chez des sujets témoins (I) et des patients β -thalassémiques (II) à grossissement élevé (A) ou faible (B) ⁽³⁰⁾	23
Figure 12 : A) Probabilité de survie et de survie sans évènements (excluant l'hypothyroïdisme et l'hypogonadisme traité) chez des patients italiens atteints de β -thalassémie majeure nés entre 1970 et 1987 (21). B) Proportion de survie au-delà de l'âge de 12 ans chez des patients britanniques atteints de β -thalassémie majeure, montrée par cohortes d'année de naissance ⁽³¹⁾	24
Figure 13 : Globules rouges drépanocytaires présentant des anomalies de la forme, à différents agrandissements, vus par microscopie électronique à balayage ⁽³⁶⁾	28

Figure 14 : Distribution du gène d'hémoglobine S ⁽⁹⁾	29
Figure 15 : A) Résumé du processus de faciformation ⁽³⁹⁾ . Lors du passage des globules rouges dans la microcirculation, l'oxygène est relâché de l'oxyhémoglobine (cercles rouges) générant la déoxyhémoglobine (cercles mauves). La partie gauche du diagramme illustre les molécules d'hémoglobine. La désoxygénation de l'hémoglobine S induit un changement de conformation de la molécule favorisant sa polymérisation. La partie centrale du diagramme montre l'assemblage de déoxyhémoglobine S en fibre hélicoïdale de structure spiralee. t_d représente le temps de délai entre la désoxygénation de l'hémoglobine et la polymérisation. La partie droite du diagramme présente les phénomènes visibles au niveau cellulaire. B) Section longitudinale d'un globule rouge drépanocytaire désoxygéné C) Section longitudinale montrant des fibres alignées de polymères d'hémoglobine S ⁽⁸⁾	30
Figure 16 : Schéma montrant les types de fibres de polymères et les formes résultantes typiques de globules rouges : faucille ou croissant (« sickle »), feuille de houx (« holly leaf ») et granulaire (« granular »)(8).....	31
Figure 17 : Adhésion d'érythrocytes drépanocytaires à la paroi endothéliale. A) La flèche montre la direction du débit. B) Les petites flèches montrent des vaisseaux post-capillaires totalement occlus. C) La flèche montre un capillaire veineux obstrué qui rejoint une veinule présentant des globules rouges individuels adhérents. D) La même surface est observée sous épi-fluorescence. Les cellules denses marquées sont bloquées dans le capillaire veineux mais sont absentes de la veinule ⁽⁴⁴⁾	34
Figure 18 : Modèle d'obstruction vasculaire présenté par Kaul et al ⁽⁴³⁾	35
Figure 19 : Microscopie intravitale de la microcirculation dans le muscle crémaster de souris drépanocytaires. Les flèches montrent des érythrocytes ayant adhéré à des leucocytes (échelle graphique, 15 μ m) ⁽⁴⁸⁾	36
Figure 20 : Modèle d'obstruction vasculaire présenté par Frenette. L'occlusion s'effectuerait en 4 étapes : i) activation de l'endothélium par les leucocytes et érythrocytes, ii) adhésion des leucocytes (« WBC »), iii) interactions entre les érythrocytes et leucocytes, et iv) occlusion vasculaire ⁽⁴⁶⁾	36
Figure 21 : Probabilité de survie chez des patients américains drépanocytaires ⁽⁴⁵⁾	39

Figure 22 : Représentation schématique simplifiée du locus de la β -globine chez la souris. A) Haplotype Hbb ^s . B) Haplotype Hbb ^d	42
Figure 23 : Modalités d'imagerie. A) Échographie mode B du rein en coupe longitudinale. B) Échographie mode M du ventricule gauche. C) Échographie Doppler de l'aorte abdominale. Ces mesures ont été obtenues chez la souris à l'aide d'un biomicroscope acoustique Vevo 660 (Visualsonics, Toronto, Canada).	45
Figure 24 : Représentation schématique de l'effet Doppler dans le sang.....	46
Figure 25 : A) Biomicroscope ultrasonore Vevo 660. B) Rail de support pour la sonde ultrasonore. C) Sonde ultrasonore. (source : Visualsonics, Toronto, Canada)....	49
Figure 26 : Système XBP-1000 (Kent Scientific, Torrington, Connecticut, USA).	50
Figure 27 : Signaux obtenus par le XBP-1000 (Kent Scientific, Torrington, Connecticut, USA) lors de la mesure de la pression systolique. La ligne bleue représente la pulsation et la ligne rouge la pression dans le ballonnet d'occlusion.	51
Figure 28 : Mesures de la vitesse systolique maximale (S) et de la vitesse en fin de diastole (D) obtenues d'un échogramme Doppler artériel.	53
Figure 29 : A) Schéma illustrant le positionnement de la souris en décubitus dorsal. Le point de mesure Doppler est illustré par (o). B) Image échographique de la carotide en coupe longitudinale montrant le volume d'échantillonnage Doppler.	54
Figure 30 : A) Schéma illustrant le positionnement de la souris en décubitus ventral. Le point de mesure Doppler est illustré par (o). B) Image en mode B de l'aorte abdominale (AA) en coupe transverse montrant le rein (R) comme repère de mesure et une vertèbre (V).	55
Figure 31 : Mesure de l'intégrale de la vitesse en fonction du temps (VTI) obtenue d'un échogramme Doppler artériel.....	56
Figure 32 : A) Représentation schématique du cœur et de l'aorte montrant le point de mesure (o) de la vitesse Doppler aortique. B) Schéma de la vue longitudinale du cœur, illustrant l'inclinaison, d'angle θ , de la sonde échographique par rapport à l'aorte. La flèche illustre la direction du débit sanguin.....	57

- Figure 33 : A) Représentation schématique du cœur en coupe longitudinale montrant le point d'acquisition du mode M. VG : ventricule gauche et OG : oreillette gauche. B) Image en mode B d'un cœur de souris avec ligne d'échantillonnage du mode M. C) Image en mode M correspondante. 59
- Figure 34 : Signaux Doppler de la vitesse dans l'artère carotide commune. A) Chez une souris témoin. B) Chez une souris drépanocytaire. 62
- Figure 35 : Diagramme montrant les valeurs moyennes d'index de résistance de Pourcelot dans l'aorte abdominale et l'artère carotide chez des souris témoins, thalassémiques et drépanocytaires. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge, le poids et la pression artérielle comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA). Les barres d'erreur montrent l'écart-type. * $p < 0.05$ et † $p < 0.001$ 63
- Figure 36: Signal Doppler de la vitesse aortique chez une souris témoin. L'image encadrée supérieure montre la position du volume d'échantillonnage Doppler sur l'image mode B. 64
- Figure 37 : Diagrammes présentant les valeurs moyennes de débit cardiaque (A) et de débit cardiaque par gramme (B) pour les trois groupes de souris. Les écarts-types sont montrés par les barres d'erreur. Un test de Student bilatéral et non pairé (test de t) a été effectué pour les valeurs de chaque diagramme comparant les groupes thalassémique et drépanocytaire au groupe témoin. * $p < 0.001$ 66
- Figure 38 : Diagramme présentant les valeurs moyennes de résistance périphérique totale pour les trois groupes de souris. Les barres d'erreur montrent les écarts-types. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge et le poids comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA). * $p < 0.05$ et † $p < 0.001$ 67
- Figure 39 : Courbe ROC de sensibilité en fonction de la spécificité de : A) l'index de résistance de Pourcelot de l'artère carotide et C) l'index de résistance de Pourcelot dans l'aorte abdominale montrant le seuil optimal représenté par un carré. Les diagrammes correspondants présentent la distribution des souris pathologiques (diagnostic positif) et témoins (diagnostic négatif) pour : B) l'index de résistance dans l'artère carotide et et D) dans l'aorte abdominale. Le

seuil optimal est représenté par la ligne horizontale. Ces graphiques ont été tracé avec MedCalc Software (version 7.4.3.1, Broekstraat, Belgique).....69

Figure 40 : A) Courbe ROC de sensibilité en fonction de la spécificité de la résistance périphérique totale. B) Diagramme présentant la distribution des valeurs de résistance périphérique totale des souris pathologiques (diagnostic positif) et témoins (diagnostic négatif). La ligne horizontale montre le seuil optimal. (MedCalc Software, version 7.4.3.1, Broekstraat, Belgique)..... 70

Figure 41 : Images en mode M du ventricule gauche chez une souris témoin (A) et une souris β -thalassémique (B).....71

Figure 42 : Pression artérielle systolique caudale («Systolic blood pressure») chez des souris témoins (barres blanches) et drépanocytaires (barres hachurées) éveillées âgées de 6 mois, 1 an et 2 ans ⁽⁸¹⁾.....76

Figure 43 : Viscosité sanguine apparente en fonction du taux de cisaillement. A) Globules rouges humains normaux (ligne pointillée) et rigidifiés (ligne continue) suspendus dans une solution de Ringer et 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 albumine (o). La concentration cellulaire des deux expériences est de 45% et la température de 37°C ⁽³⁴⁴⁾ 85

Figure 44 : Dilatation débit-dépendante («Flow-mediated dilatation») chez des patients et des sujets témoins («Controls») : A) β -thalassémiques⁽⁹⁹⁾ (la ligne horizontale représente la moyenne, $p < 0.001$) et B) drépanocytaires («Sickle») ⁽¹⁰²⁾ 87

Figure 45 : Schéma de la distribution des valeurs de résistance périphérique totale obtenues chez les souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires.90

Figure 46 : Schéma illustrant : A) Un écoulement laminaire parabolique en coupe longitudinale (I) et transversale (II)⁽¹¹⁹⁾; B) Un écoulement laminaire à profil de vitesse plat..... 94

Figure 47 : Variation de l’index de résistance de l’aorte abdominale en fonction du temps suite à l’injection intraveineuse d’acétylcholine (1 μ g/kg) au temps $t = 8$ minutes chez une souris témoin. Chaque point représente une moyenne de 10

valeurs d'index de résistance de Pourcelot et les barres d'erreurs présentent l'écart type.....104

Figure 48 : A) Schéma représentant la méthode du calcul bidimensionnel du volume ventriculaire gauche en coupe longitudinale. V représente le volume de la cavité ventriculaire gauche, A son aire longitudinale et L , sa longueur. B) Analyse échographique du volume ventriculaire gauche par sommation de disques. Un nombre x d'images en mode B du ventricule gauche en coupe transverse sont enregistrés à distance égale de la base à l'apex du cœur (I et II). L'aire interne (A_i) de chaque tranche i du ventricule gauche est calculée en systole et en diastole (I). La longueur L du ventricule gauche est mesurée sur une image en coupe longitudinale (III).....105

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AoD : diamètre de l'anneau aortique

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

°C : degrés Celsius

c : vitesse de propagation des ultrasons

Ca^{2+} : calcium

CCPA : Conseil Canadien de Protection des Animaux

cm : centimètre

CRCHUM : Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

CSA : aire de la surface aortique («Cross-sectional area»)

CVP : pression veineuse centrale («Central venous pressure»)

D : vitesse en fin de diastole

dl : décilitre

f : fréquence

F_c : fréquence cardiaque

FS : fraction de raccourcissement («Fractional shortening»)

g : gramme

HbA : hémoglobine A

HbA₂ : hémoglobine A₂

HbF : hémoglobine fétale

HbS : hémoglobine drépanocytaire

IR : index de résistance de Pourcelot

IRCM : Institut de Recherches Cliniques de Montréal

KCl : chlorure de potassium

l : litre

L: longueur du vaisseau

LVDD: diamètre ventriculaire gauche diastolique («Left ventricle diastolic diameter»)

LVSD: diamètre ventriculaire gauche systolique («Left ventricle systolic diameter»)

m : mètre

min : minute

mm : millimètre

mmHg : millimètre de mercure

μm : micromètre

η : viscosité sanguine

NO : monoxyde d'azote

MAP : pression artérielle moyenne («Mean arterial pressure»)

MHz : mégahertz

P : pression

PS : phosphatidylsérine

Q: débit

ρ : densité du milieu

r: rayon du vaisseau

R : résistance

RPT : résistance périphérique totale

ROC : courbe caractéristique d'efficacité («Receiver operating characteristic curve»)

s : seconde

S : vitesse systolique maximale

SV : volume d'éjection systolique («Stroke volume»)

θ : angle

v : vitesse

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VTI : intégrale de la vitesse en fonction du temps («Velocity-time intégral»)

Z: impédance acoustique





Sommeil de la tempête, *huile sur toile*,
E. Stoyanova, 2004

*À la mémoire de
Dr Thomas Kichkin*

REMERCIEMENTS

Ces êtres ont contribué de près ou de loin à mon travail de maîtrise. Je tiens donc à leur dire : Merci, du fond de ma zone cérébrale émotive.

Tout d'abord, je dois remercier Guy Cloutier de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de recherche, de m'avoir conseillée et supportée financièrement et moralement. Sa confiance en moi dès les premiers mois de mon séjour au laboratoire m'a touchée. Il m'a encouragée à me dépasser en m'offrant de relever plusieurs défis.

Je tiens à souligner l'exceptionnelle générosité de Marie Trudel qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et donné accès à ses souris. Ses deux étudiants, Martin Couillard et Mélissa ont grandement contribué à mon éducation en manipulation murine lorsque je n'étais même pas en mesure de toucher une souris. Louis-Gilles Durand a également été d'un grand support puisqu'il m'a offert la chance de m'installer dans son laboratoire à l'Institut de Recherches Cliniques afin d'y effectuer la totalité de mes expérimentations. Au sein de ce laboratoire, Damien Garcia était un conseiller indispensable tout au long de mes travaux.

Je tiens également à remercier tous les membres du LBUM qui ensoleillent mon quotidien. Je suis sincèrement reconnaissante de l'amitié de Jean-Luc Genisson qui a patiemment corrigé ce mémoire et m'a supportée moralement lorsque les jours étaient moins roses. De plus, je dois remercier Michel Daronat de sa grande disponibilité et de m'avoir gentiment fourni son soutien technique. J'aimerais également souligner la contribution des deux stagiaires d'été, Mélanie Deslande et Som Mai Lê, qui ont permis l'obtention de données préliminaires.

Je suis également reconnaissante envers de nombreuses personnes de ma vie extra-scientifique. Erick Raymond-Beaubien m'a écoutée, conseillée et surtout courageusement supportée durant mes tempêtes émotionnelles. Nadia et Latchesar, mes parents exemplaires, m'ont encouragée à me surpasser. Marie-Noëlle, professeure exceptionnelle, m'a non seulement fait découvrir la peinture, mais elle m'a aussi évité des séances fort coûteuses de psycho-thérapie.

Finalement, je dois mentionner que je garde toujours une pensée pour tous les rats, souris, chiens et lapins de laboratoire que j'ai croisés sur mon chemin.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

L'anémie falciforme, ou drépanocytose, et la β -thalassémie représentent deux maladies génétiques hématologiques. Ces désordres proviennent de mutations du gène de l'hémoglobine responsables de sa malformation et des anomalies morphologiques et fonctionnelles érythrocytaires. En plus des problèmes d'anémie, les patients atteints souffrent de perturbations circulatoires se manifestant par des attaques ischémiques transitoires, des événements thromboemboliques ou des obstructions microcirculatoires causant des épisodes de douleur sévère. Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire de maîtrise étudient les altérations micro-rhéologiques et cardiovasculaires associés aux atteintes circulatoires chez des modèles de souris transgéniques β -thalassémiques et drépanocytaires.

Le premier chapitre présente les concepts nécessaires à la compréhension des maladies étudiées. Le deuxième chapitre expose le protocole expérimental employé pour évaluer la résistance périphérique à l'écoulement sanguin et la fonction cardiaque. Le troisième chapitre présente les résultats obtenus chez des groupes de souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires. Enfin, une discussion générale des résultats ainsi que quelques perspectives de recherche viennent conclure ce document. En annexe, nous présentons un protocole proposé pour l'évaluation non intrusive de la fonction endothéliale vasoactive et un article de conférence exposant les travaux de ce mémoire.

CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 SANG

Le sang représente environ 8% du volume corporel total, c'est-à-dire 4 à 6 l. Il est composé de trois types d'éléments cellulaires spécialisés suspendus dans un liquide appelé plasma : les érythrocytes ou globules rouges, les leucocytes ou globules blancs et les plaquettes (Fig. 1). L'hématocrite représente le volume qu'occupent les globules rouges dans un échantillon sanguin total (Fig. 1B). 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.

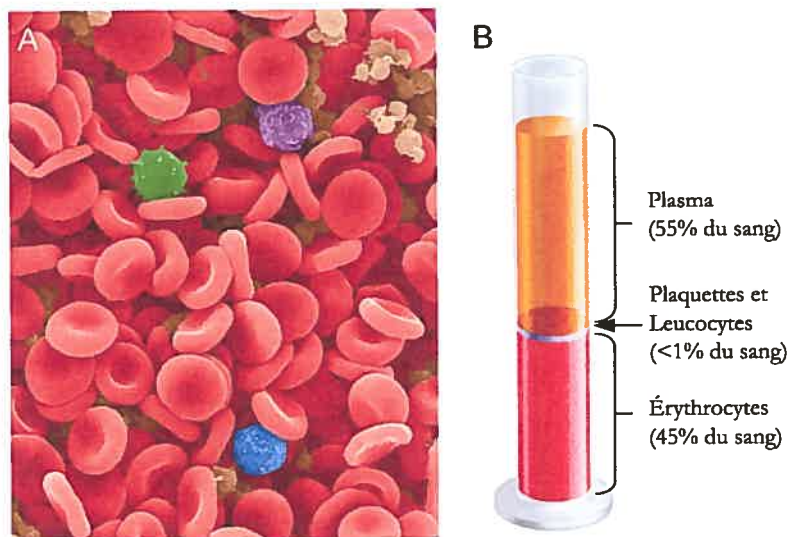


Figure 1 : A) Microscopie électronique du sang, montrant des érythrocytes (rouge), des plaquettes (beige) et des leucocytes (vert, bleu, lilas) (<http://focus.aps.org/story/v10/st28>) B) Organisation du sang en couches dans un échantillon additionné d'anticoagulant et centrifugé (adapté de(1)).

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.

2.2 CIRCULATION SANGUINE

La circulation se divise en deux grandes parties : la circulation systémique, alimentant tous les tissus du corps, et la circulation pulmonaire (Fig. 2). Ces circulations sont composées de systèmes fermés de vaisseaux sanguins.

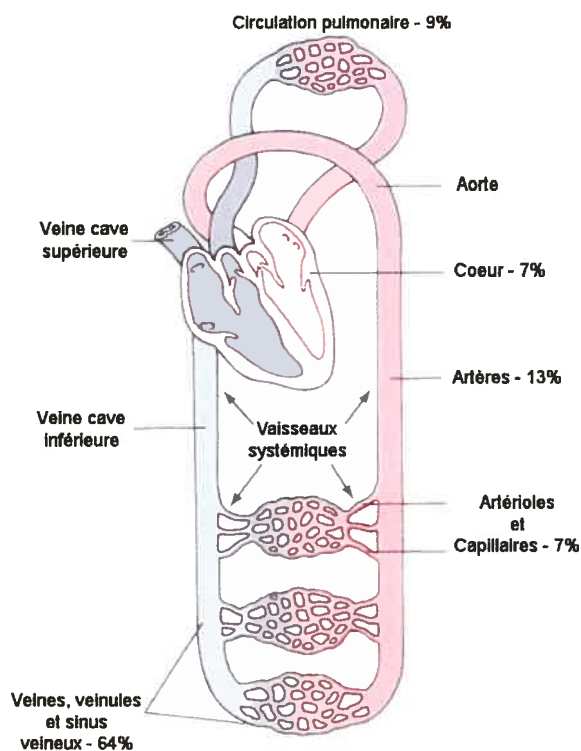


Figure 2 : Schéma de l'organisation du système cardiovasculaire⁽²⁾. Les pourcentages indiquent la proportion de sang contenue dans chaque section.

Les artères transportent le sang du cœur aux tissus. Elles emmagasinent la pression afin de fournir la force nécessaire de propulsion du sang lorsque le cœur est au repos. Cette fonction est accomplie grâce aux propriétés élastiques des parois vasculaires artérielles contenant des fibres de collagène et d'élastine. Les artères se séparent ensuite en plus petits vaisseaux pénétrant les organes et se subdivisent en artérioles. Ces dernières agissent comme conduits de témoin, régulant 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.

2.3 HÉMODYNAMIQUE

L'hémodynamique constitue l'étude des caractéristiques physiques gouvernant la circulation sanguine. Le débit à travers un vaisseau sanguin est déterminé par deux facteurs : 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 :

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

où, Q représente le débit sanguin, ΔP la différence de pression entre les deux extrémités du vaisseau 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.

2.3.1 Résistance

La résistance à l'écoulement sanguin est déterminée par trois facteurs : la viscosité sanguine (η), la longueur (L) et le rayon du vaisseau (r) :

$$R \propto \frac{\eta \cdot L}{r^4} \quad (2)$$

La viscosité du sang à hémocrite normal et à haut taux de cisaillement¹ est environ 3 fois celle de l'eau. Elle dépend essentiellement du nombre de globules rouges qui exercent une friction sur les cellules adjacentes et la paroi vasculaire, ainsi que de la concentration de protéines plasmatiques. La viscosité du plasma est de 1,5 fois celle de l'eau.

Le rayon du vaisseau est le principal facteur déterminant la résistance vasculaire⁽²⁾. Le sang traverse plus facilement un vaisseau à grand diamètre qu'un vaisseau à faible diamètre puisqu'un volume donné entre en contact avec une surface beaucoup plus grande lorsque le vaisseau possède un petit diamètre. Ainsi, jusqu'à 60 % de la résistance est générée dans les artérioles, le reste se répartissant à 15% dans les capillaires, 15% dans les veines et 10% dans les artères⁽³⁾. De plus, les artérioles contribuent à la résistance vasculaire périphérique grâce à leur capacité de témoinr activement leur diamètre par l'activation de cellules musculaires lisses en présence de stimuli vasodilatateurs ou vasoconstricteurs.

¹ Force tangentielle qu'exerce chaque couche de sang concentrique en mouvement, parallèle à l'axe du vaisseau, sur la couche de sang adjacente.

2.4 GLOBULES ROUGES

Les globules rouges sont des cellules anuclées ayant la forme d'un disque biconcave de diamètre de 7,8 μm et d'épaisseur de 2,5 μm sur les côtés et 1 μm au centre⁽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 $4,7 \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$ ⁽⁴⁾. 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. 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 μm .

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 un hématoците normal, le sang contient chez l'homme en moyenne 16 g d'hémoglobine par décilitre de sang et 14 g/dL chez la femme⁽²⁾. Cependant la concentration en hémoglobine varie selon l'âge, le sexe et les origines ethniques⁽⁵⁾.

2.5 HÉMATOPOÏÈSE

Le lieu de synthèse des cellules sanguines change durant le développement embryonnaire passant du sac vitellin² au foie, à la rate et pour enfin s'installer dans la moelle osseuse, lieu exclusif de la production après la naissance (Fig. 3).

² Vésicule, très réduite dans l'espèce humaine, appendue à la partie ventrale de l'intestin et reliée à l'intestin par le canal vitellin.

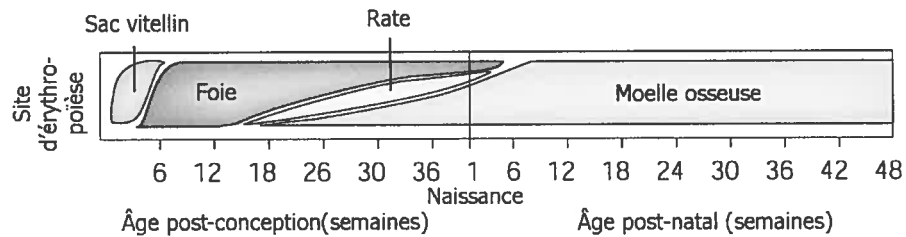


Figure 3 : Sites d'érythropoïèse durant le développement humain (adapté de (6)).

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⁽²⁾. La moelle rouge est également le site de synthèse des globules blancs (leucocytes) et des plaquettes.

Toutes les cellules sanguines circulantes dérivent des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes, c'est-à-dire des cellules souches non différenciées capables de produire diverses cellules différenciées. À partir de la cellule souche pluripotente, plusieurs différenciations sont nécessaires afin de former la première cellule appartenant à la lignée des globules rouges, le proérythroblaste (Fig. 4). Ce précurseur subit une série de divisions produisant chacune des cellules de plus en plus petites.

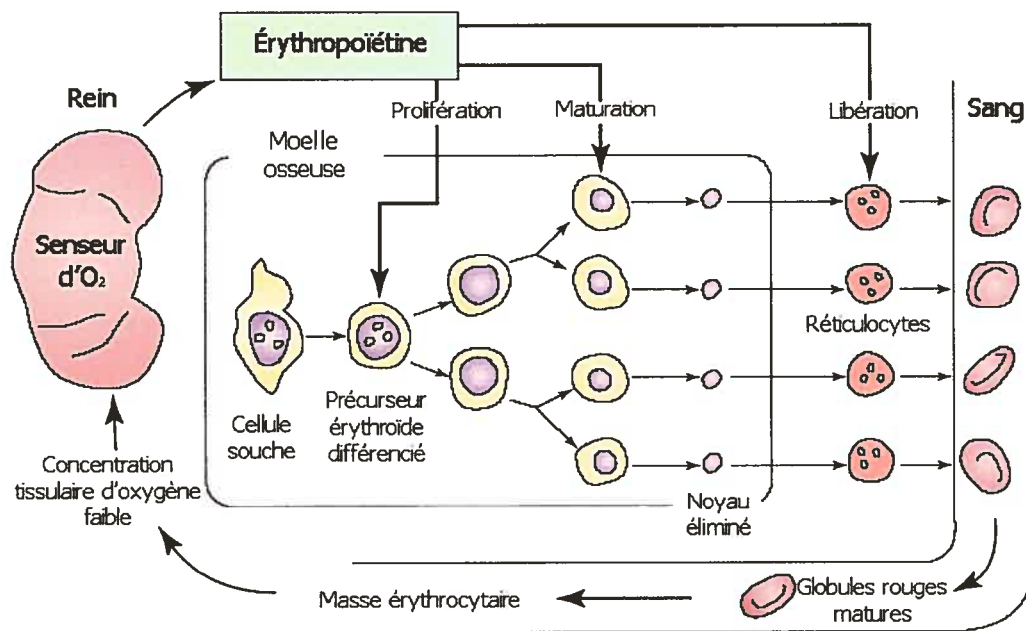


Figure 4 : Développement érythrocytaire et régulation (adapté de (7)).

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 ce qui cause 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⁽⁷⁾.

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. 4).

La durée de vie des globules rouges matures est d'environ 120 jours⁽⁵⁾. Avec le vieillissement, la membrane cellulaire érythrocytaire devient plus fragile et rend la cellule susceptible à la rupture lors du passage à travers les vaisseaux étroits de la circulation. Ainsi, une partie des érythrocytes se détruisent lors du passage dans les petits espaces trabéculaires de la rate. La destruction des globules rouges et la dégradation de l'hémoglobine qu'ils contiennent est facilitée par les cellules phagocytaires de la rate, du foie et de la moelle osseuse.

2.6 HÉMOGLOBINE

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 (Fig. 5).

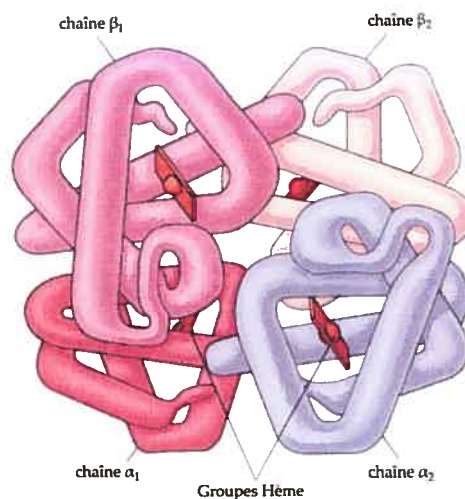


Figure 5 : Molécule d'hémoglobine (4).

Les gènes de ces globines de type α et β sont encodés sur les chromosomes 16 et 11 respectivement. Au cours des stades du développement, différentes globines de type α et β sont activées (Fig. 6A), pour former différentes hémoglobines (Fig. 6B).

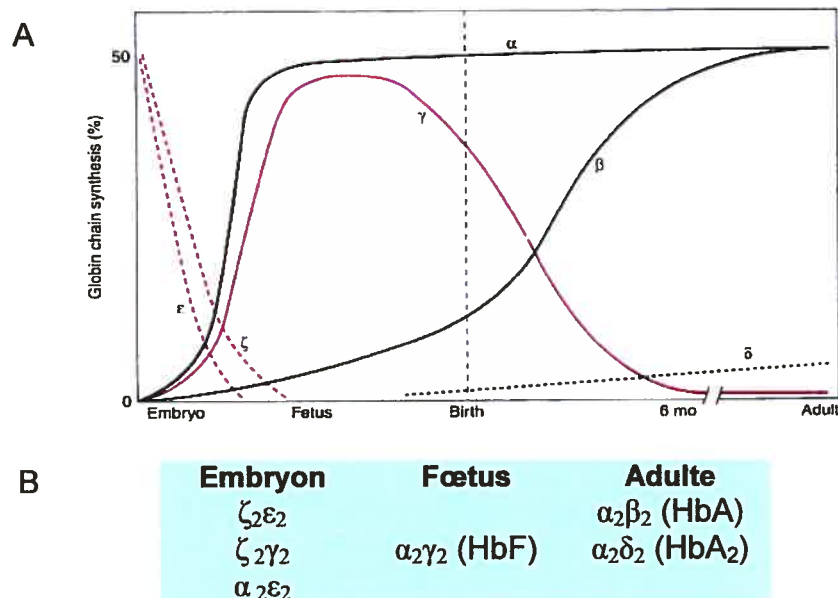


Figure 6 : A) Chaînes de globine produites au cours du développement de l'homme, de la conception à l'âge adulte⁽⁸⁾. B) Composition des hémoglobines selon le stade de développement. La lettre en grec désigne le nom de la globine et l'indice indique le nombre de chaînes. L'indication entre parenthèses est le nom de l'hémoglobine résultante (adapté de (8)).

À l'âge adulte, la totalité des hémoglobines est constituée de : 97% d'hémoglobine A (HbA), 2,5% d'hémoglobine A₂ (Hb A₂) et <1% d'hémoglobine fœtale (HbF)⁽⁸⁾. Chaque chaîne de globine contient dans son groupe hème un atome de fer capable de lier de façon réversible l'oxygène (Fig. 5).

2.7 HÉMOGLOBINOPATHIES

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).

2.7.1 β -thalassémie

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⁾.

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. Dépendamment de la chaîne de globine impliquée, elles sont classifiées en α , β , γ , δ , $\delta\beta$ et $\epsilon\gamma\delta\beta$ thalassémie, les plus courantes étant l' α -thalassémie et la β -thalassémie⁽¹¹⁾. Ainsi la β -thalassémie résulte de la réduction (β^+ -thalassémie) ou de l'absence (β^0 -thalassémie) de production de la chaîne β -globine⁽¹²⁾.

2.7.1.1 Classification et génétique

La β -thalassémie est extrêmement hétérogène au niveau moléculaire, puisque plus de 180 différentes mutations entraînent ce phénotype. Brièvement, ce sont soit des délétions³ au niveau du gène de la β -globine ou des mutations très souvent ponctuelles affectant la transcription de l'ADN en ARN messenger, la maturation de

³ Processus entraînant la perte de matériel chromosomique sur un segment d'ADN.

l'ARN messenger ou la traduction de l'ARN messenger en β -globine⁽¹²⁾. Les phénotypes cliniques de la β -thalassémie peuvent être séparés en trois catégories selon la sévérité des symptômes: la thalassémie majeure, la thalassémie intermédiaire et le trait thalassémique. La thalassémie majeure consiste en une anémie sévère associée à des symptômes. Elle se présente chez des individus homozygotes⁴ pour une mutation thalassémique ou des individus hétérozygotes⁵ présentant une combinaison de plusieurs mutations thalassémiques. Chez ces individus, l'anémie s'accompagne généralement d'une diminution sévère de la pigmentation cutanée ou tissulaire normale causée par la réduction anormale de la teneur en hémoglobine des érythrocytes, ou hypochromie, et une diminution du volume globulaire moyen, ou microcytose (Fig. 7). Le niveau d'hémoglobine décroît progressivement durant les

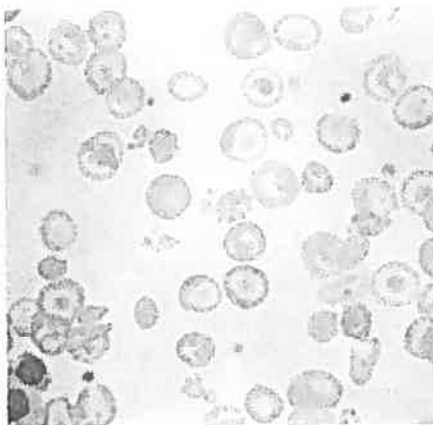


Figure 7 : Morphologie des globules rouges chez un patient atteint de thalassémie majeure.⁽⁸⁾

premiers mois de vie et peut atteindre des concentrations aussi basses que 3 à 4 g/dL de sang. Les concentrations moyennes normales d'hémoglobine chez un individu en santé sont de 15.5 g/dl chez l'homme et de 14.0 g/dl chez la femme⁽⁸⁾. Les patients

⁴ Individus portant la même mutation sur chacun des deux allèles de la même paire de chromosomes.

⁵ La mutation est contenue sur un seul allèle de la même paire de chromosomes

non-traités risquent la mort dès la naissance. Environ 10% des individus β -thlassémiques homozygotes expriment un phénotype de sévérité hématologique intermédiaire. Ces patients présentent une réduction modérée de la synthèse de la β -globine et survivent généralement jusqu'à l'âge adulte. Le trait thalassémique est un état de porteur asymptomatique. Ces patients sont hétérozygotes pour une mutation thalassémique.

2.7.1.2 Distribution mondiale et génétique des populations

Tel que montré à la figure 8, la β -thalassémie se distribue en grande partie à travers les populations de l'Afrique, la région Méditerranéenne, le Moyen-Orient, l'Inde et en Asie du Sud-Est⁽⁹⁾.

Dans ces populations, l'incidence du gène est estimée entre 3 et 10%⁽¹³⁾. Cependant, en raison des mouvements de populations, ces affections 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 du gène muté⁽¹⁴⁾.

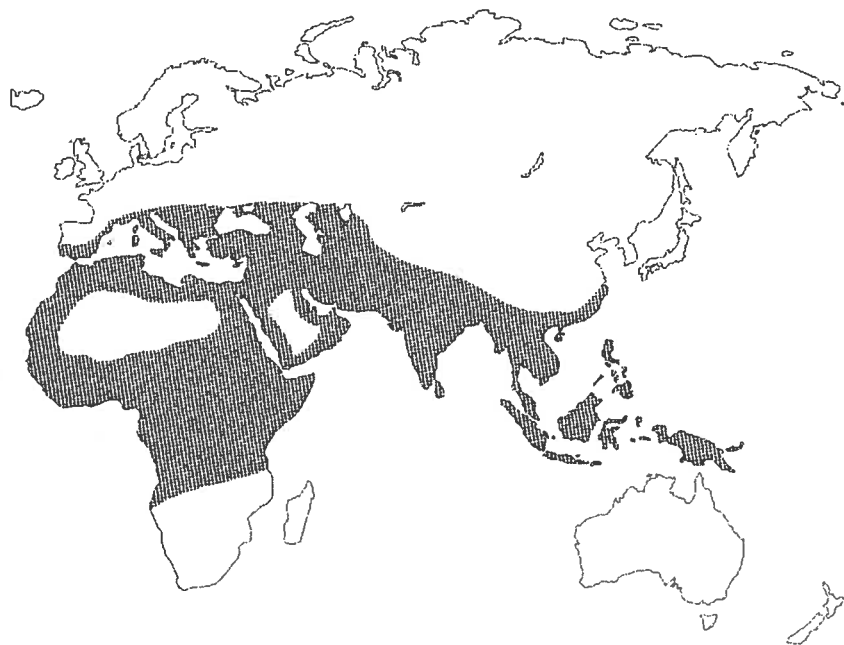


Figure 8 : Distribution mondiale de la β -thalassémie⁽⁹⁾.

2.7.1.3 Pathophysiologie et manifestations cliniques

Les principales pathologies et manifestations cliniques de la β -thalassémie sont : l'anémie, les modifications osseuses, la splénomégalie, la surcharge de fer et l'occlusion vasculaire (Fig. 9).

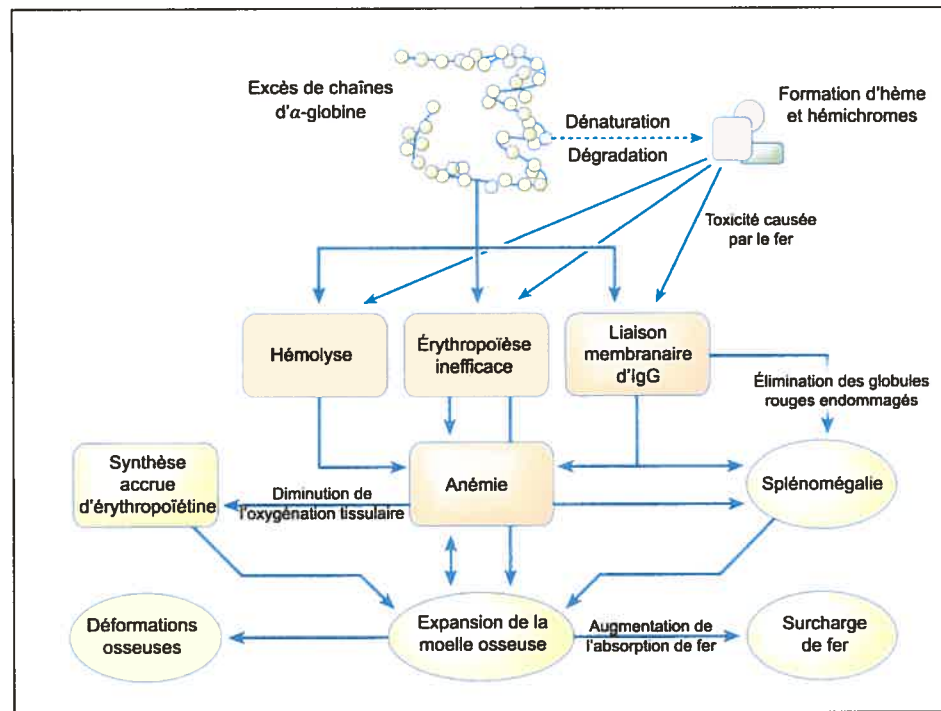


Figure 9 : Résumé des conséquences de production excessive de chaînes d'α-globine. Les processus primaires sont indiqués en orange et les processus compensatoires en jaune (adapté de (13)).

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. Chez les individus les plus sévèrement atteints (homozygotes), 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'aggrègent et précipitent formant des inclusions, appelés également « corps de Heinz », à l'intérieur des précurseurs des érythrocytes (Fig. 7)⁽¹²⁾. Les corps de Heinz interfèrent dans le processus de maturation des précurseurs érythrocytaires en stimulant l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, de ces derniers^(15; 16). Centis *et al.* ont démontré que chez des patients thalassémiques le taux d'apoptose érythrocytaire à l'intérieur de la moelle

osseuse était de 3 à 4 fois supérieur à celui des sujets normaux⁽¹⁷⁾. Ainsi, l'apoptose serait à l'origine de l'inefficacité de l'érythropoïèse et donc en grande partie de l'anémie résultante. De plus, l'anémie comporte également une composante hémolytique, puisque les érythrocytes ayant atteint la maturité et contenant des corps de Heinz montrent une rigidité accrue. 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 agrégats d' α -globine se liant au cytosquelette membranaire endommagent les protéines de la membrane cellulaire ce qui cause la rigidité érythrocytaire⁽¹⁸⁾.

Finalement, l'excès d' α -globines provoque une série de processus oxydatifs. L'oxydation endommage la membrane et certaines composantes érythrocytaires, créant ainsi des sites de liaison membranaire pour les immunoglobulines G (IgG) et rendant les globules rouges susceptibles à l'élimination par les macrophages⁽¹²⁾.

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⁽⁸⁾. 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⁾.

Splénomégalie

L'exposition incessante de la rate aux globules rouges contenant des inclusions entraîne l'hypertrophie de la rate, appelée splénomégalie. Elle agit telle une éponge séquestrant une proportion considérable de la masse érythrocytaire⁽⁹⁾. La splénomégalie peut être évitée par transfusion régulière de sang⁽¹⁹⁾. Cependant, lorsque les besoins en transfusion excèdent 200 mL de globules rouges par kilogramme de poids corporel, les patients doivent subir une ablation chirurgicale de la rate ou splénectomie. Le même processus peut avoir lieu dans le foie surtout après la splénectomie.

Surcharge de fer

Les patients thalassémiques sévèrement atteints manifestent une augmentation de l'absorption intestinale de fer causée par l'expansion de la population de précurseurs de lignée érythroïde. L'absorption accrue entraîne une accumulation graduelle de fer dans certaines cellules du foie et les macrophages de la rate^(8, 19). De plus, les patients thalassémiques homozygotes requièrent des transfusions sanguines régulières qui contribuent à accentuer l'accumulation de fer dans les glandes endocriniennes, le foie et le myocarde. La toxicité primaire du fer non-lié à des protéines d'entreposage ou de transport est reliée à sa capacité de générer des radicaux libres causant des dommages oxydatifs. L'absence d'un traitement chélateur⁶ permettant l'excrétion du fer entraîne une dysfonction graduelle au niveau du cœur,

⁶ Traitement permettant la formation d'un complexe soluble et non toxique avec un métal lourd facilitant ainsi son excrétion de l'organisme.

du foie et des glandes endocriniennes⁽¹⁹⁾. Le cœur thalassémique subit d'abord des changements suite à l'anémie chronique s'aggravant ensuite par la surcharge de fer qui est associée à l'hypertrophie et la dilatation cardiaque, ainsi que la dégénérescence des fibres myocardiques⁽¹³⁾. La survie des patients β -thalassémiques est déterminée par l'ampleur de la charge en fer dans le cœur⁽²⁰⁾, puisque la cause principale de décès chez ces individus est de nature cardiaque⁽²¹⁾. 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 maturation sexuelle^(13, 19).

Occlusion vasculaire

Borgna Pignatti *et al.* ont mené une étude auprès de 9 centres thalassémiques italiens montrant que 3,95% des patients atteints de thalassémie majeure et 9,61% des patients atteints de thalassémie intermédiaire présentaient des épisodes thromboemboliques⁽²²⁾. Ces événements thromboemboliques peuvent être localisés au niveau cérébral, pulmonaire, hépatique, cardiaque, ou veineux^(22; 23). 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 la coagulation et l'endothélium.

Une première hypothèse probable de ces événements est l'état d'hypercoagulation présent chez les patients thalassémiques. Des études ont démontré d'une part la diminution de la survie des plaquettes⁽²⁴⁾ et d'autre part une augmentation des agrégats plaquettaires circulants chez les patients thalassémiques⁽²⁵⁾. De plus, l'activation plaquettaire est confirmée par l'observation d'une production

accrue de thromboxane A₂ et de prostacycline, deux prostaglandines impliquées dans l'agrégation plaquettaire⁽²⁶⁾.

L'effet pro-coagulant proviendrait des globules rouges des patients thalassémiques qui montrent des niveaux supérieurs de phospholipides anioniques telle que la phosphatidylsérine (PS) à leur surface membranaire^(23, 27). 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⁽²³⁾. L'exposition des PS au niveau de la membrane externe des érythrocytes thalassémiques est due aux dommages oxydatifs induits par l'accumulation de chaînes d' α -globines⁽²⁷⁾. La PS peut activer la prothrombine en thrombine, conduisant à l'activation plaquettaire et la formation d'agrégats plaquettaires (Fig. 10).

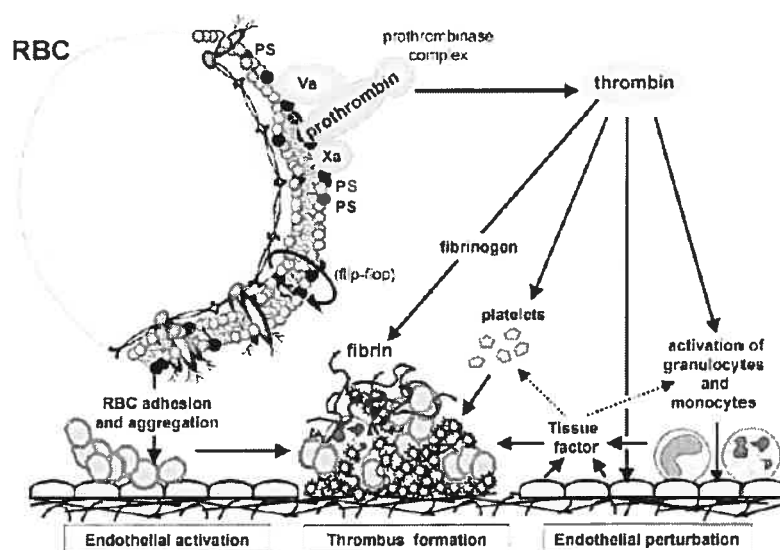


Figure 10 : Processus d'obstruction vasculaire.⁽²³⁾

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⁽²⁸⁾. L'adhésion des globules rouges aux cellules endothéliales vasculaires est considérée comme une cause importante de l'initiation de l'occlusion vasculaire, plus particulièrement au niveau de la microcirculation⁽²⁹⁾. De plus, une étude montre une augmentation de l'agrégation érythrocytaire *in vitro* avec la formation d'agrégats de grande taille chez des patients atteints de thalassémie majeure (Fig. 11)⁽³⁰⁾. La formation normale de rouleaux

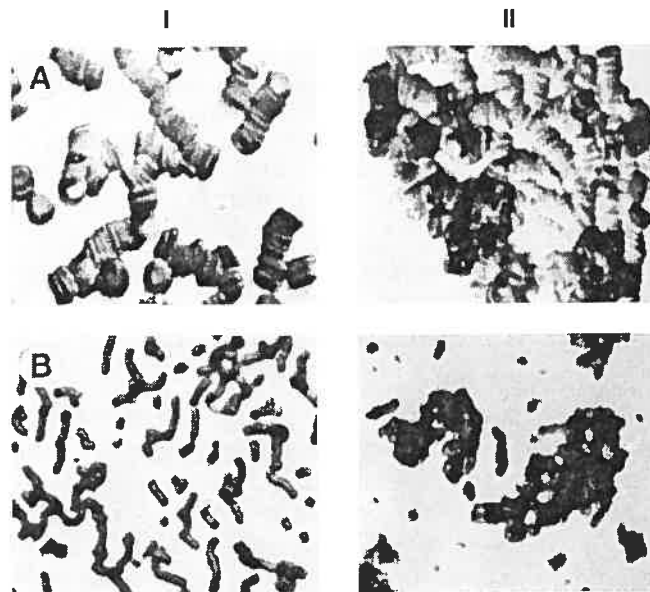


Figure 11 : Agrégats érythrocytaires observées chez des sujets témoins (I) et des patients β -thalassémiques (II) à grossissement élevé (A) ou faible (B)⁽³⁰⁾.

typiques était absente dans cette étude et des forces de cisaillement supérieures étaient nécessaires afin de disperser les agrégats de forme compacte. Toutefois, la taille des

agrégats était réduite à des niveaux normaux suite à la transfusion sanguine des patients thalassémiques confirmant ainsi que l'ajout de globules rouges normaux aux globules rouges thalassémiques permet de réduire l'agrégation érythrocytaire⁽³⁰⁾.

2.7.1.4 Traitements

Durant les dernières décennies, le pronostic des patients atteints de β -thalassémie majeure a grandement été amélioré par les traitements de transfusion et de chélation du fer. La figure 12 montre la probabilité de survie chez des patients β -thalassémiques italiens (A) et britanniques (B).

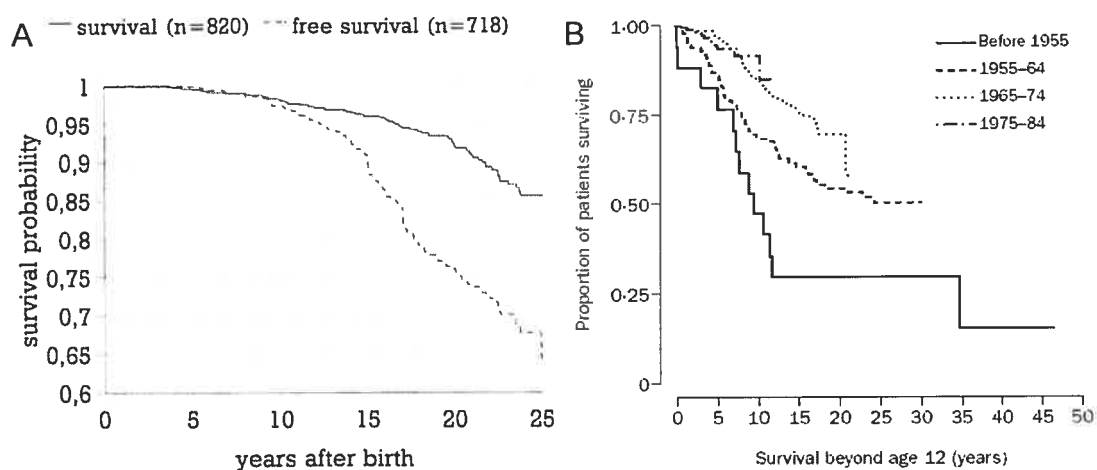


Figure 12 : A) Probabilité de survie et de survie sans évènements («free survival», excluant l'hypothyroïdisme et l'hypogonadisme traité) chez des patients italiens atteints de β -thalassémie majeure nés entre 1970 et 1987 (21). B) Proportion de survie au-delà de l'âge de 12 ans chez des patients britanniques atteints de β -thalassémie majeure, montrée par cohortes d'année de naissance⁽³¹⁾.

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 l'érythropoïèse endogène et les complications qu'elle entraîne^(32; 33). Généralement, les transfusions sont administrées chaque deux à quatre semaines^(10; 32). Dans le but d'éviter des réactions aux transfusions, le sang doit être filtré pour éliminer les globules blancs. Toutefois, le risque de transmission d'agents viraux tels que l'hépatite B, C et le VIH demeurent une problématique importante des transfusions sanguines⁽³³⁾.

Traitement chélateur du fer

La surcharge de fer 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 le seul agent chélateur utilisé à grande échelle pour usage clinique ayant démontré son efficacité dans le traitement de la thalassémie⁽¹⁰⁾. 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⁽¹⁹⁾. Ce médicament a montré une grande efficacité inversant la toxicité au niveau des organes et prolongeant l'espérance de vie lorsqu'il est utilisé adéquatement. Cependant, pour atteindre un niveau suffisant d'élimination du fer, ce médicament doit être administré au moins 250 jours par année. Le régime de traitement souvent inconfortable et rigoureux entraîne une adhérence faible au traitement plus particulièrement chez les adolescents et les jeunes adultes⁽³³⁾. 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. Un autre médicament chélateur pouvant être

administré par voie orale, le déféripone, est encore sous étude mais les chercheurs ne s'entendent pas sur son efficacité et son innocuité^(19, 34).

Transplantation de moelle osseuse

Le seul traitement capable de guérir la thalassémie en corrigeant l'anomalie génétique est la transplantation de cellules souches hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse. Depuis 1982, plus de 1000 transplantations de moelle ont été effectuées à travers le monde⁽¹³⁾. Le prérequis à la transplantation est la disponibilité d'un donneur ayant un système d'histocompatibilité HLA (système majeur d'histocompatibilité humain)⁷ identique. La procédure consiste à prélever de la moelle osseuse de l'os iliaque du donneur et de l'infuser dans une veine périphérique en 4 à 6 heures chez le patient thalassémique ayant subi un traitement de préparation visant à éradiquer son système hématopoïétique et réprimer son système immunitaire. Le résultat thérapeutique de la transplantation est influencé par trois facteurs de risque avant-transplantation : la présence d'hépatomégalie, de fibrose du foie et l'efficacité du traitement de chélation. Une complication possible est la persistance de cellules hématopoïétiques résiduelles du patient thalassémique⁽³⁵⁾. 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⁽³³⁾.

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

⁷ 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.

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⁽³³⁾. Les agents thérapeutiques utilisés sont des médicaments cytotoxiques, 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; 13). La thérapie génique, quant à elle, consiste à corriger la mutation génétique en transférant le gène de β -globine dans une cellule souche hématopoïétique. Cependant, à ce jour, aucune méthode n'a été développée pour le transfert de gènes chez l'humain⁽³³⁾.

2.7.2 Anémie falciforme

L'anémie falciforme est un trouble héréditaire caractérisé par une anémie hémolytique chronique ainsi que des épisodes transitoires de douleur sévère. En 1910, James Herrick, un médecin de Chicago, décrit chez un étudiant africain une forme d'anémie accompagnée de douleurs intermittentes et présentant des globules rouges en forme de faucille⁽⁸⁾. Ce n'est qu'en 1927 que Hahn et Gillespie ont démontré que la privation d'oxygène induisait la déformation des globules rouges (Fig. 13) et que cette dernière était réversible lors de la réoxygénation⁽¹⁰⁾. En 1949, Pauling et ses collègues découvrent que c'est l'hémoglobine des patients atteints d'anémie falciforme qui est anormale.

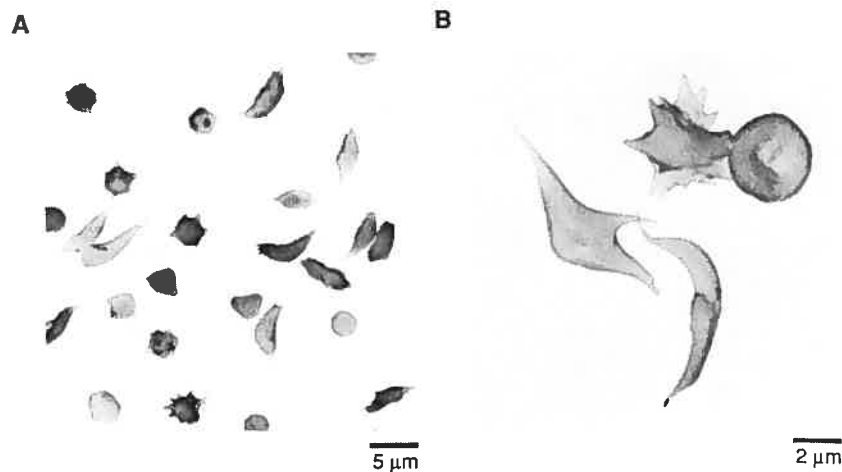


Figure 13 : Globules rouges drépanocytaires présentant des anomalies de la forme, à différents agrandissements, vus par microscopie électronique à balayage⁽³⁶⁾.

2.7.2.1 Génétique

L'anémie falciforme, ou drépanocytose, est causée par une seule substitution (thymine pour adénine) sur l'ADN de la β -globine résultant conséquemment par le remplacement d'un acide aminé (valine par acide glutamique) sur la chaîne de β -globine. L'hémoglobine d'un individu homozygote pour cette mutation est désignée comme hémoglobine S. Il existe d'autres variantes d'hémoglobine drépanocytaire et les formes d'anémie résultantes présentent des caractéristiques physiopathologiques et cliniques similaires : l'hémoglobinose SC, l'hémoglobinose SD et l'anémie microdrépanocytaire. L'état homozygote d'anémie falciforme (hémoglobine S) est le plus grave de ces désordres. Un individu hétérozygote pour la mutation n'est que porteur asymptomatique de la maladie et sa condition se nomme trait drépanocytaire.

2.7.2.2 Distribution mondiale et génétique des populations

L'anémie falciforme affecte plus particulièrement les populations d'Afrique mais également celles d'Italie, de la Grèce, de la Turquie, de l'Arabie Saoudite et de



Figure 14 : Distribution du gène d'hémoglobine S⁽⁹⁾.

l'Inde (Fig. 14)⁽⁹⁾. De plus, aux États-Unis plus de 50 000 Américains de différentes origines ethniques sont atteints de cette hémoglobinopathie. Chez les Afro-américains, la prévalence de l'anémie falciforme est d'environ 2,66 ‰, 1,19 ‰ pour l'hémoglobinose SC et 0,6 ‰ pour la maladie microdrépanocytaire⁽³⁷⁾. Ainsi, 7,8 % des Afro-Américains sont porteurs du trait drépanocytaire⁽¹⁰⁾. Au Royaume-Uni, le nombre d'individus atteints de drépanocytose s'estime à 12 000⁽³⁸⁾. Comme pour la β -thalassémie, la prévalence élevée du gène de l'anémie falciforme dans les régions du monde où la malaria est fréquente, suggère que lors de l'infection par cette maladie parasitaire les personnes atteintes du trait drépanocytaire ont un avantage sélectif par rapport aux individus normaux⁽¹⁰⁾.

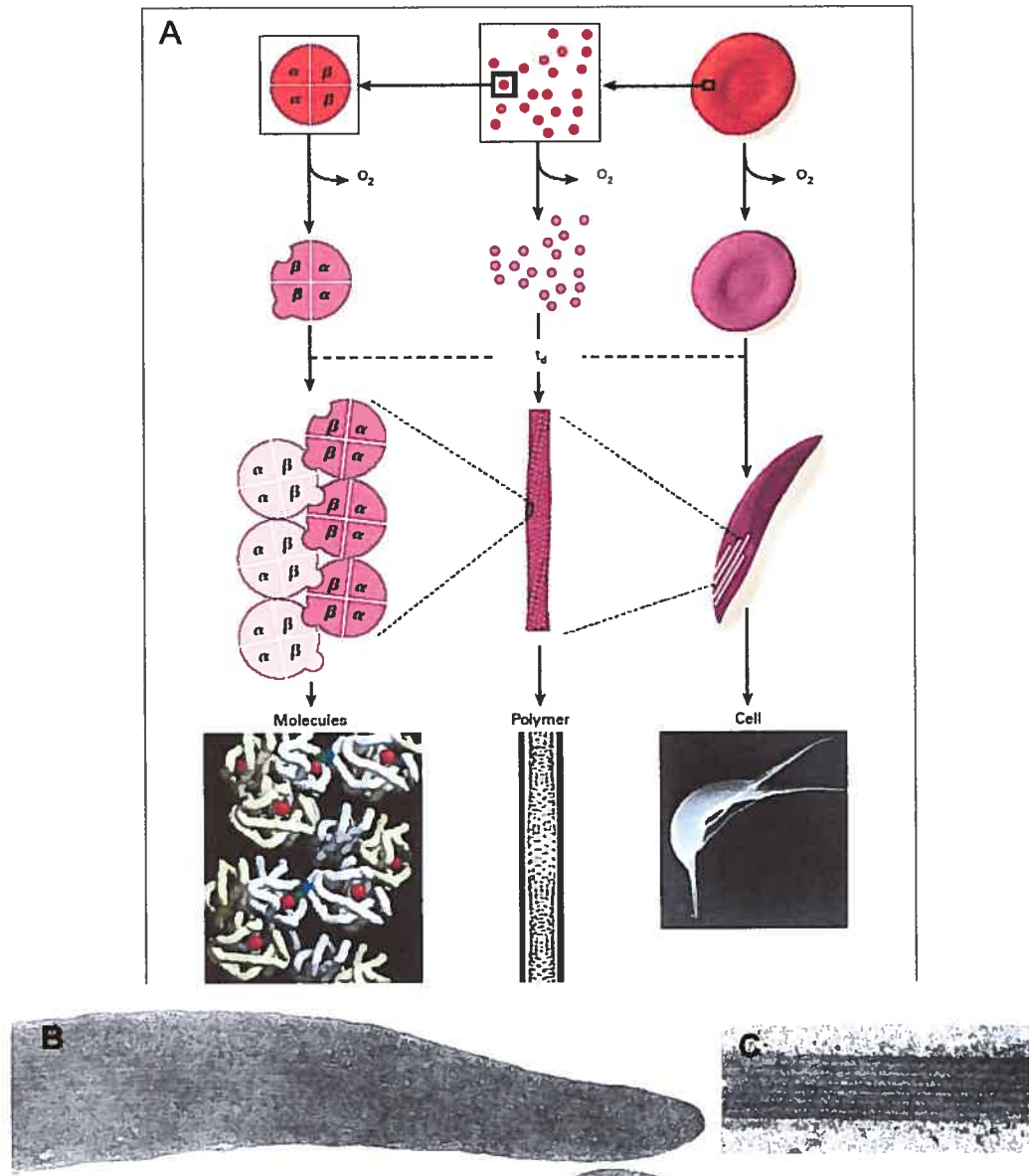


Figure 15 : A) Résumé du processus de faciformation⁽³⁹⁾. Lors du passage des globules rouges dans la microcirculation, l'oxygène est relâché de l'oxyhémoglobine (cercles rouges) générant la déoxyhémoglobine (cercles mauves). La partie gauche du diagramme illustre les molécules d'hémoglobine. La déoxygénation de l'hémoglobine S induit un changement de conformation de la molécule favorisant sa polymérisation. La partie centrale du diagramme montre l'assemblage de déoxyhémoglobine S en fibre hélicoïdale de structure spiralée. t_d représente le temps de délai entre la déoxygénation de l'hémoglobine et la polymérisation. La partie droite du diagramme présente les phénomènes visibles au niveau cellulaire. B) Section longitudinale d'un globule rouge drépanocytaire désoxygéné C) Section longitudinale montrant des fibres alignées de polymères d'hémoglobine S⁽⁸⁾.

2.7.2.3 Pathogenèse moléculaire

Tel que vu précédemment, les globules rouges contiennent de très fortes concentrations d'hémoglobine ce qui nécessite une extrême solubilité de cette protéine. Cependant, lorsque la concentration du sang en oxygène chute, les molécules de déoxyhémoglobine S s'agrègent et s'assemblent en longues fibres de polymères de structure hélicoïdale (Fig. 15A et C).

La vitesse de désoxygénation et la présence de forces de cisaillement dans la circulation sanguine influencent l'alignement intracellulaire des polymères d'HbS et par conséquent la forme des globules rouges⁽⁸⁾. Les globules rouges drépanocytaires désoxygénés lentement forment de longues fibres bien alignées et ceux désoxygénés très rapidement forment un grand nombre de très courtes fibres (Fig. 16).

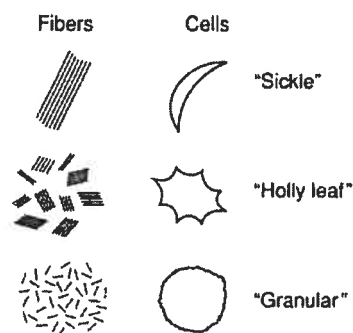


Figure 16 : Schéma montrant les types de fibres de polymères et les formes résultantes typiques de globules rouges : faucille ou croissant (« sickle »), feuille de houx (« holly leaf ») et granulaire (« granular »)(8).

Dans les globules rouges en forme de faucille ou croissant, les fibres d'hémoglobine S s'orientent sur l'axe long du globule rouge, pointant en direction des projections (Fig. 15 (B)). Le taux de formation de ces polymères dans un globule rouge drépanocytaire circulant dépend de trois variables : le degré de désoxygénation de la cellule, la concentration intracellulaire d'hémoglobine et la présence ou absence

d'hémoglobine fœtale. Toutefois, puisque le temps de transit des globules rouges dans la microcirculation est court et qu'il existe un temps de délai avant la polymérisation (désigné par t_d dans la figure 15) de l'HbS, plus de 80% des globules rouges ne formeront pas de polymères après leur passage dans les artérioles et capillaires⁽³⁹⁾. La polymérisation de l'hémoglobine S est l'événement principal de la pathogenèse de l'anémie falciforme causant une altération de la forme des globules rouges et une diminution de leur déformabilité.

De plus, la polymérisation de l'HbS entraîne des dommages de certains canaux ioniques de la membrane cellulaire (co-transporteur KCl et canal potassique activé par le Ca^{2+}) qui induisent la déshydratation et par conséquent l'augmentation de la densité cellulaire^(40; 41). Les patients drépanocytaires présentent une proportion substantielle d'érythrocytes à densité élevée. Puisque le taux de polymérisation de l'HbS désoxygéné dépend de la concentration intracellulaire d'hémoglobine, les cellules denses exposent une susceptibilité accrue à la déformation et à la rigidification. L'étape finale de ce processus sera la formation d'une cellule irréversiblement falciforme qui même lors de sa réoxygénation totale exhibe une forme allongée typique sans contenir des polymères d'HbS^(39; 41).

2.7.2.4 Physiopathologie

Les deux manifestations cliniques saillantes sont une sévère hémolyse et des épisodes d'occlusion vasculaire. Ces manifestations et les complications qu'elles entraînent sont discutées brièvement ici.

Occlusion vasculaire

L'occlusion vasculaire, pouvant affecter la micro- et la macro-circulation, est responsable de la majorité des complications cliniques des patients drépanocytaires (42). Il est incontestable que la polymérisation de l'HbS et la déshydratation cellulaire ainsi que la falciformation et la diminution de la déformabilité cellulaire qui en découlent, entraînent une obstruction vasculaire mécanique. Cependant, le mécanisme global d'obstruction vasculaire implique également des interactions complexes entre les érythrocytes, les leucocytes et l'endothélium vasculaire.

L'adhésion anormale de globules rouges drépanocytaires à l'endothélium vasculaire a d'abord été décrite *in vitro*, dans un système de culture statique et confirmée dans des systèmes statiques et dynamiques⁽⁴³⁾. Par la suite, Kaul *et al.* ont démontré, en utilisant une préparation *ex vivo* de mesocécum de rat, que les érythrocytes drépanocytaires en circulation adhèrent exclusivement aux veinules (Fig. 17 (A) et (B)), et que cette adhésion est en relation inverse avec le diamètre du vaisseau⁽⁴⁴⁾. De plus, les globules rouges qui adhèrent aux cellules endothéliales sont des cellules à faible densité (Fig. 17 (C) et (D)).

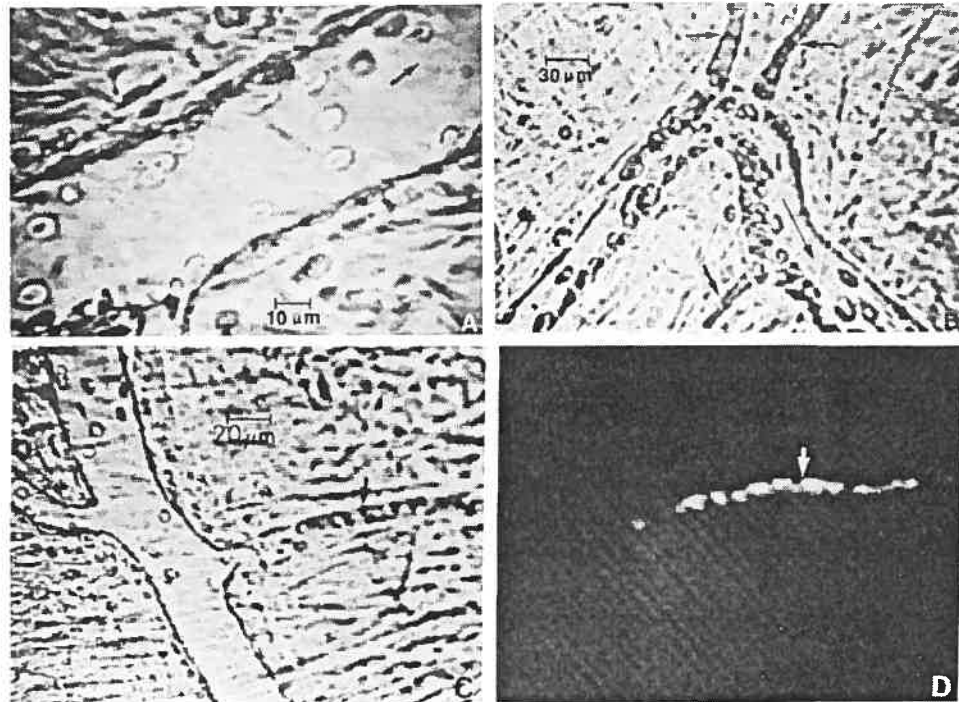


Figure 17 : Adhésion d'érythrocytes drépanocytaires à la paroi endothéliale. A) La flèche montre la direction du débit. B) Les petites flèches montrent des vaisseaux post-capillaires totalement occlus. C) La flèche montre un capillaire veineux obstrué qui rejoint une veinule présentant des globules rouges individuels adhérents. D) La même surface est observée sous épi-fluorescence. Les cellules denses marquées sont bloquées dans le capillaire veineux mais sont absentes de la veinule⁽⁴⁴⁾.

En se basant sur ces observations, Kaul *et al.* ont proposé un modèle d'occlusion vasculaire dans lequel les globules rouges drépanocytaires à faible densité adhèrent aux cellules endothéliales des veinules post-capillaires. La lumière des veinules étant diminuée, les cellules à haute densité et les cellules irréversiblement falciformées se retrouvent piégées et entraînent l'obstruction vasculaire (Fig. 18)⁽⁴³⁾.

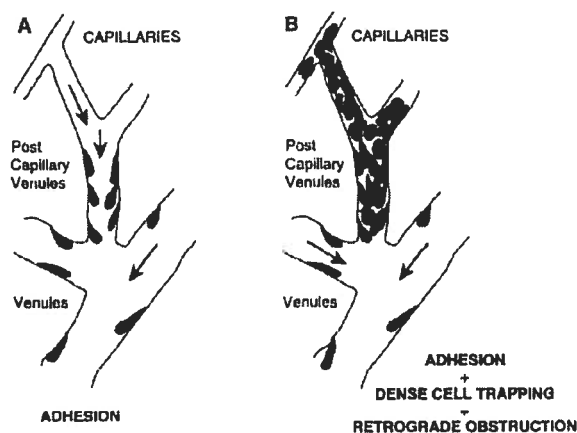


Figure 18 : Modèle d'obstruction vasculaire présenté par Kaul et al⁽⁴³⁾.

Les interactions moléculaires responsables de l'adhésion érythrocytaire aux cellules endothéliales dépendent de molécules d'adhésion présentes sur les globules rouges drépanocytaires et les cellules endothéliales activées des patients atteints⁽³⁹⁾. L'activation des cellules endothéliales joue un rôle important dans l'adhérence des globules rouges drépanocytaires et la pathogenèse des événements occlusifs vasculaires aigus.

Des observations cliniques suggèrent également que les leucocytes jouent un rôle dans la pathogenèse de l'anémie falciforme. Par exemple, l'augmentation du nombre de leucocytes chez les patients thalassémiques est associée à une augmentation de la mortalité⁽⁴⁵⁾ et des infarctus cérébraux⁽⁴⁶⁾. De plus, il y a une activation accrue des globules blancs chez les patients drépanocytaires et ces premiers sont capables d'activer à leur tour les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'adhésion des érythrocytes à la paroi vasculaire⁽⁴⁷⁾.

In vivo, chez des souris drépanocytaires, le nombre de leucocytes roulant et adhérant à la paroi endothéliale est significativement plus élevé que celui de souris

témoins. Les globules rouges drépanocytaires interagissent également avec ces leucocytes (Fig. 19)⁽⁴⁸⁾.

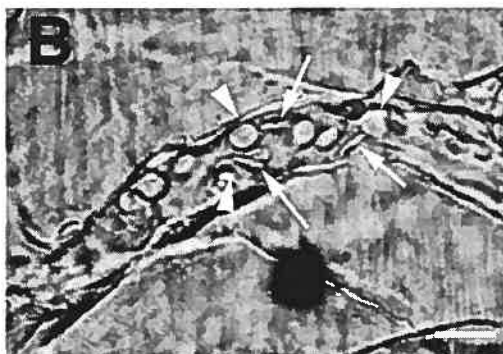


Figure 19 : Microscopie intravitale de la microcirculation dans le muscle crémaster de souris drépanocytaires. Les flèches montrent des érythrocytes ayant adhéré à des leucocytes (échelle graphique, 15 μm)⁽⁴⁸⁾.

Les cycles répétitifs de falciformation érythrocytaire suivie d'un retour à la forme normale causent l'oxydation de la membrane cellulaire et l'exposition de la ps et de l'immunoglobuline G sur la surface membranaire externe (49). Ce mécanisme pourrait expliquer l'adhésion érythrocytaire aux leucocytes. Subséquemment, Frenette propose un modèle alternatif de l'obstruction vasculaire dans lequel les leucocytes jouent un rôle clé dans l'initiation de l'occlusion vasculaire (Fig. 20)⁽⁴⁶⁾.

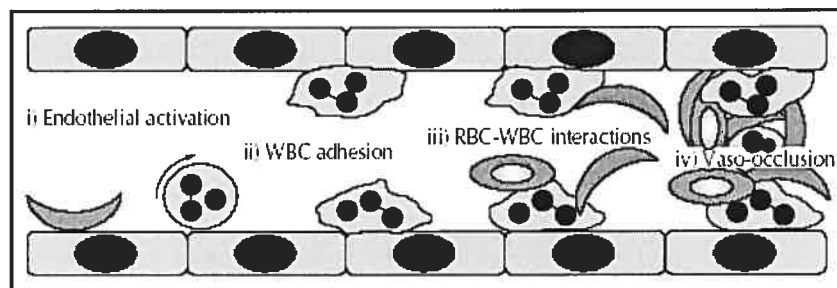


Figure 20 : Modèle d'obstruction vasculaire présenté par Frenette. L'occlusion s'effectuerait en 4 étapes : i) activation de l'endothélium par les leucocytes et érythrocytes, ii) adhésion des leucocytes (« WBC »), iii) interactions entre les érythrocytes et leucocytes, et iv) occlusion vasculaire⁽⁴⁶⁾.

Un troisième processus contribuant à l'occlusion vasculaire est l'agrégation érythrocytaire décrite par Morris *et al.*⁽⁵⁰⁾ et Schmid-Schönbein *et al.*⁽⁵¹⁾. Ces chercheurs ont montré *in vitro* qu'à faibles forces de cisaillement, comme par exemple dans la microcirculation, les globules rouges désoxygénés s'assemblent en agrégats typiques de rouleaux. Les forces nécessaires afin de disperser les agrégats d'érythrocytes drépanocytaires étaient supérieures à la normale. Bien que le mécanisme sous-jacent à l'augmentation de l'agrégation demeure inconnu, il impliquerait la présence de certaines protéines (fibrinogène et autres) dans le plasma^(50, 51).

Finalement, mentionnons qu'il existe également un phénomène d'hypercoagulation chez les patients drépanocytaires. Presque tous les mécanismes d'hémostase, incluant la fonction plaquettaire et les systèmes procoagulant, anticoagulant et fibrinolytique, sont altérés par l'anémie falciforme^(49, 52). Comme pour les patients β -thalassémiques, le mécanisme d'hypercoagulation est relié à l'exposition membranaire de PS causée par l'oxydation de la membrane cellulaire⁽⁴⁹⁾.

Anémie hémolytique

La durée de vie moyenne des globules rouges drépanocytaires n'est que de 15 à 25 jours⁽⁵³⁾. La destruction prématurée des globules rouges drépanocytaires, dans la microcirculation et les sinusoides de la rate, est due en partie à leur déshydratation et à leur rigidité. Ce processus d'hémolyse est amplifié par la reconnaissance et la destruction immunitaire^(8, 12). Tel que mentionné ci-haut, les érythrocytes subissent des dommages membranaires qui mènent à l'exposition de IgG et PS sur la surface membranaire externe. Ces molécules sont reconnues par les monocytes et macrophages qui s'y lient pour initier la phagocytose.

Complications cliniques

L'hémolyse et l'obstruction vasculaire sont responsables d'une grande partie des complications cliniques. Certaines complications sont similaires à celles décrites précédemment pour les patients β -thalassémiques. Ainsi, en raison de l'anémie hémolytique chronique, les patients souffrent parfois de splénomégalie, déformations osseuses, hépatomégalie, retard de croissance et de maturation sexuelle⁽⁵⁴⁾. Cependant, l'occlusion vasculaire est plus prononcée chez les patients drépanocytaires que ceux souffrant de β -thalassémie et elle affecte plusieurs systèmes physiologiques. Ces organes, sujets à l'ischémie récurrente, l'infarctus et la dysfonction chronique, incluent :

- les poumons (fibrose pulmonaire, hypertension pulmonaire, hypoxémie),
- le système nerveux central (infarctus cérébral, accidents vasculaires cérébraux),
- le système cardiovasculaire (insuffisance cardiaque, cardiomégalie),
- les reins (destruction médullaire rénale, insuffisance rénale),
- les yeux (obstruction artérielle rétinienne, décollement, cécité),
- et la peau (ulcération des jambes)⁽¹²⁾.

De plus, l'épisode de douleur aiguë représente une complication fréquente et typique de l'anémie falciforme. La douleur aiguë, pouvant affecter toute partie du corps, est le premier symptôme de la maladie chez plus de 25% des patients⁽⁸⁾. La durée moyenne des événements est de quelques jours. Ces épisodes sont causés par l'occlusion vasculaire et l'hypoxie tissulaire résultante dans une région possédant des récepteurs de la douleur et des nerfs^(8,10).

D'autre part, l'infection représente la cause principale de décès chez les enfants de 1 à 3 ans^(45, 55). La pneumonie d'origine pneumococcique (*Streptococcus pneumoniae*) est l'infection la plus fréquente⁽⁵⁵⁾. La sévérité des infections est attribuée aux dommages de la rate et à la détérioration de certains aspects de la fonction immunitaire (phagocytose, activation du complément)^(10, 54).

2.7.2.5 Survie

L'espérance de vie des patients drépanocytaires demeure diminuée en comparaison avec des sujets normaux (Fig. 21). Cependant, l'amélioration thérapeutique se reflète par une augmentation significative de l'espérance de vie.

Dans les années 80, les patients ne survivaient pas jusqu'à l'âge adulte; en 1994, une étude montre que l'âge moyen de décès chez ces patients américains est de 42 ans pour les hommes et 48 ans pour les femmes⁽⁴⁵⁾.

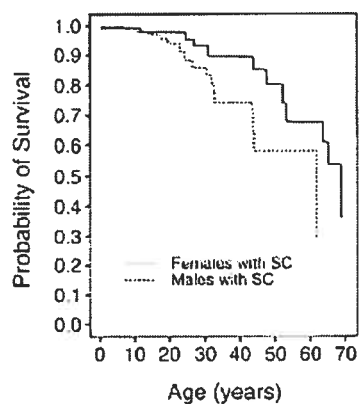


Figure 21 : Probabilité de survie chez des patients américains drépanocytaires⁽⁴⁵⁾.

2.7.2.6 Traitements

Traitements symptomatiques

Les soins cliniques accordés à la majorité des patients drépanocytaires sont de nature palliative⁸. Ces soins ciblent les nombreuses complications de l'anémie falciforme durant la vie du patient. Ces traitements, non-détaillés dans cette revue, incluent les transfusions sanguines, la prévention des infections, la gestion de la douleur, et d'autres thérapies spécifiques à chaque complication.

Autres traitements

Les études démontrent qu'un niveau élevé d'hémoglobine fœtale diminue la sévérité de l'anémie falciforme en prévenant la formation de polymères d'HbS (54). Il est démontré qu'il existe une relation inverse entre la fréquence d'apparition d'épisodes de douleur et les niveaux d'HbF (42). L'hydroxyurée, un agent utilisé pour le traitement du cancer, est le seul médicament employé pour l'induction de la production d'HbF chez les patients drépanocytaires. Ce médicament augmente la concentration intracellulaire d'HbF, ainsi que le nombre d'érythrocytes contenant l'HbF, améliore l'hydratation et la durée de vie des érythrocytes, diminue le nombre de globules rouges irréversiblement falciformés, augmente le délai de polymérisation de l'hémoglobine, et diminue l'adhérence des érythrocytes à l'endothélium (54). Une étude clinique multicentrique effectuée au Canada et aux États-Unis a démontré une diminution de la mortalité des patients drépanocytaires suite à l'administration d'hydroxyurée (56). Les effets secondaires principaux sont reliés à la cytotoxicité du

⁸ Les soins palliatifs ne visent pas le traitement de la maladie et de sa cause mais plutôt la réduction des symptômes et le maintien du confort physique et moral.

médicament et les concentrations de cellules sanguines doivent être assujettis à une surveillance attentionnée dès le début du traitement (42).

D'autres stratégies thérapeutiques, également décrites précédemment, visant la guérison totale de la drépanocytose incluent la transplantation de moelle osseuse et la thérapie génique.

2.7.3 Modèles de souris

Les modèles animaux présentant des hémoglobinopathies 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 b1 (β -majeur) et b2 (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. 22)⁽⁵⁷⁾. 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⁽⁵⁸⁾.

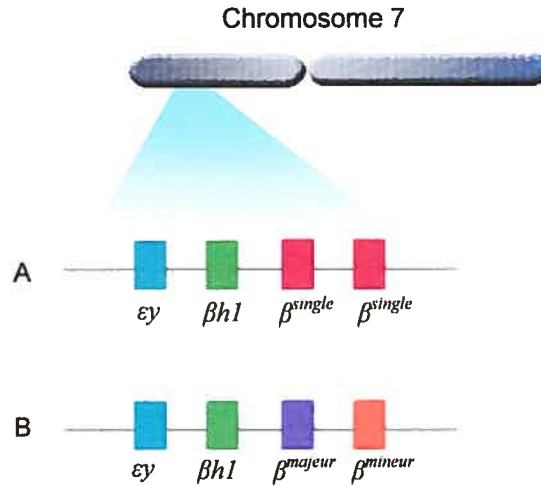


Figure 22 : Représentation schématique simplifiée du locus de la β -globine chez la souris. A) Haplotype Hbb^s . B) Haplotype Hbb^d .

Un premier modèle murin, correspondant à la β^+ -thalassémie est rapporté en 1983 et résulte d'une délétion du gène β -majeur de la β -globine⁽⁵⁷⁾. Environ 60% des souris homozygotes pour cette délétion survivent jusqu'à l'âge adulte. Les souris hétérozygotes n'exhibent qu'un phénotype semblable au trait thalassémique. Par la suite, des modèles murins de β^0 -thalassémie ont été développés en induisant des délétions des deux gènes de β -globine adulte : β -majeur et β -mineur^(58, 59). Les animaux homozygotes meurent *in utero*, tandis que les animaux hétérozygotes exposent une anémie sévère accompagnée d'une diminution importante des niveaux d'hémoglobine, une morphologie érythrocytaire anormale, la splénomégalie et une diminution de la durée de vie⁽⁵⁹⁾.

Plusieurs modèles de souris drépanocytaires ont été développés en introduisant des gènes de β -globine humaine mutée, ainsi que le gène d' α -globine humaine. Afin d'augmenter la sévérité de la maladie, deux groupes de chercheurs ont inactivé complètement les gènes de globine murins^(60; 61). Un autre modèle transgénique murin exprime le gène de l' α -globine humaine ainsi que le gène modifié

de β -globine humaine, nommé β^{SAD} , contenant les mutations responsables de l'hémoglobine S, l'hémoglobine S-Antilles et l'hémoglobine D-Punjab^(62; 63). Ce modèle présente des caractéristiques semblables à l'anémie falciforme humaine : anémie hémolytique chronique, falciformation érythrocytaire et augmentation de la densité érythrocytaire, occlusion vasculaire, splénomégalie et diminution de l'espérance de vie⁽⁶²⁾.

2.8 ÉCHOGRAPHIE

L'échographie est un outil diagnostique utilisé largement en médecine vétérinaire et humaine. Cette technique emploie les ultrasons afin d'obtenir des informations sur la structure des organes internes et sur la fonction cardiovasculaire.

Les ultrasons sont des ondes de pression inaudibles par l'oreille humaine puisque leur fréquence, ou leur nombre d'oscillations par seconde, excède 20 kHz. L'échographie clinique emploie généralement des fréquences entre 2 et 15 MHz.

Les systèmes d'échographie produisent des ultrasons grâce à des transducteurs composés d'éléments piézo-électriques qui vibrent lorsqu'exposés à de faibles courants électriques. Ces mêmes transducteurs servent non seulement d'émetteur mais également de récepteur ultrasonore puisqu'ils peuvent effectuer la transformation inverse.

Les ultrasons se propagent dans un milieu échogène par une série de compressions et de dépressions mécaniques des volumes élémentaires de diffuseurs qui le composent. La réflexion et la diffusion du son dans un milieu, permettant la production d'images acoustiques, sont dépendantes de variations de son impédance acoustique (Z) :

$$Z = \rho \cdot c, \quad (3)$$

où ρ est la densité du milieu et c la vitesse de propagation des ultrasons. Pour la plupart des tissus biologiques mous, la vitesse de propagation des ultrasons est approximativement 1540 m/s (64). À une interface tissulaire, les ondes ultrasonores sont réfléchies si les impédances acoustiques des tissus formant l'interface sont différentes. La quantité d'énergie ultrasonore réfléchie est proportionnelle à la différence d'impédance acoustique des deux tissus. D'autre part, lors de leur propagation dans un milieu les ondes ultrasonores sont atténuées à cause de l'absorption thermique et de la rétrodiffusion.

2.8.1 Techniques d'échographie

Les méthodes d'imagerie ultrasonore couramment utilisées en clinique sont le mode B, le mode M et le mode Doppler.

L'échographie mode B fournit, en temps réel, une image bidimensionnelle d'une section transversale du tissu imagé (Fig. 23A). Le faisceau ultrasonore doit être balayé, soit mécaniquement ou électroniquement, au-dessus de la région d'intérêt. Le signal ultrasonore est alors transmis sur plusieurs lignes et les ondes réfléchies sont captées et combinées produisant une image bidimensionnelle. Ce mode fournit des informations sur la structure, l'apparence et la dimension d'un organe cible.

L'échographie mode M est généralement utilisée pour imager le cœur. Le mode M est obtenu par la transmission d'un faisceau ultrasonore au-dessus d'une seule ligne de l'organe cible. L'image ainsi obtenue est visualisée en fonction du temps (Fig. 23B). Ce mode permet essentiellement la mesure des diamètres intérieurs et épaisseurs de la paroi des chambres cardiaques.

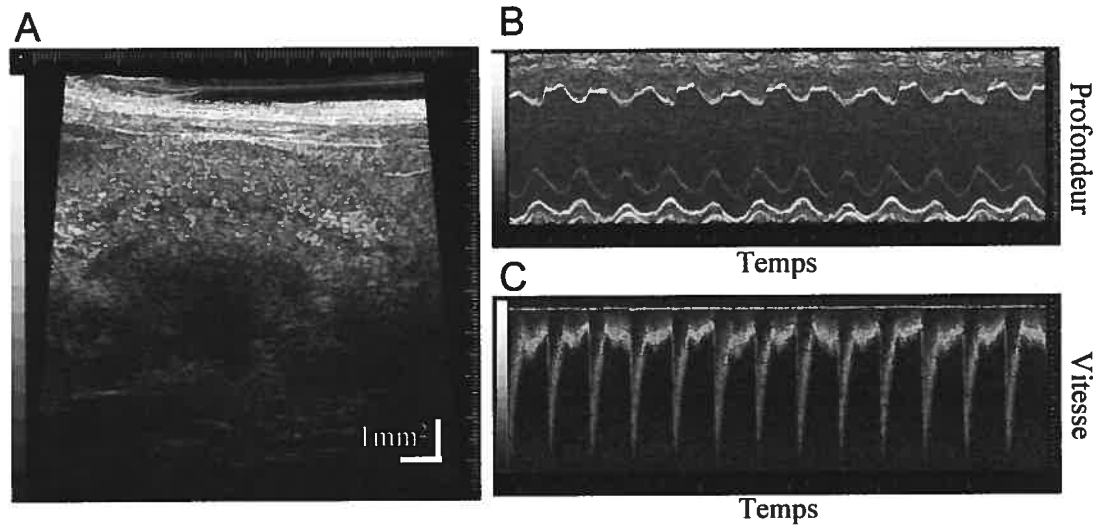


Figure 23 : Modalités d'imagerie. A) Échographie mode B du rein en coupe longitudinale. B) Échographie mode M du ventricule gauche. C) Échographie Doppler de l'aorte abdominale. Ces mesures ont été obtenues chez la souris à l'aide d'un biomicroscope acoustique Vevo 660 (Visualsonics, Toronto, Canada).

L'échographie Doppler emploie la réflexion des ondes ultrasonores par les globules rouges en mouvement afin de caractériser l'écoulement sanguin (Fig. 23C). L'information sur la vitesse de l'écoulement est déterminée par effet Doppler. Les ondes ultrasonores sont transmises par le transducteur à une fréquence connue. Si le sang se déplace en se rapprochant vers le transducteur, alors la fréquence de l'onde ultrasonore réfléchi sera augmentée, et vice versa (Fig. 24). Le décalage en fréquence (Δf) de l'onde réfléchi par rapport à l'onde émise dépend de la fréquence de cette dernière (f), de la vitesse des globules rouges (v), de la vitesse de propagation des ultrasons dans les tissus (c) et de l'angle formé entre le faisceau ultrasonore et la direction de l'écoulement sanguin (θ). Ainsi, la formule suivante permet le calcul de la vitesse des globules rouges :

$$v = \frac{\Delta f \cdot c}{2f \cdot \cos \theta} \quad (4)$$

L'échographie Doppler permet de recueillir des informations hémodynamiques cardiaques et vasculaires.

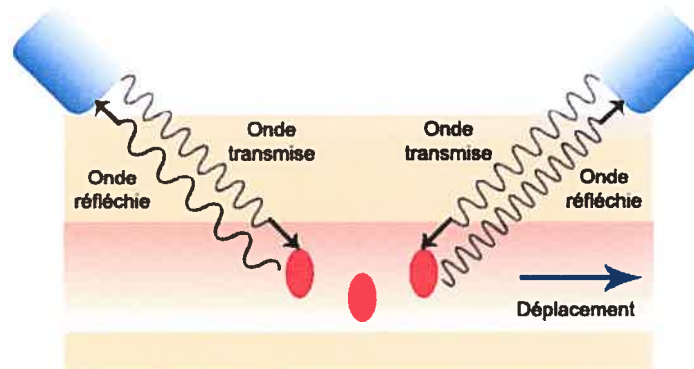


Figure 24 : Représentation schématique de l'effet Doppler dans le sang.

2.9 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

La lecture de la documentation scientifique révèle la présence de plusieurs phénomènes perturbant l'hémodynamique de la circulation sanguine chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires. Cependant, ces perturbations et les effets qui en découlent peuvent difficilement être étudiés chez les patients puisque ces derniers doivent subir des traitements permettant leur survie. Ces traitements peuvent d'une part masquer les désordres et d'autre part contribuer à la manifestation d'effets secondaires confondants.

L'objectif général de notre étude était donc d'établir une méthode non-invasive permettant de quantifier les perturbations hémodynamiques associées aux atteintes de la circulation sanguine chez des modèles de souris transgéniques β -thalassémiques et drépanocytaires. Notre étude s'est basée sur les hypothèses suivantes :

1. Les désordres de la circulation sanguine causés par la β -thalassémie et l'anémie falciforme entraînent chez les modèles de souris transgéniques une augmentation de la résistance vasculaire à l'écoulement sanguin.
2. L'augmentation de la résistance vasculaire peut être mesurée par une technique ultrasonore non-invasive.

Le premier objectif était de vérifier l'effet hémodynamique des hémoglobinopathies en évaluant la résistance vasculaire à l'écoulement sanguin. Afin d'atteindre cet objectif, l'index de résistance de Pourcelot et la résistance périphérique totale ont été évalués. Le deuxième objectif était d'étudier la fonction cardiaque chez les souris pathologiques. Pour réaliser cet objectif la fonction ventriculaire gauche était évaluée par échocardiographie.

CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE

3.1 MATÉRIEL

3.1.1 Imagerie ultrasonore à haute fréquence

La résolution spatiale ou bien la capacité de distinguer avec précision deux structures rapprochées, est une caractéristique importante de l'imagerie ultrasonore. Cette résolution dépend directement de la fréquence ultrasonore employée. Les appareils ultrasonores cliniques utilisant des fréquences de 2 à 12 MHz possèdent une résolution spatiale axiale de l'ordre de 770 à 128 μm , ce qui est suffisant pour l'étude échographique des tissus et organes humains. Cependant chez la souris, les structures anatomiques étant beaucoup plus petites, cette résolution est insuffisante. Afin d'adapter l'imagerie ultrasonore à l'échelle murine, des appareils échographiques employant des fréquences plus élevées, entre 20 et 100 MHz, ont été développés.

3.1.1.1 Biomicroscope ultrasonore Vevo 660

Le biomicroscope ultrasonore Vevo 660 est un appareil d'échographie développé par la compagnie Visualsonics (Toronto, Canada) pour la visualisation *in vivo*, non effractive, de structures anatomiques chez des petits animaux (Fig. 25 A et B). Les fréquences moyennes utilisées varient entre 25 et 55 MHz et permettent de visualiser les structures tissulaires avec une résolution axiale microscopique de 62 à 28

μm . Tel un appareil d'échographie clinique, le Vevo 660 permet l'imagerie en mode B, mode M et mode Doppler pour étudier l'écoulement sanguin.

Le balayage mécanique sectoriel d'un transducteur composé d'un seul élément piézo-électrique permet de recueillir les données servant à former l'image échographique (Fig. 25 C).

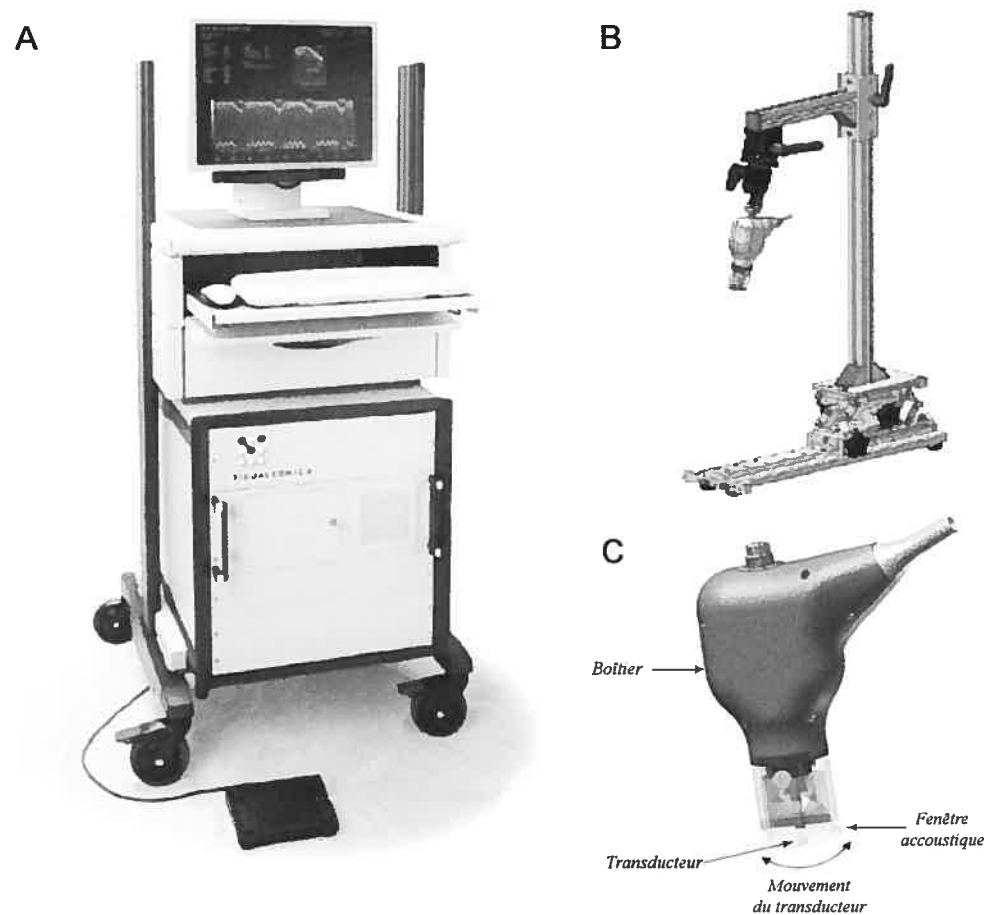


Figure 25 : A) Biomicroscope ultrasonore Vevo 660. B) Rail de support pour la sonde ultrasonore. C) Sonde ultrasonore. (source : Visualsonics, Toronto, Canada)

3.1.2 Mesure non effractive de la pression artérielle murine

Le système XBP-1000 de la compagnie Kent Scientific (Torrington, Connecticut, USA) permet de mesurer la pression systolique de l'artère caudale et la fréquence cardiaque (Fig. 26A). Ce système détecte la distension causée par la pulsation de l'artère caudale grâce à un capteur piézo-électrique. Le ballonnet d'occlusion et le capteur de pulsation sont séparés et sont appliqués légèrement sur la queue de l'animal (Fig. 26B).

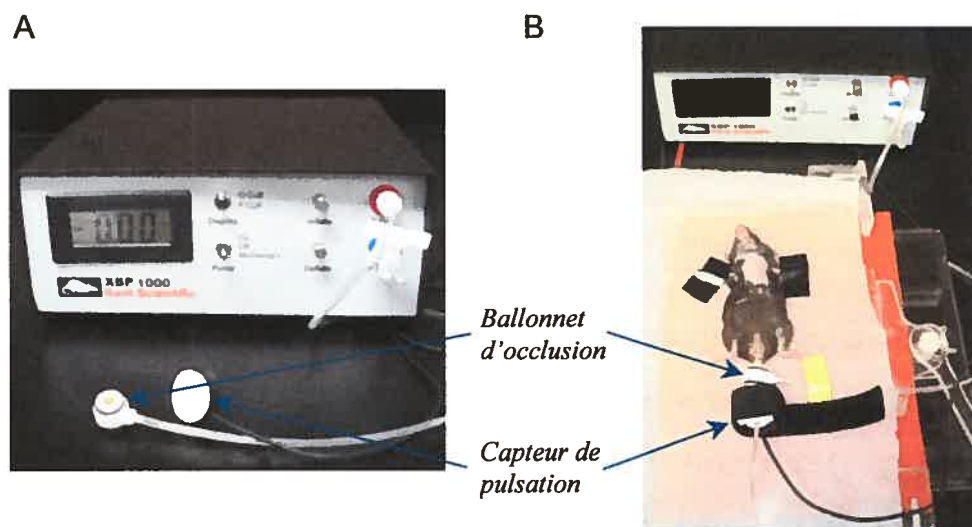


Figure 26 : Système XBP-1000 (Kent Scientific, Torrington, Connecticut, USA).

Deux signaux sont enregistrés par l'appareil pour la mesure de la pression artérielle caudale : la pression du ballonnet d'occlusion et le signal de pulsation (Fig. 27). Au début de chaque mesure de la pression artérielle, la pompe automatique du XBP-1000 gonfle rapidement le ballonnet d'occlusion à une pression de 250 mmHg, pression grandement supérieure à la pression systolique. Ceci bloque la circulation sanguine dans l'artère caudale et par conséquent aucune pulsation n'est perçue en aval de cette occlusion. Cette pression est appliquée durant 5 secondes. Ensuite, la

pression dans le ballonnet est diminuée lentement sur une période de 10 à 20 secondes. Lorsque la pression appliquée par le ballonnet devient inférieure à la pression artérielle, l'écoulement sanguin reprend dans l'artère caudale et les pulsations sont de nouveau perceptibles. La pression systolique est enregistrée lors de la première pulsation détectée par le capteur.

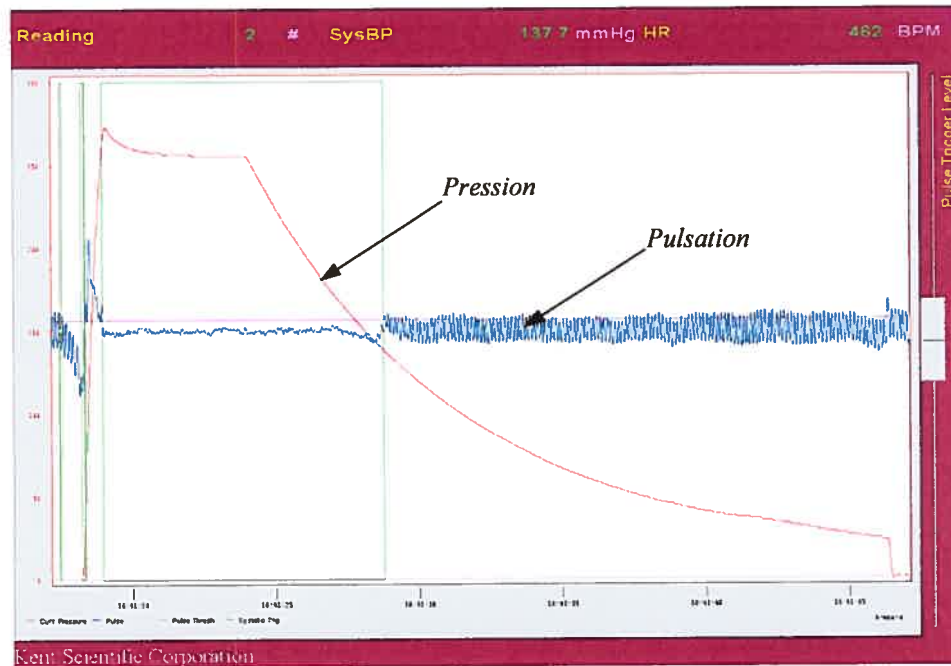


Figure 27 : Signaux obtenus par le XBP-1000 (Kent Scientific, Torrington, Connecticut, USA) lors de la mesure de la pression systolique. La ligne bleue représente la pulsation et la ligne rouge la pression dans le ballonnet d'occlusion.

Plusieurs auteurs ont démontré qu'il existe une bonne concordance entre la pression intra-artérielle systolique mesurée par une méthode standard effractive et sa mesure par les systèmes non effractifs dans l'artère caudale⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Cependant, la pression artérielle systolique mesurée au niveau de l'artère caudale est mieux corrélée avec les valeurs de pression moyenne, qu'avec les valeurs de pression systolique^(66, 67).

Cette observation s'expliquerait par le gradient de pression entre les sites de mesure des deux méthodes : l'artère carotide et l'artère caudale.

3.2 MÉTHODES

Le protocole expérimental a été approuvé par les comités d'éthique de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM) et du Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Les procédures concordent avec les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). Toutes les souris ont généreusement été prêtées par le Laboratoire de Génétique Moléculaire et de Développement dirigé par le Dr. Marie Trudel de l'IRCM.

3.2.1 Procédure de préparation à l'étude échographique

Les souris sont pesées et anesthésiées par une injection intra-péritonéale d'une solution de 0,015 mL/g de 2,2,2-tribromoéthanol (Avertin) à 2,5%. Afin de maintenir la température corporelle de la souris à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, cette dernière est placée sur une surface chauffante et sous une lampe chauffante et la température est mesurée par une sonde rectale (modèle RET-3) couplée au système de surveillance Thermalert TH-5 (Physitemp Instruments, Clifton, NJ).

Le maintien de l'animal à une température physiologique est essentiel. D'une part, l'hypothermie diminue la circulation sanguine de l'artère caudale et la pulsation, nécessaire à la mesure de la pression artérielle, devient difficilement détectable. D'autre part, l'hypothermie affecte l'hémodynamie corporelle globale ce qui pourrait influencer nos mesures de résistance périphérique à l'écoulement sanguin.

Les régions anatomiques sous étude échographique, soit la région antérieure du cou, la région lombaire et la région précordiale, sont épilées avec une solution commerciale dépilatoire (Nair, Church & Dwight Co., Princeton, NJ, USA).

3.2.2 Évaluation de la résistance périphérique à l'écoulement sanguin

Trois groupes de souris étaient sous étude : 17 souris β -thalassémiques (Hbb^{thl}/Hbb^{thl}), 12 souris drépanocytaires (2 souris $\alpha^{-/-}$ SAD et 10 souris SAD), et 20 souris témoins (C57Bl6)⁹.

3.2.2.1 Mesure de l'index de résistance de Pourcelot

Définition

L'index de résistance (IR) est un paramètre communément utilisé en radiologie afin de caractériser les profils de vitesse d'échographie Doppler artériels.

L'IR se définit par la relation⁽⁶⁸⁾ :

$$IR = \frac{(S - D)}{S} \quad (5)$$

où S représente la vitesse systolique maximale et D la vitesse en fin de diastole (Fig. 28). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que l'index de résistance est relié à la résistance vasculaire^(69; 70).

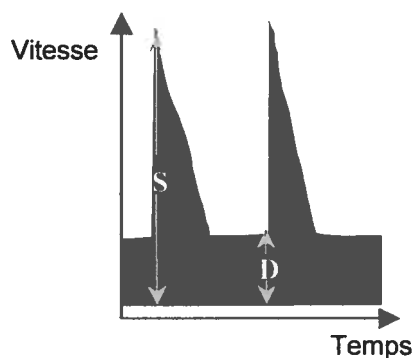


Figure 28 : Mesures de la vitesse systolique maximale (S) et de la vitesse en fin de diastole (D) obtenues d'un échogramme Doppler artériel.

⁹ Les modèles de souris Hbb^{thl}/Hbb^{thl} , $\alpha^{-/-}$ SAD et SAD sont produits sur un fond génétique de souris C57Bl6.

Protocole

La souris est placée en position de décubitus dorsal ou ventral pour l'étude, respectivement, de l'artère carotide commune ou de l'aorte abdominale. Du gel échographique pré-tempéré à 37°C est placé sur la région d'intérêt. Des images échographiques en mode-B longitudinales et transverses sont obtenues avec l'appareil Vevo 660 et une sonde de 40 MHz.

L'imagerie en mode B permet la localisation du vaisseau et le positionnement du volume d'échantillonnage en mode Doppler. Les profils de vitesse Doppler sont enregistrés dans l'artère carotide avant la bifurcation subdivisant l'artère en carotide interne et externe (Fig. 29), ainsi que dans l'aorte abdominale avant la bifurcation de l'artère rénale (Fig. 30), en utilisant le rein comme point de référence. Des signaux Doppler sont enregistrés pour chaque vaisseau durant 2 secondes. L'animal est surveillé jusqu'à son réveil.

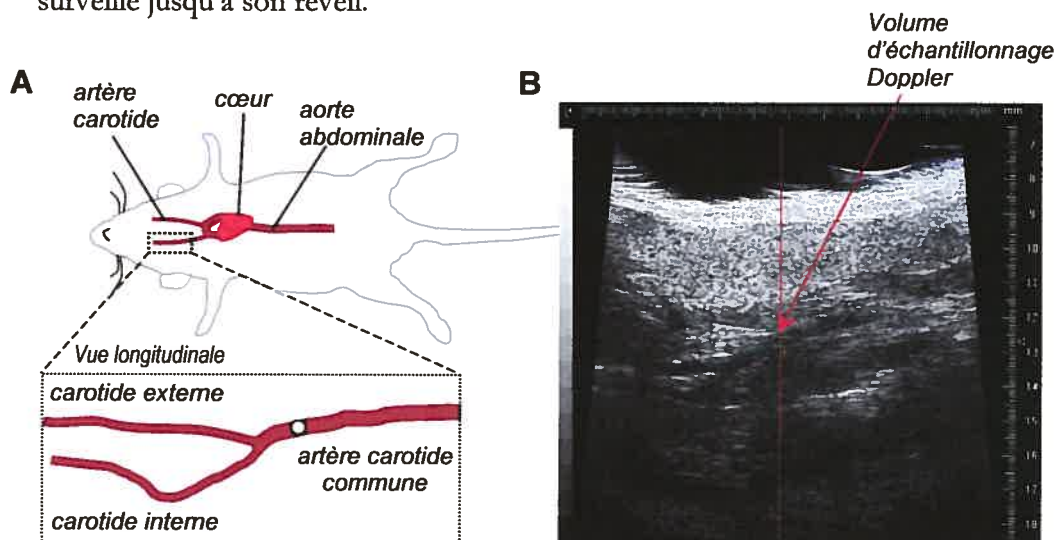


Figure 29 : A) Schéma illustrant le positionnement de la souris en décubitus dorsal. Le point de mesure Doppler est illustré par (o). B) Image échographique de la carotide en coupe longitudinale montrant le volume d'échantillonnage Doppler.

Des mesures manuelles sont effectuées en utilisant le logiciel MATLAB afin de calculer la valeur maximale de la vitesse systolique (S) et la valeur de la vitesse en fin de diastole (D). Les index de résistance de Pourcelot sont moyennés sur 10 cycles cardiaques.

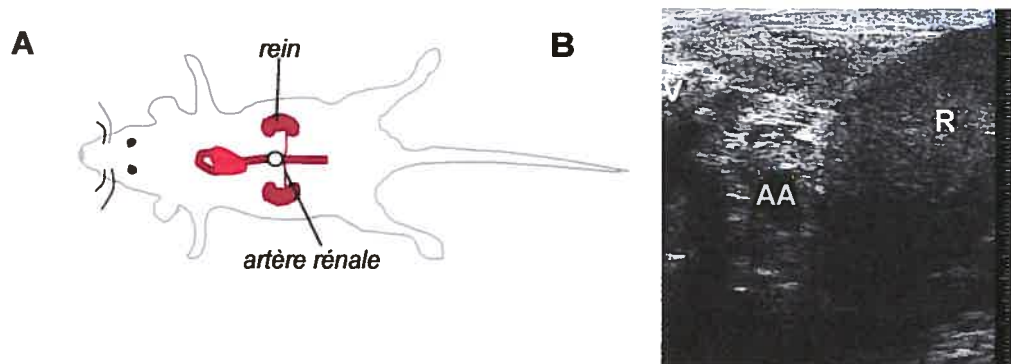


Figure 30 : A) Schéma illustrant le positionnement de la souris en décubitus ventral. Le point de mesure Doppler est illustré par (o). B) Image en mode B de l'aorte abdominale (AA) en coupe transverse montrant le rein (R) comme repère de mesure et une vertèbre (V).

3.2.2.2 Mesure de la résistance périphérique totale

Définition

La résistance périphérique totale peut être calculée par la relation :

$$RPT = \frac{MAP - CVP}{Q} \quad (6)$$

où MAP représente la pression artérielle moyenne, CVP , la pression veineuse centrale et Q , le débit cardiaque (3). Étant donné que la pression dans les grandes veines est très faible en comparaison avec la pression artérielle moyenne, cette première est généralement considérée comme nulle et la formule de la résistance s'écrit alors :

$$RPT = \frac{MAP}{Q} \quad (7)$$

Débit cardiaque

Jusqu'à présent, le débit cardiaque murin a été évalué par plusieurs méthodes, telles que la thermodilution, les microsphères radioactives ou fluorescentes, la mesure de la conductance du ventricule gauche, l'échocardiographie, ou l'imagerie par résonance magnétique⁽⁷¹⁾. Cependant, les valeurs de débit cardiaque et de volume d'éjection systolique varient grandement entre les auteurs.

Le débit peut être calculé à partir d'images échographiques en mode B et de profils de vitesse Doppler, obtenus par Doppler pulsé, en utilisant les équations suivantes :

$$CSA = \left(\frac{AoD}{2} \right)^2 \cdot \pi \quad (8)$$

$$SV = CSA \cdot VTI \quad (9)$$

$$Q = SV \cdot Fc \quad (10)$$

où, CSA est l'aire de la surface transverse de l'aorte à la sortie du ventricule gauche, AoD , le diamètre de l'aorte, SV , le volume d'éjection systolique, VTI , l'intégrale de la vitesse Doppler aortique en fonction du temps (Fig. 31), et Fc , la fréquence cardiaque⁽⁷²⁾.

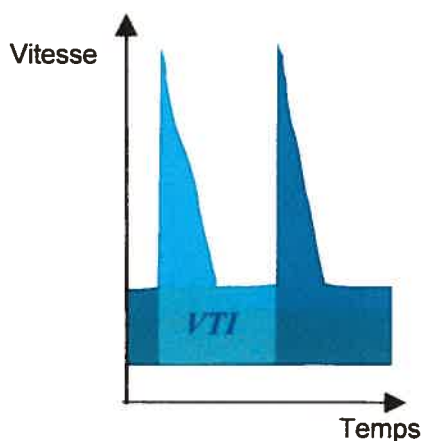


Figure 31 : Mesure de l'intégrale de la vitesse en fonction du temps (VTI) obtenue d'un échogramme Doppler artériel.

Protocole

Du gel échographique est placé sur la région précordiale. L'imagerie échographique en mode B est effectuée dans le cœur avec une sonde de 35 MHz permettant de localiser l'aorte. Des images en mode B de l'aorte en coupe longitudinale sont enregistrées. La sonde échographique est ensuite inclinée afin de créer un angle inférieur ou égal à 60° entre le faisceau ultrasonore et l'aorte (Fig. 32B). Le signal Doppler de la vitesse aortique est enregistré au niveau de l'aorte ascendante¹⁰ (Fig. 32A). Une correction automatique pour l'angle est effectuée en plaçant la ligne d'angle Doppler parallèle à la paroi vasculaire.

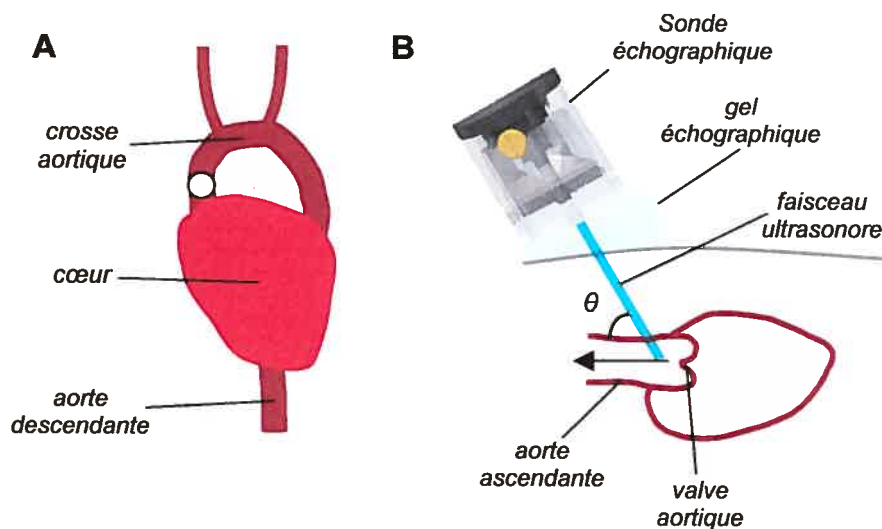


Figure 32 : A) Représentation schématique du cœur et de l'aorte montrant le point de mesure (o) de la vitesse Doppler aortique. B) Schéma de la vue longitudinale du cœur, illustrant l'inclinaison, d'angle θ , de la sonde échographique par rapport à l'aorte. La flèche illustre la direction du débit sanguin.

¹⁰ Partie de l'aorte entre le ventricule gauche et l'arc aortique.

La pression systolique de l'artère de la queue et la fréquence cardiaque (F_c) sont évaluées avec l'appareil XBP 1000 (Kent Scientific, Torrington, Connecticut, USA). Cette valeur de pression systolique est considérée comme la valeur de la pression artérielle moyenne (MAP).

L' AoD , au niveau du site d'acquisition du signal Doppler, est mesuré manuellement dans l'application de l'appareil Vevo 660 sur 6 à 10 images longitudinales consécutives en mode B de l'aorte. L'intégrale de la vitesse aortique est calculée par le logiciel MATLAB en traçant manuellement le contour de la vitesse Doppler. Le VTI est moyennée sur 10 cycles cardiaques. Le débit cardiaque est indexé par rapport aux poids corporel et est exprimé en millilitres par minute par gramme de masse corporelle. La résistance périphérique totale (RPT) est calculée à l'aide de l'équation (4).

3.2.3 Évaluation de la fonction cardiaque

Trois groupes de souris étaient sous étude : 18 souris β -thalassémiques (Hbb^{th}/Hbb^{th}), 12 souris drépanocytaires (2 souris $\alpha^{-/-}$ SAD et 10 souris SAD), et 14 souris témoins (C57Bl6).

Comme pour la mesure du débit cardiaque (équation 5) ou de la résistance périphérique totale (équation 3), une sonde de 35 MHz est utilisée pour localiser le cœur par imagerie bidimensionnelle, mode B. La sonde est placée suivant l'axe longitudinal du cœur afin de visualiser le ventricule gauche. La ligne d'échantillonnage du mode M est placée au niveau des muscles papillaires et des images en mode M sont enregistrées (Fig. 33).

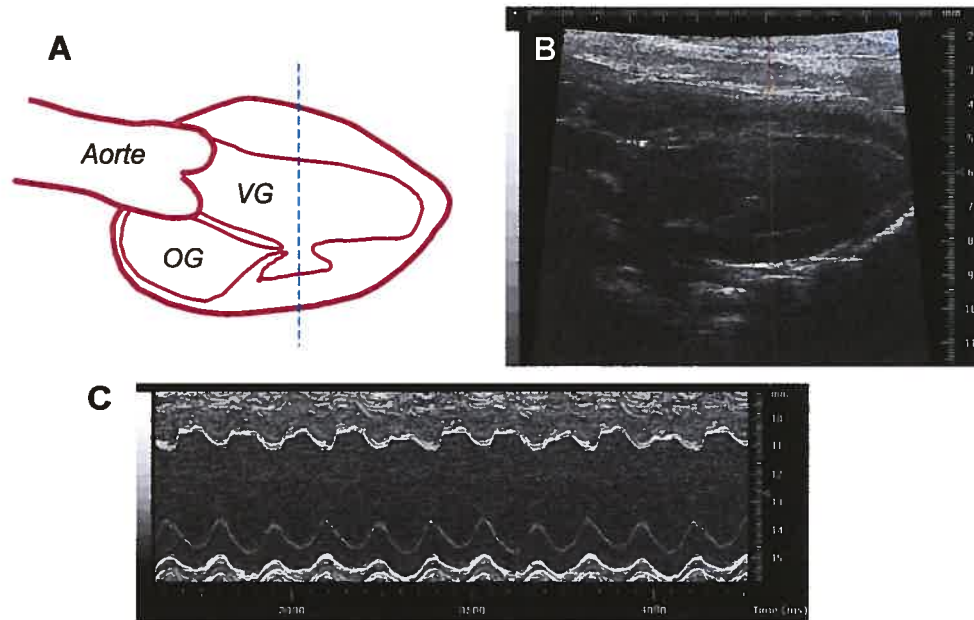


Figure 33 : A) Représentation schématique du cœur en coupe longitudinale montrant le point d'acquisition du mode M. VG : ventricule gauche et OG : oreillette gauche. B) Image en mode B d'un cœur de souris avec ligne d'échantillonnage du mode M. C) Image en mode M correspondante.

À partir des images en mode M, les diamètres diastoliques et systoliques du ventricule gauche (LVDD et LVSD) sont mesurés en se basant sur les directives de la Société Américaine d'Échocardiographie⁽⁷³⁾. La fraction de raccourcissement (FS pour «Fractional Shortening») du ventricule gauche est calculée par la formule :

$$FS = \frac{(LVDD - LVSD)}{LVDD} \quad (11)$$

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS

4.1 ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE

L'objectif de cette étude était de connaître s'il existait des différences hémodynamiques entre les souris transgéniques β -thalassémiques et drépanocytaires en comparaison avec un groupe témoin. Ainsi, toutes les analyses statistiques présentées dans ce chapitre comparent les deux groupes de souris transgéniques au groupe témoin. Aucune comparaison ne sera faite entre les souris β -thalassémiques et drépanocytaires.

4.1.1 Caractéristiques des animaux

L'obtention d'animaux transgéniques était très difficile puisque les souris β -thalassémiques et drépanocytaires sont sévèrement atteintes et qu'elles présentent une durée de vie limitée.

Le tableau 1 résume les caractéristiques générales des trois groupes expérimentaux sous étude. En comparaison avec le groupe des souris témoins, l'âge moyen des souris thalassémiques était significativement supérieur ($p < 0.01$) et celui des souris drépanocytaires était significativement inférieur ($p < 0.001$). Ainsi, la moyenne d'âge était de 8.7 mois pour le groupe témoin, de 9.4 mois pour le groupe thalassémique et de 4.0 mois pour le groupe drépanocytaire.

Paramètre	Témoin	Thalassémique	Drépanocytaire
<i>n</i>	20	17	12
Âge (mois)	8.7 ± 3.1 (35.3)	9.4 ± 1.5* (16.0)	3.7 ± 1.1† (31.5)
Poids (g)	28.4 ± 2.8 (9.7)	25.5 ± 2.5* (9.8)	23.0 ± 3.4† (14.8)
Pression artérielle (mmHg)	79.9 ± 15.7 (19.6)	84.7 ± 16.1 (19.0)	94.1 ± 17.8* (19.0)

Tableau 1 : Caractéristiques générales du groupe témoin, thalassémique et drépanocytaire. Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type. Les valeurs entre parenthèse sont les coefficients de variation ($CV = \text{écart-type} \div \text{moyenne} \times 100\%$). L'analyse statistique était un test de Student bilatéral et non pairé (test de λ). * $p < 0.01$ et † $p < 0.001$

Cependant, le poids des souris thalassémiques et drépanocytaires était significativement inférieur à celui des souris témoins ($p < 0.01$ et $p < 0.001$). En effet, le poids moyen des souris témoins était de 28.4 g, et celui des souris thalassémiques et drépanocytaires de 25.5 g et 23.0 g, respectivement. Malgré l'âge moyen supérieur des souris thalassémiques, leur poids moyen demeure inférieur. Les valeurs de pression artérielle systolique caudale étaient de 79.9 mmHg pour le groupe témoin, 84.7 mmHg pour le groupe thalassémique et 94.1 mmHg pour le groupe drépanocytaire. La différence entre la pression artérielle du groupe drépanocytaire et celle du groupe témoin était significative ($p < 0.01$).

4.1.2 Évaluation de l'index de résistance de Pourcelot

La figure 34 montre des profils de vitesse Doppler dans l'artère carotide commune chez une souris témoin et une souris drépanocytaire. Notons que les vitesses systoliques chez les deux souris semblent similaires. Cependant, une diminution peut être observée au niveau de la vitesse diastolique. Des signes de

reflux¹¹ se manifestent également chez la souris pathologique. Ces constatations n'étaient pas isolées et se présentaient chez d'autres souris thalassémiques et drépanocytaires.

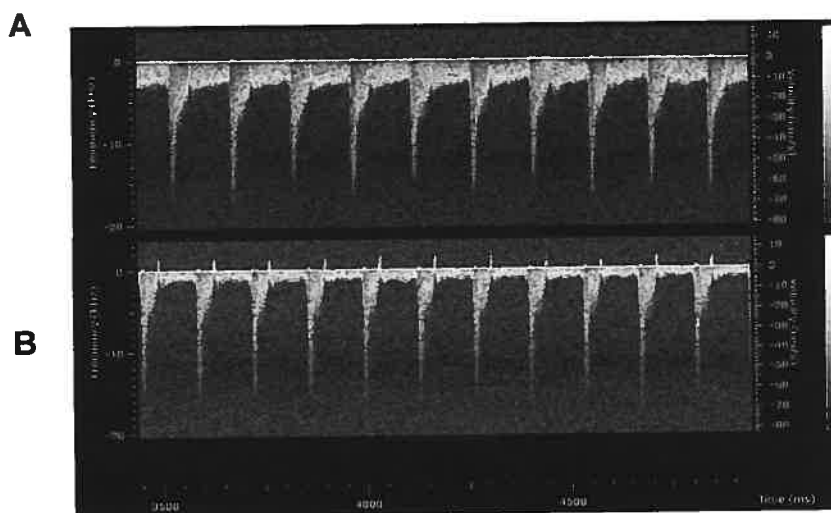


Figure 34 : Signaux Doppler de la vitesse dans l'artère carotide commune. A) Chez une souris témoin. B) Chez une souris drépanocytaire.

Les valeurs des index de résistance de Pourcelot sont présentées à la figure 35. Dans l'aorte abdominale, l'index de résistance moyen était de 0.794 pour les souris témoins, 0.822 pour les souris β -thalassémiques et 0.800 pour les souris drépanocytaires.

Dans l'artère carotide, les index de résistance moyens étaient de 0.830, 0.867 et 0.858, pour les groupes témoin, β -thalassémique et drépanocytaire, respectivement. Les coefficients de variation sur les index de résistance dans l'artère carotide pour les souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires étaient de 3.8

¹¹ Passage du sang dans le vaisseau dans le sens opposé au sens physiologique.

%, 3.4 % et 3.8 %, respectivement; dans l'aorte abdominale, ces coefficients de variation étaient de 4.0 %, 5.8 % et 3.5 %.

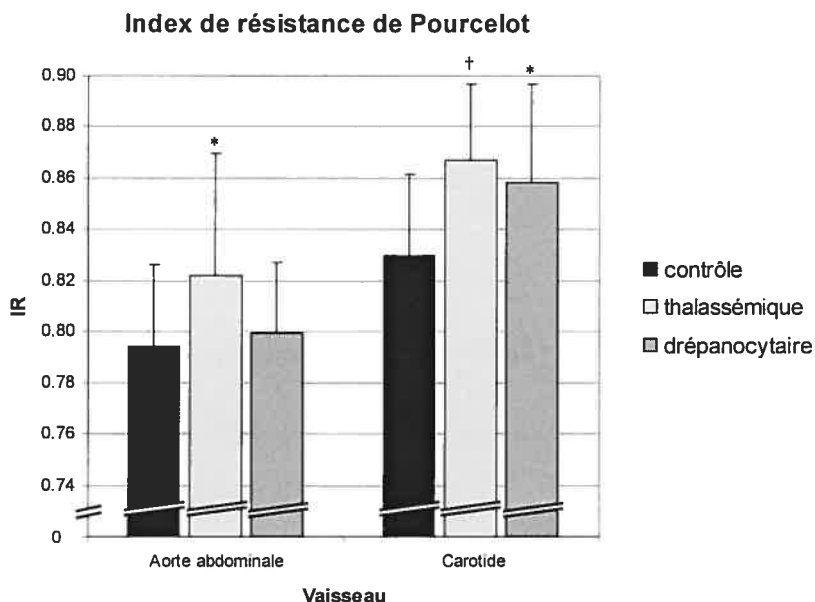


Figure 35 : Diagramme montrant les valeurs moyennes d'index de résistance de Pourcelot dans l'aorte abdominale et l'artère carotide chez des souris témoins, thalassémiques et drépanocytaires. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge, le poids et la pression artérielle comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA). Les barres d'erreur montrent l'écart-type. * $p < 0.05$ et † $p < 0.001$

Dans l'aorte abdominale, uniquement l'index de résistance moyen du groupe thalassémique était significativement supérieur ($p < 0.05$) à celui du groupe témoin. Dans l'artère carotide, les index de résistance moyens des souris thalassémiques et drépanocytaires étaient significativement supérieurs à celui des souris témoins ($p < 0.05$ et $p < 0.001$).

4.1.2 Évaluation de la résistance périphérique totale

La figure 36 montre des signaux Doppler représentatifs de la vitesse aortique chez une souris témoin.

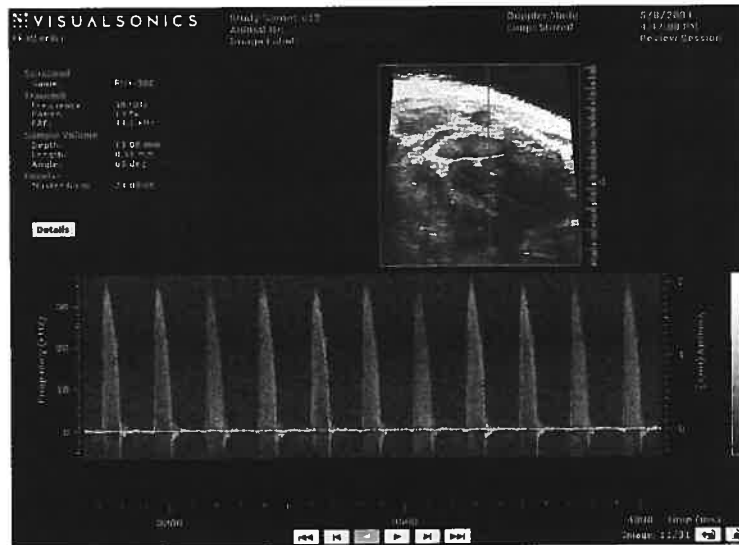


Figure 36: Signal Doppler de la vitesse aortique chez une souris témoin. L'image encadrée supérieure montre la position du volume d'échantillonnage Doppler sur l'image mode B.

Les valeurs des variables permettant le calcul du débit cardiaque, soit l'intégrale de la vitesse aortique en fonction du temps (VTI), le diamètre aortique (AoD) et la fréquence cardiaque, sont présentés au tableau 2. Les diamètres aortiques l'intégrale de la vitesse aortique et les fréquences cardiaques des souris témoins n'étaient pas statistiquement différents de ceux des souris thalassémiques et drépanocytaires.

Paramètre	Témoin	Thalassémique	Drépanocytaire
<i>n</i>	20	17	12
AoD (mm)	1.47 ± 0.07 (4.9)	1.42 ± 0.10 (7.2)	1.39 ± 0.06 (4.2)
VTI (cm)	5.53 ± 0.50 (9.0)	5.14 ± 1.07 (20.9)	4.92 ± 0.70 (14.3)
Fréquence cardiaque (battements/min)	468.1 ± 31.4 (6.7)	483.7 ± 52.4 (10.8)	454.5 ± 42.7 (9.4)

Tableau 2 : Valeurs des paramètres permettant le calcul du débit cardiaque : le diamètre aortique (AoD), l'intégrale de la vitesse aortique en fonction du temps (VTI) et la fréquence cardiaque. Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type. Les coefficients de variation sont présentés entre parenthèse. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge, le poids et la pression artérielle comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA).

Les débits cardiaques moyens et les index cardiaques des trois groupes de souris sont présentés à la figure 37. Les valeurs de débit cardiaque moyen étaient de 44 ± 5 , 39 ± 11 et 34 ± 6 ml/min pour les souris témoins, thalassémiques et drépanocytaires. Une différence hautement significative ($p < 0.001$) a été observée entre le débit cardiaque moyen des souris témoins et celui des souris drépanocytaires. La différence entre le débit cardiaque des souris thalassémiques et celui des souris témoins, n'est pas significative. Cependant, lorsque le débit cardiaque est normalisé par le poids, aucune différence statistique ne peut être observée. Les valeurs moyennes de débit cardiaque normalisé des souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires étaient alors de 1.6 ± 0.2 , 1.5 ± 0.4 et 1.5 ± 0.4 mL·min⁻¹·g⁻¹, respectivement.

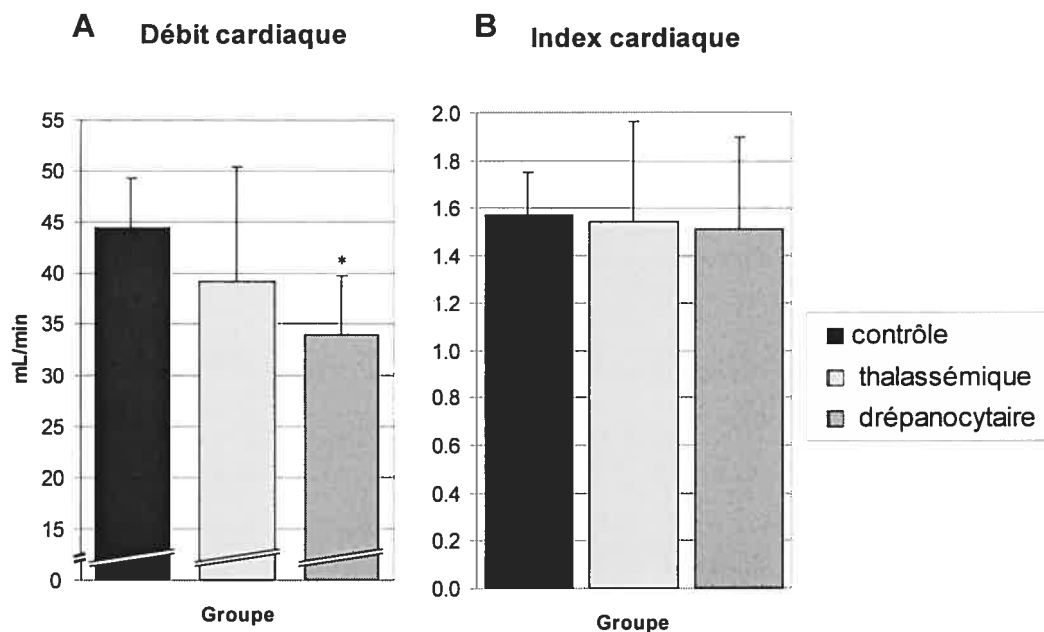


Figure 37 : Diagrammes présentant les valeurs moyennes de débit cardiaque (A) et de débit cardiaque par gramme (B) pour les trois groupes de souris. Les écarts-types sont montrés par les barres d'erreur. Un test de Student bilatéral et non pairé (test de t) a été effectué pour les valeurs de chaque diagramme comparant les groupes thalassémique et drépanocytaire au groupe témoin. * $p < 0.001$

Le débit cardiaque et la pression artérielle systolique caudale ont permis le calcul de la résistance périphérique totale. Néanmoins, les valeurs de pression artérielle systolique caudale ont été substituées aux valeurs de la pression artérielle moyenne tel que décrit dans le chapitre précédent. La résistance périphérique totale des groupes de souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires était de 1.80, 2.32 et 2.86 $\text{mmHg}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Fig. 38). Les coefficients de variation sur ces valeurs étaient de 16.7, 33.0 et 27.2 %, respectivement. La résistance périphérique totale des souris β -thalassémiques et drépanocytaires était significativement supérieure à celle des souris témoins ($p < 0.05$ et $p < 0.001$). Les coefficients de variation sur les valeurs de la

résistance périphérique totale étaient nettement supérieurs à ceux observés sur les index de résistance de Pourcelot.

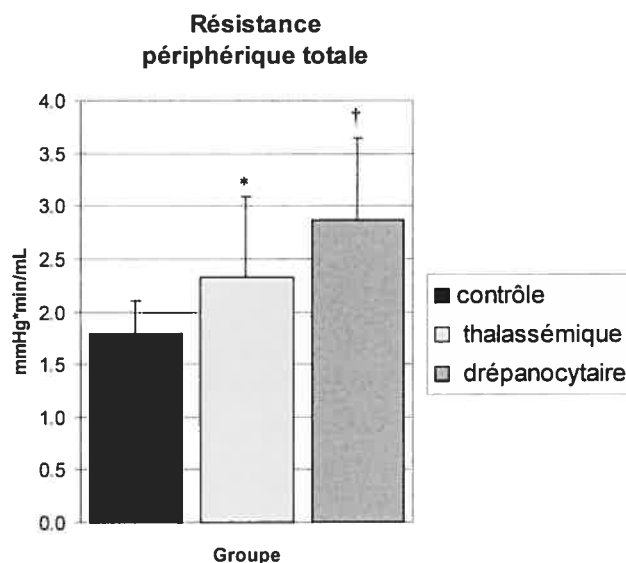


Figure 38 : Diagramme présentant les valeurs moyennes de résistance périphérique totale pour les trois groupes de souris. Les barres d'erreur montrent les écarts-types. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge et le poids comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA). * $p < 0.05$ et † $p < 0.001$

4.1.3 Index de résistance de Pourcelot et résistance périphérique totale comme tests diagnostics

Les valeurs d'index de résistance de l'artère carotide et de résistance périphérique totale étaient significativement supérieures chez les souris transgéniques en comparaison avec les souris témoins. Cette constatation suggère la possibilité d'utiliser ces mesures comme tests diagnostiques permettant de distinguer les souris saines des souris transgéniques atteintes de β -thalassémie ou d'anémie falciforme. Des courbes caractéristiques d'efficacité ou ROC (« Receiver Operating Characteristic »)

sont tracées pour les index de résistance de l'artère carotide et de l'aorte abdominale ainsi que pour la résistance périphérique totale (Figures 39A et C). Ces courbes permettent d'évaluer l'efficacité de ces mesures comme tests diagnostics et de déterminer les valeurs permettant de discriminer de façon optimale les souris saines des souris pathologiques. Les souris témoins sont considérées saines, ou diagnostiquées négatives, et les souris β -thalassémiques et drépanocytaires sont classées pathologiques, ou diagnostiquées positives.

Ces courbes illustrent la relation entre la sensibilité et la spécificité d'un test. La sensibilité représente le pourcentage de sujets malades détectés et la spécificité, le pourcentage de sujets sains ayant obtenu un diagnostic exact. Ainsi, la courbe d'un test idéal passe le plus près possible du coin supérieur gauche et celle d'un test inefficace correspond à la ligne diagonale pointillée. Généralement, la valeur du seuil optimal correspond au point sur la courbe le plus éloigné de la ligne diagonale. La courbe ROC de l'index de résistance de l'artère carotide est illustrée à la figure 39(A). Selon cette courbe, le seuil optimal serait de 0.854. Le diagramme à la figure 39(B) montre la distribution des valeurs d'index de résistance des souris pathologiques et normales ainsi que le seuil optimal. En conséquence, en se basant sur ces résultats la sensibilité de ce test diagnostic serait de 65.5 % et la spécificité de 90 %. Ainsi, 19 des 29 souris transgéniques seraient classées malades et 18 des 20 souris témoins seraient diagnostiquées saines.

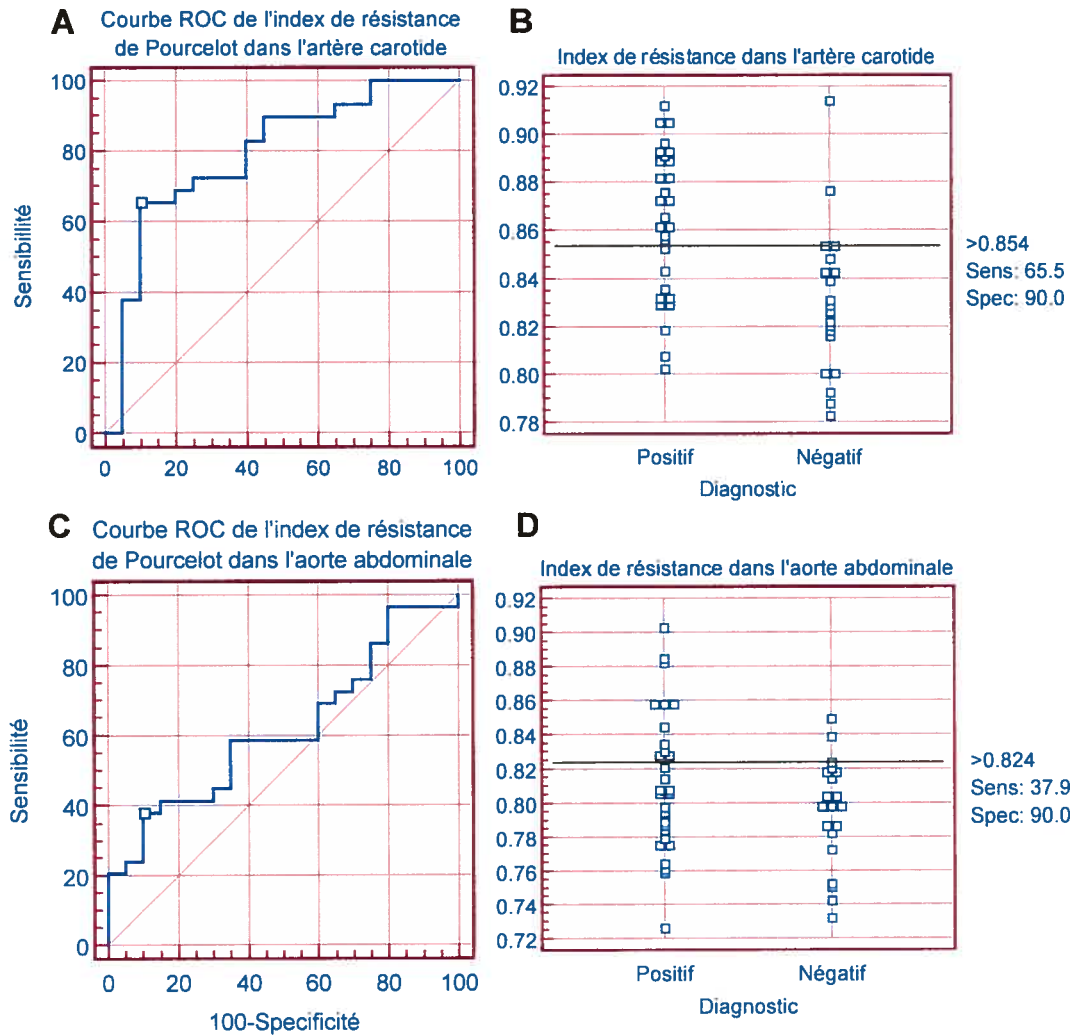


Figure 39 : Courbe ROC de sensibilité en fonction de la spécificité de : A) l'index de résistance de Pourcelot de l'artère carotide et C) l'index de résistance de Pourcelot dans l'aorte abdominale montrant le seuil optimal représenté par un carré. Les diagrammes correspondants présentent la distribution des souris pathologiques (diagnostic positif) et témoins (diagnostic négatif) pour : B) l'index de résistance dans l'artère carotide et D) dans l'aorte abdominale. Le seuil optimal est représenté par la ligne horizontale. Ces graphiques ont été tracé avec MedCalc Software (version 7.4.3.1, Broekstraat, Belgique)

Pour l'index de résistance dans l'aorte abdominale le seuil optimal serait de 0.824 (Fig. 39C). Le diagramme de la figure 39(D) montre que pour ce seuil optimal la sensibilité de ce test diagnostic serait de 37.9% et sa spécificité de 90%. Par

conséquent uniquement 11 des 29 souris transgéniques seraient classées malades et 18 des souris témoins seraient diagnostiquées saines.

D'autre part, la courbe ROC de la résistance périphérique totale (Fig. 40A) révèle que le seuil optimal de cette méthode serait de $2.04 \text{ mmHg}\cdot\text{min}\cdot\text{ml}^{-1}$. Le diagramme de la distribution des valeurs de résistance périphérique totale (Fig. 40B) indique qu'en se basant sur ce seuil, 19 des 29 souris transgéniques seraient diagnostiquées malades et 17 des 20 souris témoins seraient classées saines. La sensibilité et la spécificité de cette méthode seraient donc de 69 et 85%, respectivement.

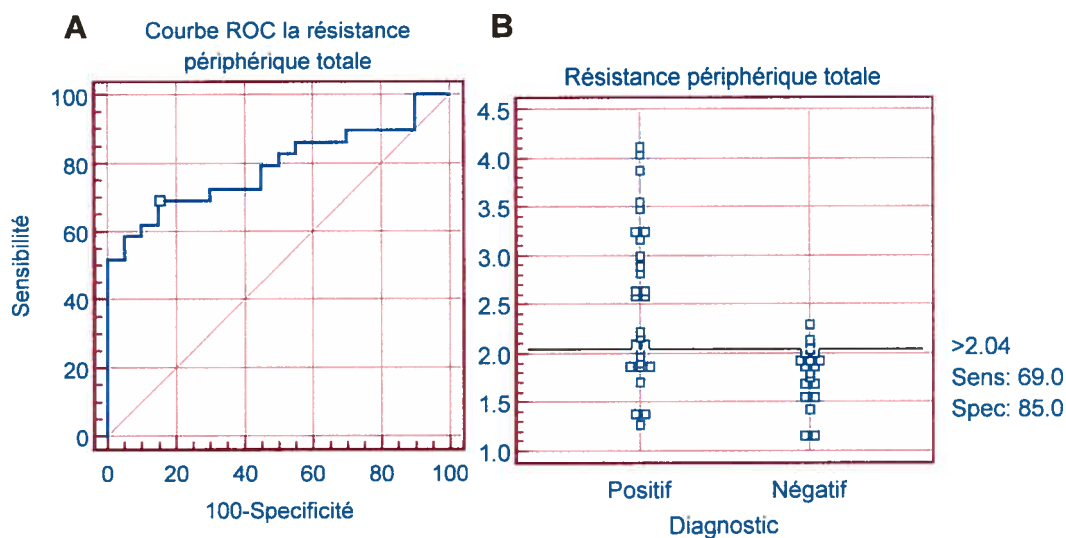


Figure 40: A) Courbe ROC de sensibilité en fonction de la spécificité de la résistance périphérique totale. B) Diagramme présentant la distribution des valeurs de résistance périphérique totale des souris pathologiques (diagnostic positif) et témoins (diagnostic négatif). La ligne horizontale montre le seuil optimal. (MedCalc Software, version 7.4.3.1, Broekstraat, Belgique)

La surface sous les courbes de ROC était calculée pour comparer la performance de ces trois tests. La surface sous les courbes ROC de l'index de résistance de Pourcelot de l'artère carotide, de l'aorte abdominale et celle de la

résistance périphérique totale étaient de 0.791 ± 0.064 , 0.617 ± 0.081 et 0.788 ± 0.064 , respectivement. Les intervalles de confiance sur l'aire sous la courbe ROC respectifs pour ces trois tests étaient : 0.651 à 0.894, 0.467 à 0.752, 0.648 à 0.891.

La différences entre les surfaces sous la courbe ROC de la résistance périphérique totale et celle de l'index de résistance de Pourcelot de la carotide ou de l'aorte abdominale ne sont pas statistiquement significatives (test de Hanley et McNeil, $p > 0.05$). Cependant, pour l'index de résistance de Pourcelot, la différence entre la surface sous la courbe ROC de l'index de l'artère carotide et celle de l'index dans l'aorte abdominale qui était de 0.174 était sur le seuil de significativité, c'est-à-dire $p = 0.05$.

4.2 ÉVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE

La figure 41 représente des images du cœur en mode-M typiques obtenues chez des souris témoins et β -thalassémiques.

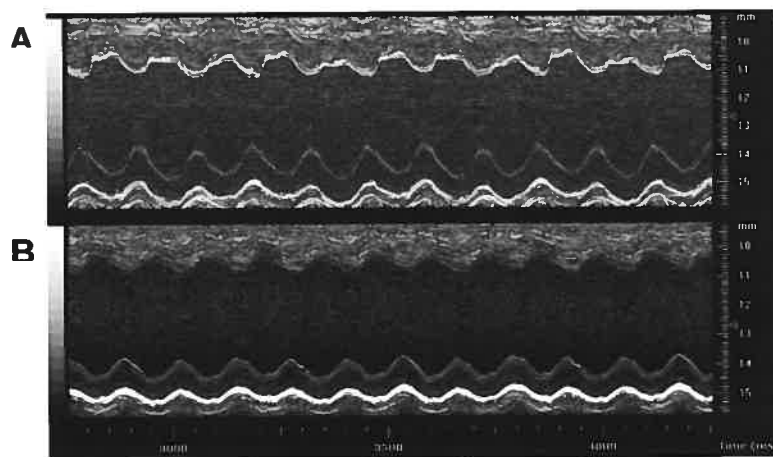


Figure 41 : Images en mode M du ventricule gauche chez une souris témoin (A) et une souris β -thalassémique (B).

Dans cette section, le groupe de souris témoin ainsi que certaines souris du groupe thalassémique diffèrent de ceux étudiés dans les sections précédentes, en raison de difficultés techniques liées à l'acquisition d'images ultrasonores. Les caractéristiques des trois groupes résultants sont présentés au tableau 3. L'âge et le poids des souris thalassémiques et drépanocytaires diffèrent significativement de ceux observés chez les souris témoins ($p < 0.01$ et $p < 0.001$, respectivement).

Paramètre	Témoin	Thalassémique	Drépanocytaire
n	14	18	12
Âge (mois)	7.9 ± 2.4 (30.3)	$9.4 \pm 1.5^*$ (15.5)	$3.7 \pm 1.1^\dagger$ (31.5)
Poids (g)	27.8 ± 2.4 (8.5)	$25.5 \pm 2.4^*$ (9.5)	$23.0 \pm 3.4^\dagger$ (14.8)

Tableau 3: Caractéristiques générales du groupe témoin, thalassémique et drépanocytaire ayant permis l'étude de la fonction cardiaque. Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne \pm écart-type. Les valeurs entre parenthèse sont les coefficients de variation. L'analyse statistique était un test de Student bilatéral et non pairé (test de t). * $p < 0.01$ et $^\dagger p < 0.001$

Les paramètres caractérisant la fonction du ventricule gauche obtenus chez les trois groupes de souris sont présentés au tableau 4. Le diamètre interne du ventricule gauche en diastole des souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires était de 3.5, 3.8 et 3.5 mm, respectivement. Le diamètre interne du ventricule gauche en systole était de 2.3 mm pour les souris témoins, 2.6 mm pour les souris β -thalassémiques et 2.3 mm pour les souris drépanocytaires. Les diamètres du ventricule gauche en diastole et en systole des souris thalassémiques étaient significativement supérieurs à ceux des souris témoins ($p < 0.05$). Aucune différence statistique n'était observée entre les diamètres du ventricule gauche des souris drépanocytaires et ceux

des souris témoins. Les fractions de raccourcissement des trois groupes de souris étaient de 33 ± 4 , 31 ± 5 et 35 ± 6 % . Les différences de ces valeurs entre les groupes de souris transgéniques et le groupe témoin n'étaient pas statistiquement significatives.

Paramètre	Témoin	Thalassémique	Drépanocytaire
<i>n</i>	14	18	12
LVDD (mm)	3.47 ± 0.37 (10.7)	$3.77 \pm 0.42^*$ (11.3)	3.47 ± 0.33 (9.5)
LVSD (mm)	2.32 ± 0.34 (14.7)	$2.63 \pm 0.42^*$ (16.0)	2.25 ± 0.33 (14.9)
FS (%)	33.3 ± 4.2 (12.5)	30.6 ± 5.1 (16.8)	35.2 ± 5.9 (16.8)

Tableau 4 : Valeurs des paramètres permettant l'évaluation de la fonction du ventricule gauche (LV) : les diamètres diastoliques (LVDD) et systoliques (LVSD) ainsi que la fraction de raccourcissement (FS). Les valeurs sont présentées sous la forme Moyenne \pm écart-type. Les valeurs entre parenthèse sont les coefficients de variation. L'analyse statistique était un modèle linéaire général utilisant l'âge et le poids comme covariable (Minitab Statistical Software, version 14, Pennsylvanie, USA). * $p < 0.05$

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5.1 CARACTÉRISTIQUES DES ANIMAUX

5.1.1 Âge et poids

Nous n'avons pas eu la possibilité dans cette étude d'apparier les animaux transgéniques à des animaux témoins du même âge. Ainsi, le groupe de souris β -thalassémiques était plus âgé que le groupe de souris témoins, tandis que le groupe de souris drépanocytaires était moins âgé. Cette différence est attribuable à la difficulté d'obtenir des animaux transgéniques¹².

Notre étude montre que le poids moyen des souris transgéniques est statistiquement inférieur à celui des souris témoins. La différence de poids mesurée chez les souris drépanocytaires ne peut être interprétée sans tenir compte de leur différence d'âge par rapport aux témoins. Néanmoins, généralement les souris transgéniques β -thalassémiques et drépanocytaires ont un poids inférieur aux souris témoins du même âge. De nombreuses études cliniques relatent également un poids inférieur chez les patients thalassémiques^(74; 75) et drépanocytaires^(76; 77) en comparaison avec des sujets sains.

En réponse à ces deux limitations, nous avons employé, pour la majorité des résultats¹³, des analyses statistiques basées sur un modèle linéaire général prenant en considération l'âge et le poids comme variables confondantes.

¹² De plus, au moment de l'étude, le laboratoire du Dr Trudel ne possédait pas suffisamment de souris témoins ayant l'âge approprié pour être appariés aux souris β -thalassémiques et drépanocytaires.

¹³ Sauf pour le débit cardiaque, puisque l'index cardiaque tient en compte l'influence du poids.

5.1.3 Pression

La pression artérielle était mesurée afin de permettre le calcul de la résistance périphérique vasculaire. Chez l'humain, la pression artérielle est considérée normale lorsque sa valeur systolique est inférieure à 135 mmHg et sa valeur diastolique est inférieure à 90 mmHg. La pression artérielle moyenne (MAP) normale est approximativement de 100 mmHg. La pression augmente, chez l'humain, avec l'âge et est généralement plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Chez la souris normale, les valeurs de pression artérielle moyenne varient, selon les auteurs, entre 80 et 125 mmHg ⁽⁷⁸⁾. De plus, la pression artérielle moyenne est similaire entre les différentes souches de souris saines ⁽⁷⁹⁾.

Dans notre étude, la pression artérielle systolique caudale du groupe de souris β -thalassémique n'était pas statistiquement différente de celle des souris témoins. Dans la littérature, aucune étude ne rapporte les valeurs de pression artérielle chez des modèles de souris thalassémiques. Cependant, une étude évalue la pression artérielle chez des patients atteints de thalassémie majeure. Chez ces individus, les pressions artérielles systoliques et diastoliques sont significativement inférieures à celles des sujets témoins (Tableau 5) ⁽⁸⁰⁾. Puisque ces valeurs sont évaluées chez l'humain, il

Pression artérielle	Patients thalassémiques	Sujets témoins
Pression systolique (mmHg)	106 (97–114)*	118 (109–125)
Pression diastolique (mmHg)	74 (65–83)*	86 (78–92)

Tableau 5 : Pression artérielle évaluée sur une période de 24 heures chez des sujets atteints de thalassémie majeure et des sujets témoins sains. Les valeurs expriment la médiane et les valeurs entre parenthèse représentent l'intervalle entre le 25^e et le 75^e centile. Une comparaison statistique était effectuée entre les valeurs des sujets thalassémiques et celles des sujets témoins. * $p < 0.05$ ⁽⁸⁰⁾

est difficile d'estimer la validité des mesures prises chez les modèles de souris transgéniques.

D'autre part, le groupe de souris drépanocytaires présentait une pression artérielle systolique caudale significativement plus élevée en comparaison avec le groupe témoin. Deux études rapportent des résultats divergents de pression artérielle chez des modèles de souris drépanocytaires éveillées. D'une part, Nath *et al.* montrent que la pression systolique caudale est similaire entre des souris témoins et des souris transgéniques portant les mutations humaines β^S et $\beta^{S\text{-Antilles}}$ sur le gène de la β -globine (Fig. 42)⁽⁸¹⁾. Cependant, Kaul *et al.* rapportent une diminution significative de la pression artérielle moyenne, en comparaison avec les souris témoins, chez des souris transgéniques, âgées de 4 à 6 mois, exprimant les gènes de la β^S et $\beta^{S\text{-Antilles}}$ -globine ainsi que le gène d' α -globine humaine (113 ± 8 mmHg chez les souris témoins contre 90 ± 7 mmHg chez les souris transgéniques)⁽⁸²⁾.

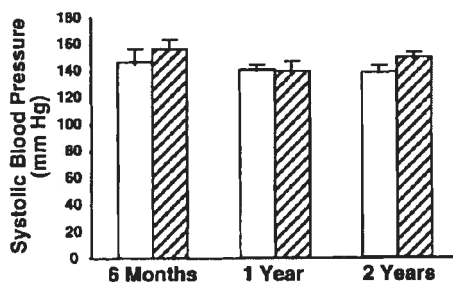


Figure 42 : Pression artérielle systolique caudale («Systolic blood pressure») chez des souris témoins (barres blanches) et drépanocytaires (barres hachurées) éveillées âgées de 6 mois, 1 an et 2 ans⁽⁸¹⁾.

Chez l'humain, toutes les études concordent et montrent que la pression artérielle à l'état basal est significativement plus basse chez les patients drépanocytaires que chez les sujets témoins⁽⁸³⁻⁸⁶⁾. Ces données ne concordent pas avec

les valeurs expérimentales obtenues dans notre étude. Une explication possible serait que les valeurs mesurées dans la littérature ont été obtenues chez des sujets et des animaux éveillés et que les mesures de la présente étude ont été effectuées chez des souris anesthésiées.

Chez la souris, l'anesthésie générale induit une chute de la pression artérielle, variant d'amplitude selon l'agent employé. De plus, le débit cardiaque ainsi que la fréquence cardiaque sont également diminués⁽⁸⁷⁾. L'Avertin, utilisé dans notre étude, et l'isoflurane sont les agents affectant le moins la fonction cardiaque en comparaison avec d'autres anesthésiques (kétamine-xylazine et kétamine-midazolam)^(88; 89).

Le mode d'action spécifique de l'Avertin est peu connu. Globalement, l'effet hypotenseur des anesthésiques généraux est généré en agissant sur le système nerveux autonome afin d'inhiber les signaux du tonus vasomoteur ce qui entraîne la dilatation vasculaire, et par conséquent une chute de pression⁽²⁾.

Une fonction importante des cellules endothéliales vasculaires est de produire des agents stimulant la dilatation ou la constriction des cellules musculaires lisses vasculaires en réponse à des stimuli mécaniques, chimiques ou nerveux. Un groupe a démontré que les réponses vasculaires à des agents vasomoteurs étaient altérées chez des souris drépanocytaires⁽⁸¹⁾. Un autre groupe de chercheurs confirme une activité accrue de l'enzyme permettant la synthèse du monoxyde d'azote (NO)¹⁴, la NO synthase, ainsi que l'augmentation de la production de NO⁽⁸²⁾. Cette stimulation continue de l'activité de la NO synthase et du NO dans l'endothélium diminue significativement les réponses subséquentes à des vasodilatateurs agissant par l'intermédiaire du NO.

¹⁴ Le monoxyde d'azote (NO) est un agent vasodilatateur produit par les cellules endothéliales.

Ainsi, il est possible que la réponse vasodilatatrice des souris drépanocytaires à l'anesthésique soit diminuée, ce qui se reflèterait alors par une pression artérielle supérieure à celle des souris témoins. Des études sur des souris éveillées et anesthésiées devraient être effectuées afin d'examiner cette hypothèse.

5.2 ÉVALUATION DE L'INDEX DE RÉSISTANCE DE POURCELOT

Les index de résistance obtenus dans les groupes transgéniques et témoin sont présentés à la figure 35. Une différence significative a été mise en évidence entre les valeurs de l'index de résistance de l'artère carotide des souris pathologiques et celles des souris saines. Uniquement l'index de résistance de l'aorte abdominale des souris β -thalassémiques était statistiquement supérieur à celui des souris témoins.

Utilisation de l'index de résistance

Dans la littérature, aucune étude ne rapporte l'utilisation de ce paramètre chez la souris. L'index de résistance a d'abord été décrit par Pourcelot pour l'évaluation dans l'artère carotide, chez l'humain, de la résistance circulatoire du cerveau et pour la détection de sténoses ou thromboses carotidiennes^(68; 90). L'auteur rapporte des valeurs normales de l'index de résistance carotidien se situant entre 0.55 et 0.75⁽⁹⁰⁾. Même lorsque ces valeurs d'index de résistance sont comprises dans la plage normale, le clinicien doit surveiller l'asymétrie entre les index de résistance de la carotide gauche et droite. L'utilisation de l'index de résistance s'est répandue par la suite surtout pour l'évaluation d'anomalies rénales⁽⁹¹⁾, mais également pour d'autres applications telles que l'étude de la vascularisation tumorale⁽⁹²⁾ ou de la résistance hépatique⁽⁹³⁾. Cependant, ce paramètre est uniquement évalué dans des vaisseaux irriguant des circulations locales, par exemple l'artère rénale ou hépatique, et aucun auteur ne

rapporte son utilisation dans l'aorte abdominale. Ceci peut s'expliquer par la dépendance de l'index de résistance à l'aire vasculaire en aval du site de mesure. En effet, une augmentation de la section vasculaire en aval entraîne une diminution de l'index de résistance et ce indépendamment de la résistance à l'écoulement sanguin⁽⁹⁴⁾. Cette constatation permet d'expliquer la variabilité de l'index de résistance selon le site de mesure. L'aorte abdominale achemine le sang vers les membres inférieurs et vers toutes les circulations abdominales. Elle présente par conséquent de nombreux embranchements et la surface vasculaire en aval d'un site de mesure varie grandement selon que l'on se place avant ou après ces embranchements. Ainsi, notre étude de l'index de résistance dans l'aorte abdominale ne permet pas de tirer des conclusions sur la résistance périphérique, puisque son site de mesure ne peut être considéré avec certitude identique entre les animaux malgré les repères physiologiques utilisés lors de l'examen échographique mode B.

Facteurs affectant l'index de résistance

L'index de résistance est affecté par le profil temporel de la vitesse artérielle qui à son tour dépend de plusieurs facteurs, incluant la résistance dans le réseau vasculaire distal, la compliance, la fonction cardiaque et l'anatomie et géométrie vasculaire^(69; 95).

Comme nous l'avons décrit à la section 2.3.1, la résistance vasculaire est principalement déterminée par le tonus des petites artères et artéριοles. Dans la circulation artérielle normale, les organes présentant une résistance à l'écoulement sanguin faible sont : le cerveau, le foie et les reins⁽⁹⁵⁾. La majorité des autres tissus, tels que les muscles et les intestins, présentent une résistance à l'écoulement élevé lorsqu'ils sont dans un état de repos métabolique⁽⁹⁵⁾. Cependant, lorsque leur activité

métabolique s'accroît, ce qui nécessite un plus grand apport sanguin, la résistance à l'écoulement diminue sensiblement.

L'effet de la résistance distale sur le profil temporel de vitesse est différent en systole et en diastole. Ainsi, une résistance faible est associée à une diminution de la vitesse systolique maximale mais à une augmentation de la vitesse en fin de diastole. Par conséquent, l'index de résistance reflète les modifications de vitesses systoliques et diastoliques causées par des altérations de la résistance vasculaire distale⁽⁶⁹⁾. Dans notre étude, une diminution de la vitesse diastolique peut être observée chez les souris transgéniques (Fig. 34). Ceci reflète une augmentation de la résistance. Généralement, une augmentation de la résistance se traduit d'abord par une diminution progressive du débit diastolique pouvant même mener au reflux⁽⁶⁸⁾.

D'autre part, la compliance correspond à la capacité d'un vaisseau sanguin de modifier son volume en réponse à une variation de la pression⁽⁹⁶⁾. Durant la systole, cette caractéristique permet aux grandes artères d'emmagasiner temporairement, par l'étirement de leur paroi, l'énergie potentielle générée par la contraction cardiaque. La détente vasculaire durant la diastole projette ensuite le volume sanguin excédentaire en aval assurant ainsi une perfusion tissulaire continue. La compliance est donc reliée à la distensibilité¹⁵ et au diamètre vasculaire. Elle est déterminée par la présence de fibres de collagène et d'élastine ainsi que de cellules musculaires lisses dans la média de la paroi vasculaire⁽⁹⁵⁾. Le vieillissement s'accompagne généralement d'une perte de la distensibilité et donc de la compliance des grandes artères^(96; 97). Cependant, la compliance affecte également l'index de résistance de Pourcelot puisqu'elle influe sur le profil des vitesses. Bude et Rubin ont montré grâce à un modèle *in vitro* que pour

¹⁵ La distensibilité est définie comme le changement relatif de volume d'un vaisseau par unité de pression $((\Delta V/V)/\Delta P)$.⁽²⁾

une même résistance vasculaire, l'index de résistance diminue lorsque la compliance diminue⁽⁹⁸⁾. Ceci implique que l'index de résistance pourrait varier d'un individu à l'autre même si la résistance vasculaire de ces individus est la même puisque la compliance vasculaire varie aussi entre les individus.

Interprétation de l'index de résistance

Si on considère que la fonction cardiaque, et l'anatomie vasculaire sont similaires entre les trois groupes de souris étudiées, une augmentation de l'index de résistance chez les souris pathologiques peut être interprétée par une augmentation de la résistance vasculaire à l'écoulement sanguin ou par une augmentation de la compliance vasculaire. Cette deuxième hypothèse est peu probable. En effet, une étude révèle que la rigidité des artères carotides et brachiales humaines serait augmentée chez des sujets β -thalassémiques en comparaison avec des sujets témoins⁽⁹⁹⁾. Ceci reflète une diminution de leur compliance. L'élastorrhexie artérielle, ou la dégénérescence des fibres élastiques de la paroi vasculaire, a également été observée au niveau de spécimens de foies et de rates prélevés chez des patients thalassémiques et drépanocytaires^(100; 101). De plus, l'amplitude de la vasodilatation dépendante du débit est diminuée chez les patients de ces deux maladies indiquant également une altération de la fonction de témoin du tonus vasculaire par les cellules endothéliales des grandes artères^(99; 102). Par conséquent, l'altération fonctionnelle du tonus artériel associée à une détérioration structurelle de la paroi artérielle contribuerait à une diminution de la compliance vasculaire, et non à son augmentation.

Par conséquent, l'augmentation de l'index de résistance de l'artère carotide ou de l'aorte abdominale chez les souris transgéniques semble refléter, respectivement,

une augmentation de la résistance vasculaire périphérique cérébrale ou abdominale et au niveau des membres inférieurs. Toutefois, bien que l'index de résistance de l'artère carotide soit supérieur chez les souris drépanocytaires en comparaison avec les souris témoins, cet index ne présentait aucune différence statistique au niveau de l'aorte abdominale. Tel que mentionné ci-dessus, et contrairement à l'index de résistance de l'artère carotide, l'index de résistance dans l'aorte abdominale ne permet pas de tirer des conclusions fiables puisqu'il est hautement dépendant de son point de mesure.

5.2 ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE TOTALE

5.2.1 Résistance périphérique totale dans la littérature : chez la souris

La figure 38 présente les valeurs de résistance périphérique totale évaluées chez les trois groupes de souris de notre étude. La résistance périphérique totale des souris pathologiques était statistiquement supérieure à celle des souris témoins. Aucune étude ne rapporte des valeurs de la résistance périphérique totale chez des modèles de souris β -thalassémiques et drépanocytaires. De plus, les études exposant des valeurs de résistance périphérique totale chez d'autres types de souris sont rares. La variabilité des valeurs obtenues par différents auteurs est importante (Tableau 6). Ceci reflète la variabilité dans les mesures du débit cardiaque et de la pression artérielle moyenne, qui dépendent quant à elles de l'agent anesthésique employé.

Résistance périphérique totale (mmHg·min/ml)	Anesthésie	Référence
1.80 ± 0.30	Avertin	Groupe témoin
3.5*	aucune	(103)
5**	isoflurane	(87)
6**	aucune	(87)
6.06 ± 0.92	kétamine- xylazine	(104)
12.3 ± 1.0	Inactin	(105)

Tableau 6 : Tableau présentant les valeurs de résistance périphérique totale chez des souris témoins provenant de quatre études ainsi que celles de la présente étude pour le groupe de souris témoin (valeur ombragée). *Valeur tirée de la figure 5 de l'article. **Valeurs tirées de la figure 2 de l'article.

5.2.2 Résistance périphérique totale dans la littérature :chez les patients

β -thalassémiques et drépanocytaires

Chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires, on constate une diminution de la résistance périphérique totale⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾. Les auteurs justifient ces résultats en se référant aux conclusions tirées chez des patients atteints d'anémies sévères provenant d'autres origines. Généralement, les patients atteints d'une anémie sévère chronique non héréditaire présentent un débit cardiaque augmenté dû à une diminution de la résistance vasculaire systémique. Deux facteurs expliquent cette diminution de résistance périphérique à l'écoulement sanguin : une diminution de la viscosité totale du sang et une vasodilatation périphérique⁽¹⁰⁹⁾. D'une part, la viscosité du sang est réduite puisque l'anémie entraîne une diminution de l'hématocrite. D'autre part, la vasodilatation périphérique ne serait pas directement causée par l'hypoxie tissulaire, mais plutôt par la diminution de l'hémoglobine circulante.

L'hémoglobine est un puissant inhibiteur du NO, agent vasodilatateur produit par l'endothélium⁽¹⁰⁹⁾. Néanmoins, chez les patients atteints d'anémie chronique sévère, la fonction endothéliale et la capacité des cellules musculaires lisses de répondre aux agents vasodilatateurs sont normales.

Cependant, la β -thalassémie et l'anémie falciforme diffèrent sur plusieurs aspects des conditions d'anémie sévère chronique classique. Les différences majeures seront discutées ci-dessous.

Viscosité sanguine

La viscosité apparente du sang dépend de la concentration du sang en protéines plasmatiques, de la concentration de cellules sanguines, de la déformabilité cellulaire et de l'agrégation cellulaire⁽¹¹⁰⁾. La viscosité sanguine varie également en fonction du taux de cisaillement. Généralement, la rigidification des globules rouges entraîne une augmentation de la viscosité apparente à haut et à bas cisaillement⁽¹¹¹⁾ (Fig. 43A). De plus, la viscosité apparente d'une suspension de globules rouges rigidifiés ne dépend plus du taux de cisaillement. L'agrégation des globules rouges augmente aussi la viscosité apparente à bas cisaillement (Fig. 43B).

Ainsi, chez les patients β -thalassémiques ou drépanocytaires, la viscosité du sang est non seulement affectée par l'hématocrite, mais également par la déformabilité des globules rouges puisque cette dernière est diminuée (cf. sections 2.7.1.3 et 2.7.2.3). Bien que la viscosité du sang total à haut cisaillement des patients drépanocytaires soit diminuée⁽¹¹²⁾, il est important de noter que le ratio de cette viscosité sur l'hématocrite est significativement supérieur chez les patients drépanocytaires⁽¹¹²⁾. Ceci reflète le manque de déformabilité des globules rouges

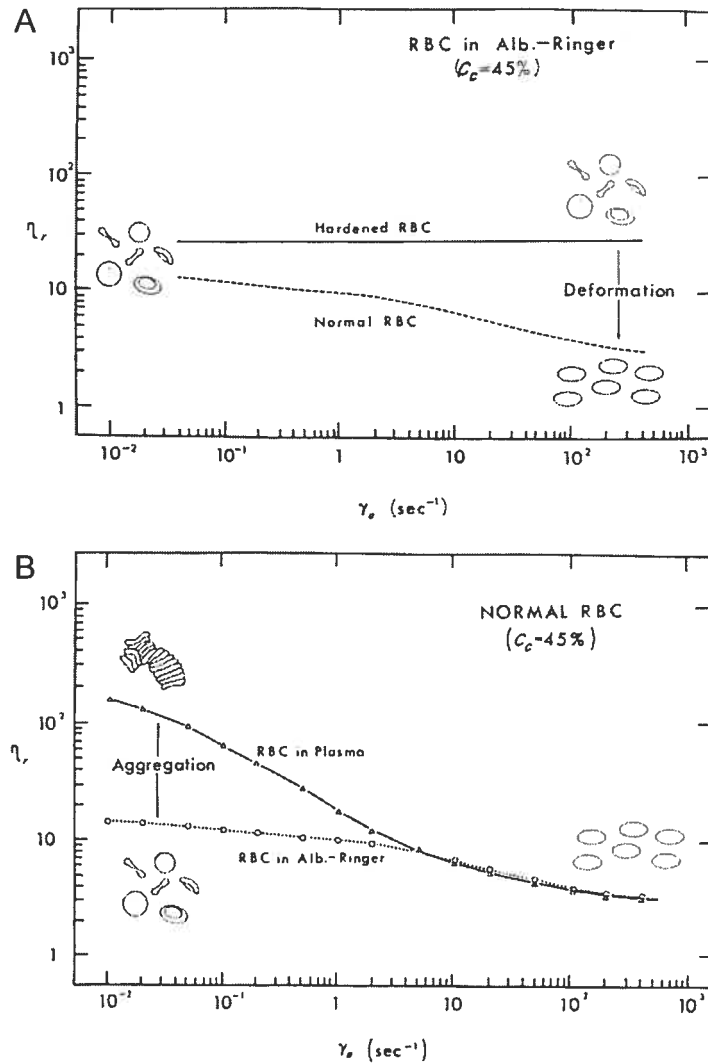


Figure 43 : Viscosité sanguine apparente en fonction du taux de cisaillement. A) Globules rouges humains normaux (ligne pointillée) et rigidifiés (ligne continue) suspendus dans une solution de Ringer et albumine. Il n'y a pas d'aggrégation érythrocytaire puisqu'il y a absence de plasma et par conséquent de protéines plasmatiques. B) Globules rouges humains normaux suspendus dans le plasma autologue (Δ) et dans une solution de Ringer et albumine (o). La concentration cellulaire des deux expériences est de 45% et la température de 37°C ⁽¹¹¹⁾.

drépanocytaires même lorsqu'ils sont exposés à une concentration d'oxygène élevée⁽¹¹³⁾. De plus, la viscosité d'une suspension de globules rouges drépanocytaires augmente graduellement lors de la désoxygénation et ce bien avant l'apparition de falciformation morphologique des érythrocytes⁽¹¹³⁾. D'autre part, la viscosité sanguine

des patients β -thalassémiques hétérozygotes et homozygotes est équivalente aux valeurs les plus élevées observées chez les sujets normaux⁽¹¹⁴⁾. En outre, à hématoците égal, la viscosité sanguine des patients atteints de β -thalassémie mineure est supérieure à celle des sujets témoins⁽¹¹⁵⁾.

Mentionnons également que l'augmentation de l'agrégation érythrocytaire observée chez les patients β -thalassémiques⁽³⁰⁾ et drépanocytaires^(50; 51) devrait également entraîner une augmentation de la viscosité apparente à bas cisaillement (Fig. 43B).

Fonction endothéliale

Deuxièmement, tel que mentionné précédemment, une diminution de la résistance périphérique à l'écoulement est notée chez les patients β -thalassémiques⁽¹⁰⁶⁾ et drépanocytaires^(107; 108) mais aucun auteur ne démontre la présence de vasodilatation généralisée chez ces patients. Par ailleurs, une dysfonction endothéliale vasculaire a été observée chez des patients atteints de ces hémoglobinopathies^(99; 102; 112). Chez les patients drépanocytaires, la vasodilatation dépendante de l'endothélium, stimulée par des agents vasodilatateurs ou une augmentation du débit, est altérée au niveau des grandes artères et des artères de résistance^(102; 112). Ainsi, l'équipe d'Eberhardt montre que la dilatation dépendante du débit dans l'artère brachiale¹⁶ est inférieure chez les patients drépanocytaires par rapport à des sujets pairés pour l'âge, le sexe et l'origine ethnique (Fig. 44B)⁽¹⁰²⁾. Cheung *et al.* rapportent des résultats similaires chez des patients β -thalassémiques, ainsi qu'un indice de rigidité plus élevé au niveau des artères carotides et brachiales chez ces patients (Fig. 44A)⁽⁹⁹⁾. Chez les sujets

¹⁶ La dilatation débit-dépendante est déterminée en mesurant, par échographie, le diamètre de l'artère brachiale avant et après l'occlusion du vaisseau par un brassard.

β -thalassémiques, le diamètre de base de l'artère brachiale est significativement inférieur et ce à un débit brachial de base significativement supérieur à celui des sujets témoins⁽⁹⁹⁾. Ces résultats indiquent une altération chez les patients β -thalassémiques de l'ajustement du diamètre artériel à une augmentation chronique des forces de cisaillement.

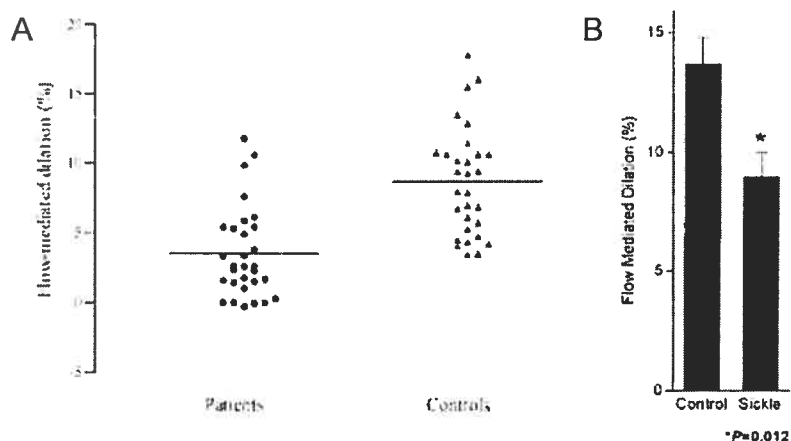


Figure 44 : Dilatation débit-dépendante («Flow-mediated dilation») chez des patients et des sujets témoins («Controls») : A) β -thalassémiques⁽⁹⁹⁾ (la ligne horizontale représente la moyenne, $p < 0.001$) et B) drépanocytaires («Sickle») ⁽¹⁰²⁾.

Des études menées chez des modèles de souris transgéniques drépanocytaires concordent aussi avec ces résultats et montrent que la réponse aux vasodilatateurs dépendants de l'endothélium est altérée au niveau de la macro et de la micro-circulation malgré une augmentation de la production basale de NO^(81; 82). Ces auteurs concluent à une diminution de la bioactivité du NO. L'équipe de Reiter *et al.* confirme cette hypothèse en démontrant que la présence d'hémoglobine dans le plasma suite à l'hémolyse chronique chez des patients drépanocytaires diminue la biodisponibilité du NO⁽¹¹⁶⁾. Ce mécanisme explique en partie l'augmentation compensatoire paradoxale

de l'expression de NO tissulaire malgré la dysfonction endothéliale évidente observée chez des patients et des modèles de souris transgéniques. Ainsi l'épuisement aigu du NO par l'hémoglobine circulante pourrait être en cause de vasoconstrictions et du déclenchement des crises d'occlusion vasculaire. Aucune étude similaire n'a été menée afin de connaître le mécanisme de la dysfonction endothéliale chez les patients et modèles de souris β -thalassémiques.

Occlusion vasculaire

Finalement, contrairement à d'autres anémies chroniques (cf. sections 2.7.1.3 et 2.7.2.4), la β -thalassémie et l'anémie falciforme déclenchent une série de processus physiopathologiques entraînant l'occlusion vasculaire. L'occlusion transitoire ou chronique de micro-vaisseaux est susceptible de causer une augmentation de la résistance à l'écoulement. Une étude *ex vivo* sur une préparation de mesocécum de rat démontre que l'adhésion d'érythrocytes drépanocytaires à l'endothélium des veinules intervient dans la génération de résistance à l'écoulement. En effet, l'équipe de Kaul *et al.* constate que l'infusion d'un bolus de globules rouges (hématocrite de 30%) provenant de patients drépanocytaires entraîne une augmentation de la résistance à l'écoulement significativement supérieure à celle générée par l'infusion d'un bolus de globules rouges de sujets témoins sains⁽⁴⁴⁾.

5.2.2.1 Résultats escomptés et résultats cliniques

Malgré toutes les évidences exposées ci-dessus indiquant une possible augmentation de la résistance périphérique à l'écoulement, toutes les études mesurant ce paramètre chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires indiquent plutôt une diminution de la résistance périphérique. Comment alors expliquer cette

différence entre les études physiologiques et les résultats cliniques? D'une part, il faut tenir compte des critères d'inclusion des études effectuées sur les patients. Toutes les études impliquent des patients dont la maladie est en état d'équilibre dynamique, ce qui signifie que malgré l'évolution probable des processus pathologiques, ces derniers sont compensés et les patients ne présentent pas de symptômes apparents. À titre d'exemple, mentionnons que la manifestation de crises d'occlusion vasculaire était un critère d'exclusion pour les patients drépanocytaires^(107; 108). D'autre part, tous les patients étudiés subissent des traitements permettant de maintenir leur qualité de vie. Ainsi tous les patients β -thalassémiques inclus dans l'étude effectuée par Bosi *et al.* ont subi une splénectomie et reçoivent régulièrement des transfusions sanguines combinées à un traitement de chélation du fer⁽¹⁰⁶⁾. Ces deux différences sont fondamentales pour l'interprétation des résultats de notre étude puisque les souris transgéniques utilisées dans nos expérimentations pourraient avoir subi des crises d'occlusion vasculaire et elles ne recevaient aucun traitement permettant d'atténuer la sévérité de leur condition.

5.2.3 Interprétation des résultats de résistance périphérique totale chez les souris β -thalassémiques et drépanocytaires

Nos résultats montrent une résistance périphérique totale augmentée chez les souris β -thalassémiques et drépanocytaires. Nos résultats ne concordent pas avec les résultats cliniques obtenus dans la littérature chez les patients atteints de ces hémoglobinopathies. Cependant nous avons démontré ci-dessus que ces résultats cliniques ne reflètent pas les études physiologiques qui indiquent une possible augmentation de la résistance périphérique totale.

Lorsqu'on observe la distribution des valeurs de la résistance périphérique totale de notre étude (Fig. 45), on constate qu'une partie des données obtenues pour les souris transgéniques (10 sur 17 pour les β -thalassémiques et 4 sur 12 pour les

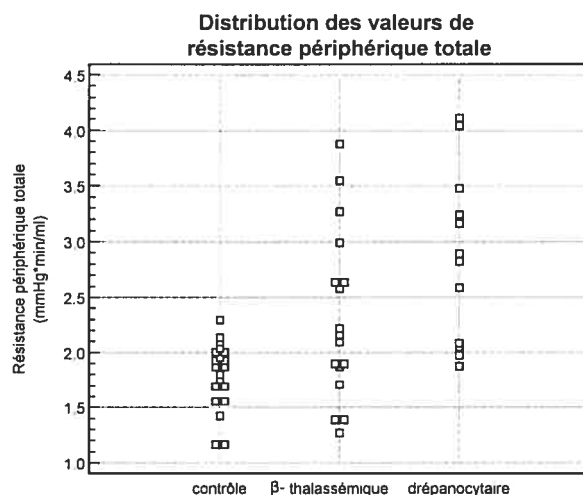


Figure 45 : Schéma de la distribution des valeurs de résistance périphérique totale obtenues chez les souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires.

drépanocytaires) se retrouvent dans l'étendue des valeurs obtenues pour les souris témoins. Cette constatation indique possiblement la manifestation, chez certaines souris transgéniques, de mécanismes compensatoires contrant les processus pathologiques et permettant de maintenir la maladie des souris dans un état d'équilibre dynamique.

De plus, une interprétation adéquate de nos résultats doit considérer les différences entre la maladie des modèles de souris transgéniques et celle des patients. Chez les souris drépanocytaires SAD uniquement les fœtus et les nouveau-nés sont anémiques car l'hématocrite est restauré lorsqu'elles atteignent la maturité⁽⁶²⁾. L'augmentation des niveaux d'érythropoïétine circulante ainsi que la présence d'un

grand nombre de réticulocytes témoignent de la stimulation de l'érythropoïèse, mécanisme compensatoire secondaire à l'hémolyse chronique⁽⁶²⁾. Ainsi le maintien de l'hématocrite à un taux normal combiné à la présence de globules rouges drépanocytaires rigidifiés et adhérents mène théoriquement à une augmentation importante de la viscosité totale du sang. Cette absence d'anémie pourrait par conséquent expliquer en partie l'obtention de valeurs de résistance très élevées en comparaison avec celles des souris normales. Par contre, chez les souris β -thalassémiques $Hbb^{d-thal/d-thal}$ employées durant cette étude, l'hématocrite moyen était de $31.0 \pm 2.2 \%$ ¹⁷ ce qui est significativement inférieur à celui de souris témoins qui était de $43.7 \pm 2.2\%$ ¹³ ($p < 0.001$).

Une dernière différence à considérer entre les études cliniques et notre étude est que toutes nos mesures étaient effectuées sur des animaux sous anesthésie. Rappelons que le calcul de la résistance périphérique totale s'effectue via la mesure du débit cardiaque et de la pression artérielle (équation 4, section 3.2.2.2), deux paramètres grandement affectés par l'anesthésie. Le débit cardiaque et la pression artérielle diminuent généralement lors de l'anesthésie⁽⁸⁷⁾. Ainsi, la résistance périphérique totale tend à diminuer ou à augmenter selon l'amplitude de diminution respective de chacun des deux paramètres. À titre d'exemple, mentionnons que la kétamine-xylozine entraîne une augmentation de la résistance périphérique contrairement à l'isoflurane et au pentobarbital de sodium qui entraînent une diminution⁽⁸⁷⁾. L'anesthésie peut donc avoir induit un biais sur la mesure de la résistance périphérique totale.

¹⁷ Valeurs mesurées au laboratoire du Dr Trudel, chez les souris β -thalassémiques et certaines souris témoins au moment de l'étude.

En conclusion, nous postulons que la maladie des souris transgéniques β -thalassémiques et drépanocytaires étudiées était pour la majorité décompensée. L'évolution de leurs processus pathologiques se reflétait par une augmentation de la résistance périphérique à l'écoulement.

5.3 ÉVALUATION DE LA FONCTION CARDIAQUE

5.3.1 Débit cardiaque

La figure 37 résume les résultats de débit cardiaque obtenus pour les trois groupes. Une diminution significative du débit cardiaque moyen des souris drépanocytaires en comparaison avec celui des souris témoins est mise en évidence. Néanmoins, cette différence disparaît lorsque ces valeurs sont indexées pour le poids.

5.3.1.1 Débit cardiaque dans la littérature : chez la souris

Tel que mentionné précédemment, plusieurs techniques sont employées, dans la littérature, pour la mesure du débit cardiaque chez les souris. Bien que l'ensemble des valeurs obtenues par chaque auteur soit consistant, on relate une grande variabilité entre les études et les agents anesthésiques employés (Tableau 7). Les valeurs expérimentales obtenues dans notre étude, variant de 1.51 ± 0.39 à $1.57 \pm 0.18 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, dépassent considérablement celles de la littérature.

En se basant sur les formules présentées à la section 3.2.2.2, trois variables entrent dans le calcul du débit cardiaque : le diamètre aortique, la fréquence cardiaque et l'intégrale de la vitesse aortique. Une erreur d'estimation de ces variables pourrait ainsi contribuer à la surestimation du débit cardiaque.

Débit cardiaque normalisé $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$	Anesthésie	Méthode	Référence
0.48 ± 0.12	aucune	Débitmètre électromagnétique	(103)
0.53 ± 0.10	aucune	Débitmètre à temps de transit	(103)
0.53 ± 0.04	Halotane + N_2O	Mesure de conductibilité	(71)
0.59 ± 0.08	aucune	Mesure de conductibilité	(71)
0.71 ± 0.04	pentobarbital	Microsphères fluorescentes	(117)
0.72 ± 0.38	kétamine + xylazine	Échocardiographie	(118)
0.86 ± 0.07	pentobarbital	Échocardiographie	(118)
1.30 ± 0.06	aucune	Échocardiographie	(118)

Tableau 7 : Valeurs du débit cardiaque normalisé par le poids (index cardiaque), chez des souris témoins, tirées de 4 études employant différentes méthodes de mesure.

Dans notre étude, l'évaluation des diamètres aortiques était effectuée sur l'image mode-B de l'aorte en coupe longitudinale, selon les recommandations de la Société Américaine d'Échocardiographie. Selon cette société, les 3 à 5 mesures les plus élevées doivent être conservées, puisque la tendance générale est à la sous-estimation du diamètre. Il est ainsi peu probable qu'une surestimation du diamètre ait contribué aux erreurs du débit cardiaque.

D'autre part, deux études rapportent des valeurs de fréquence cardiaque chez des souris normales anesthésiées au tribromoéthanol comparables à celles obtenues dans notre étude (Tableau 8)^(88, 119). Ces résultats suggèrent que la fréquence cardiaque n'est pas une cause des erreurs d'évaluation du débit cardiaque.

Fréquence cardiaque	Référence
468.1 ± 31.4	groupe témoin
483.7 ± 52.4	groupe thalassémique
454.5 ± 42.7	groupe drépanocytaire
480 ± 3	(88)
479 ± 22	(119)

Tableau 8 : Fréquences cardiaques mesurées chez des souris témoins anesthésiées au tribromoéthanol. Les résultats de notre étude sont ombragés.

Subséquentement, la surestimation pourrait provenir de l'évaluation de l'intégrale de la vitesse en fonction du temps. Ce paramètre est grandement influencé par le profil de la vitesse aortique. Afin d'obtenir des mesures de débit exactes, l'écoulement sanguin doit être laminaire¹⁸ à l'endroit de mesure et le profil de vitesse doit être plat (Fig. 46)⁽⁷²⁾. Chez l'humain, ces conditions sont remplies dans l'aorte près de l'anneau aortique, c'est-à-dire au point de sortie du sang du cœur gauche.

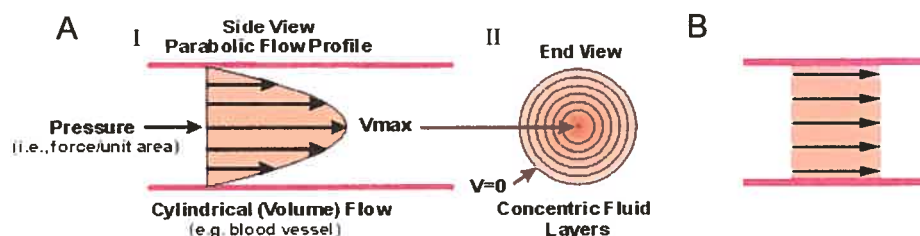


Figure 46 : Schéma illustrant : A) Un écoulement laminaire parabolique en coupe longitudinale (I) et transversale (II)⁽¹²⁰⁾; B) Un écoulement laminaire à profil de vitesse plat.

Chez la souris, le profil de vitesse aortique à la sortie du ventricule gauche n'a pas été rapporté faute d'équipements spécialisés pouvant permettre une telle mesure.

¹⁸ L'écoulement laminaire est composé de couches concentriques de sang avançant toutes dans la même direction parallèlement à l'axe du vaisseau.

Cependant, une étude rapporte, chez le rat, la présence d'un profil de vitesse parabolique dans l'aorte ascendante⁽¹²¹⁾. Pour tout profil d'écoulement parabolique, la vitesse moyenne équivaut à la moitié de la vitesse maximale ou centrale⁽¹²²⁾. La formule permettant le calcul du volume d'éjection systolique s'écrit alors :

$$SV = CSA \cdot \frac{1}{2} \cdot VTI. \quad (12)$$

En conséquence, si le profil de vitesse aortique chez la souris est parabolique, les valeurs du débit cardiaque obtenues dans notre étude seraient surestimées d'un facteur de 2. En appliquant la formule (12) dans le calcul du débit cardiaque, les débits cardiaques normalisés des souris témoins, β -thalassémiques et drépanocytaires seraient plutôt de 0.79 ± 0.09 , 0.77 ± 0.21 et 0.76 ± 0.19 ml·min⁻¹·g⁻¹, respectivement. Ces valeurs deviennent alors comparables à celles obtenues dans la littérature.

Toutefois, dans le cadre de notre étude, la comparaison des valeurs de débit cardiaque entre les groupes était possible malgré leur surestimation probante puisque toutes ces valeurs étaient obtenues en assumant la même hypothèse, c'est-à-dire que le profil de vitesse aortique était plat à l'endroit de mesure.

Mentionnons que les valeurs de débit cardiaque obtenues dans la littérature par la même méthode de mesure que nous avons employée sont inférieures (tableau 7). Ces auteurs ont également considéré que le profil de vitesse de l'aorte ascendante était laminaire et plat. Lorsque nous comparons nos valeurs moyennes de l'intégrale de la vitesse aortique à celles obtenues dans une autre étude échographique, nous constatons que nos valeurs sont significativement supérieures ($p < 0.001$, test de t)⁽¹²³⁾. Ceci indique que notre surestimation ne provient pas uniquement du profil de vitesse aortique mais probablement aussi de l'estimation de l'angle Doppler.

L'estimation de l'angle entre le faisceau ultrasonore et la direction de l'écoulement sanguin est une source potentielle d'erreur. Nous estimons que dans 65 % des cas de notre étude cet angle θ (Fig. 32B) était d'environ 60° ou inférieur, ce qui signifie que l'erreur sur la vitesse était alors acceptable⁽⁷²⁾. Rappelons qu'en échographie Doppler, la variabilité de la mesure de vitesse croît avec l'angle. Cependant, dans certains cas, il était impossible de positionner la sonde afin d'obtenir un angle optimal ($\leq 60^\circ$). Ainsi, une faible erreur dans l'estimation de l'angle θ a pu entraîner des erreurs importantes dans l'évaluation de la vitesse aortique. Il est néanmoins important de noter qu'une erreur sur l'angle peut non seulement causer une sur-estimation mais également une sous-estimation de la vitesse.

5.3.1.2 Débit cardiaque dans la littérature : chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires

Tous les auteurs rapportent un débit cardiaque significativement plus élevé chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires^(106, 107, 124, 125). L'augmentation du débit cardiaque serait principalement une conséquence hémodynamique de la diminution de la capacité de transport du sang en oxygène^(125, 126).

5.3.1.3 Interprétation des résultats de débit cardiaque des souris β -thalassémiques et drépanocytaires

Tel que mentionné lors de l'interprétation des résultats de résistance périphérique, la maladie des modèles de souris transgéniques n'est pas complètement identique à celle des patients. Il devient donc difficile de comparer les résultats d'une étude animale aux résultats cliniques. Cependant, il est possible que le cœur des souris β -thalassémiques et drépanocytaires subisse des compensations permettant de

maintenir le débit cardiaque à un niveau normal. De plus, le débit cardiaque est significativement diminué durant l'anesthésie et ce peu importe l'agent anesthésique utilisé⁽⁸⁷⁾. L'évaluation de l'effet de l'anesthésie sur le débit cardiaque des modèles de souris est donc complexe et nécessite de plus amples investigations. Ainsi, une nouvelle étude s'impose afin d'interpréter l'absence de différence rapportée dans le présent travail entre le débit cardiaque des souris transgéniques et celui des souris témoins.

5.3.2 Fonction du ventricule gauche

5.3.2.1 Fonction du ventricule gauche dans la littérature : chez la souris

Les valeurs moyennes des diamètres ventriculaires systoliques et diastoliques et de la fraction de raccourcissement correspondante, obtenues dans notre étude, sont exposées au tableau 3. Afin de comparer ces valeurs à la littérature, le tableau 9 rapporte quelques valeurs des diamètres systoliques et diastoliques du ventricule gauche, ainsi que des valeurs de la fraction de raccourcissement, obtenues par échocardiographie chez des souris témoins. La littérature montre que chez la souris pour un même agent anesthésique, la valeur des paramètres étudiés peut varier grandement. Cette variabilité peut s'expliquer par les différences entre les souches, les appareils d'échographie utilisés et le régime d'anesthésie employé. Par conséquent, les données obtenues dans notre étude sont comparables aux valeurs de la littérature.

Anesthésie	LVSD (mm)	LVDD (mm)	FS (%)	Poids (g)	n	Référence
Avertin	2.3 ± 0.09	3.8 ± 0.09	40 ± 0.83	30 ± 1	6	(88)
Avertin	2.13 ± 0.28	3.73 ± 0.19	35.5 ± 2.4	n.d.	12	(104)
Kétamine-xylazine	2.22 ± 0.25	3.73 ± 0.5	41.0 ± 5.9	27.0 ± 4.5	12	(127)
Kétamine-xylazine	2.34 ± 0.08	3.57 ± 0.09	34.6 ± 1.1	24.3 ± 0.6	12	(118)
Isoflurane	2.45 ± 0.09	3.84 ± 0.09	36.2*	20 ± 1	17	(123)
Isoflurane	3.02 ± 0.61	4.23 ± 0.48	29 ± 9	29.2 ± 8.8	28	(128)
Pentobarbital	2.05 ± 0.08	3.06 ± 0.09	33.1 ± 1.8	23.7 ± 0.4	12	(118)
aucune	1.22 ± 0.05	2.52 ± 0.06	51.4 ± 1.1	24.0 ± 0.4	24	(118)

Tableau 9 : Valeurs des diamètres systoliques (LVSD) et diastoliques (LVDD) du ventricule gauche et de la fraction de raccourcissement (FS) mesurés par échocardiographie chez des souris témoins anesthésiées avec différents agents. * Cette valeur est calculée à partir des valeurs moyennes de LVDD et LVSD fournies par l'auteur. n.d. : non-disponible.

5.3.2.1 Fonction du ventricule gauche dans la littérature :

chez les patients β -thalassémiques et drépanocytaires

Dans la littérature, les auteurs rapportent une dilatation du ventricule gauche chez les patients atteints d'anémie falciforme^(107; 125; 126). Cependant, la fonction ventriculaire gauche demeure normale chez une large proportion des patients. Ces patients ont une fraction d'éjection systolique¹⁹ et une fraction de raccourcissement

¹⁹ La fraction d'éjection (FE) est calculée par la formule: $FE = \frac{(LVDV - LVSF)}{LVDV} \times 100$, où LVDV

représente le volume du ventricule gauche en fin de diastole et LVSF, le volume du ventricule gauche en fin de systole.

comparables aux sujets témoins^(107; 125). L'équipe de Denenberg étudie également d'autres indices de la fonction cardiaque et constate une dysfonction de la contractilité du myocarde chez les patients drépanocytaires⁽¹⁰⁷⁾. Enfin, l'équipe de Rees constate chez des enfants atteints d'anémie falciforme, âgés de 2 à 14 ans, une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche ainsi qu'une diminution de la performance ventriculaire gauche⁽¹²⁶⁾.

Chez les patients β -thalassémiques, atteints de thalassémie majeure ou mineure, les diamètres et volumes du ventricule gauche en systole et diastole sont significativement augmentés^(106; 129). La fraction d'éjection et la fraction de raccourcissement du ventricule gauche sont diminuées uniquement chez les patients atteints de thalassémie majeure⁽¹²⁹⁾. Tel qu'expliqué à la section 2.7.1.3, les patients β -thalassémiques sévèrement atteints manifestent une surcharge de fer. Ce fer s'accumule dans plusieurs sites tissulaires dont le foie et le cœur, ce qui affecte la fonction cardiaque.

5.2.3 Interprétation des résultats de fonction ventriculaire gauche des souris β -thalassémiques et drépanocytaires

L'étude de la fonction cardiaque des souris β -thalassémiques indique une dilatation du ventricule gauche. Cependant la fraction de raccourcissement du ventricule gauche demeure inchangée par rapport aux souris témoins. Ces résultats indiquent que la maladie des souris β -thalassémiques induit un remodelage du ventricule gauche qui se reflète par une dilatation de la cavité ventriculaire. Cependant, la contractilité ventriculaire semble demeurer intacte. En général, la dilatation du ventricule gauche indique une surcharge ventriculaire causée par une

augmentation de la pré-charge ou de la post-charge ventriculaire. La pré-charge représente la charge initiale à laquelle sont soumises les fibres myocardiques par la pression diastolique. La post-charge se définit comme la charge s'opposant à l'effort de contraction des fibres myocardiques en systole. Un des facteurs s'opposant à l'éjection est la résistance artérielle et artériolaire.

Le groupe de souris drépanocytaire présentait des valeurs de diamètres systoliques et diastoliques ainsi qu'une fraction de raccourcissement du ventricule gauche comparables à celles des souris témoins. Ainsi, le cœur des souris drépanocytaires ne semble pas subir un remodelage ventriculaire gauche ou une altération de sa contractilité. Cependant, il est probable que la pathologie cardiaque chez les souris drépanocytaire se développe avec l'âge. La moyenne d'âge de ce groupe de souris n'était que de 3.7 mois. Une nouvelle étude s'impose afin d'évaluer l'évolution de la fonction cardiaque des modèles de souris transgéniques drépanocytaires à différents âges.

Finalement, la méthode d'évaluation de la fonction cardiaque chez la souris, employant uniquement l'imagerie en mode M, comporte des limitations puisqu'elle se base uniquement sur des mesures unidimensionnelles du ventricule gauche. Cependant, les appareils échographiques cliniques utilisés généralement dans la littérature ne disposent pas d'une résolution spatiale et temporelle suffisante pour l'évaluation bidimensionnelle du ventricule gauche. Des développements récents de l'appareil échographique Vevo 660 permettent d'obtenir des images mode B à haute résolution spatiale et temporelle. Ainsi, il sera possible lors d'études futures d'effectuer une évaluation bidimensionnelle du ventricule gauche permettant

également d'estimer les volumes systoliques et diastoliques, la fraction d'éjection ainsi que la masse du ventricule gauche.

5.4 EFFICACITÉ DE L'INDEX DE RÉSISTANCE DE POURCELOT ET DE LA RÉSISTANCE PÉRIPHÉRIQUE TOTALE COMME TEST DIAGNOSTIC

Généralement, la courbe ROC représente le taux de vrais positifs²⁰ (sensibilité) en fonction du taux de faux positifs²¹ (100-spécificité) pour différents seuils. Chaque point sur la courbe représente la sensibilité et spécificité correspondante à un seuil de décision spécifique. L'aire sous la courbe ROC représente la probabilité qu'un individu malade choisi au hasard obtienne une valeur supérieure (ou inférieure, selon le test diagnostique) à celle d'un individu sain choisi au hasard. Lorsqu'un test diagnostique discrimine parfaitement tous les sujets sains des sujets malades, l'aire sous la courbe ROC est égale à 1. A contrario, l'aire sous la courbe est égale à 0.5 lorsque le test sous étude ne peut distinguer les deux groupes (la courbe ROC coïncide ainsi avec la diagonale). Dans ce cas, il n'y a pas de différence dans la distribution des résultats du test entre les deux groupes (malades et sains).

En guise de rappel, les tests diagnostiques sous étude étaient : l'index de résistance de Pourcelot de l'artère carotide, celui dans l'aorte abdominale et la résistance périphérique totale. L'index de résistance de l'artère carotide et la résistance périphérique totale se sont avérés efficaces pour séparer les deux groupes puisque l'intervalle de confiance sur l'aire sous la courbe ROC de ces tests exclut la valeur d'aire théorique de 0.5. Cependant, l'intervalle de confiance sur l'aire sous la courbe

²⁰ Nombre d'individus malades correctement classifiés.

²¹ Nombre d'individus sains diagnostiqués malades.

ROC de l'index de résistance dans l'aorte abdominale inclut cette valeur théorique de 0.5. Ce test ne peut donc pas discriminer les souris saines des souris pathologiques.

De plus, la faible différence entre l'aire sous la courbe ROC de l'index de résistance de l'artère carotide et celle de la résistance périphérique totale (0.003) indique que ces tests sont équivalents au point de vue d'efficacité diagnostique. Cette constatation est importante considérant la méthodologie impliquée dans le calcul des valeurs pour chaque test. L'index de résistance de Pourcelot implique uniquement l'acquisition de signaux Doppler artériels et la mesure simple des vitesses systoliques et diastoliques. La résistance périphérique totale nécessite la mesure de la pression artérielle moyenne ainsi que le débit cardiaque. Cette procédure est plus complexe et nécessite un temps d'évaluation beaucoup plus long. Ainsi, à efficacité diagnostique équivalente, l'index de résistance de Pourcelot dans l'artère carotide comporte un avantage majeur sur la résistance périphérique totale pour l'identification non invasive de souris atteintes de β -thalassémie et d'anémie falciforme.

Cependant, il faut noter que cette analyse de courbe ROC comporte une limitation majeure, considérant le nombre de souris dans les groupes diagnostiques. En fait, pour tirer des conclusions justes, il est suggéré d'employer un nombre minimum de 100 cas au total⁽¹³⁰⁾. Chaque groupe doit inclure un minimum de 50 cas afin que chaque cas représente au plus 2% des observations. D'autres souris devraient donc être étudiées afin d'augmenter le nombre de cas et d'améliorer notre analyse ROC.

5.4 AMÉLIORATIONS POSSIBLES ET TRAVAUX FUTURS

La méthodologie expérimentale de cette étude pourrait être améliorée afin de corriger certains biais et diminuer la variabilité des résultats. Cette section propose des améliorations et investigations possibles pouvant répondre aux faiblesses et au besoin d'études futures, relatées ci-dessus.

Premièrement, l'échantillon de souris dans chaque groupe devait être augmenté. Les souris pathologiques devraient être appariés à des souris témoins du même âge. Il serait également intéressant de composer plusieurs groupes représentant différentes tranches d'âges afin d'évaluer l'évolution des processus pathologiques avec le vieillissement.

Deuxièmement, une étude comparative devrait être effectuée chez les trois groupes de souris entre l'état éveillé et anesthésié. Cette étude permettrait d'évaluer l'influence de l'anesthésie sur la pression artérielle, le débit cardiaque, l'index de résistance de Pourcelot et la résistance périphérique totale.

Troisièmement, il serait pertinent d'évaluer la fonction endothéliale vasculaire chez les modèles de souris β -thalassémiques puisqu'aucune étude similaire n'a été effectuée jusqu'à présent chez ces modèles. La littérature suggère une altération de cette fonction chez les patients β -thalassémiques⁽⁹⁹⁾. Cette étude pourrait s'effectuer en utilisant trois différentes méthodes. Une première méthode consisterait à évaluer les réponses vasodilatatrices *ex vivo* et *in vitro* de segments d'artères isolées prélevées chez des souris β -thalassémiques ou témoins. Une deuxième méthode visualiserait *in vivo*, par microscopie intravitale, la dilatation des artérioles du muscle crémaster suite à l'application topique de vasodilatateurs dépendant ou non de l'endothélium. De plus,

périphérique à l'écoulement. L'évaluation de la fonction vasculaire *in vivo* était effectuée en mesurant la variation de l'index de résistance en fonction du temps suite à l'injection intraveineuse d'un vasodilatateur dépendant de endothélium, l'acétylcholine²², ou indépendant de endothélium, le nitroprussiate de sodium²³ (voir annexe I pour le protocole détaillé). Les résultats préliminaires démontrent la faisabilité de cette méthode (Fig. 47).

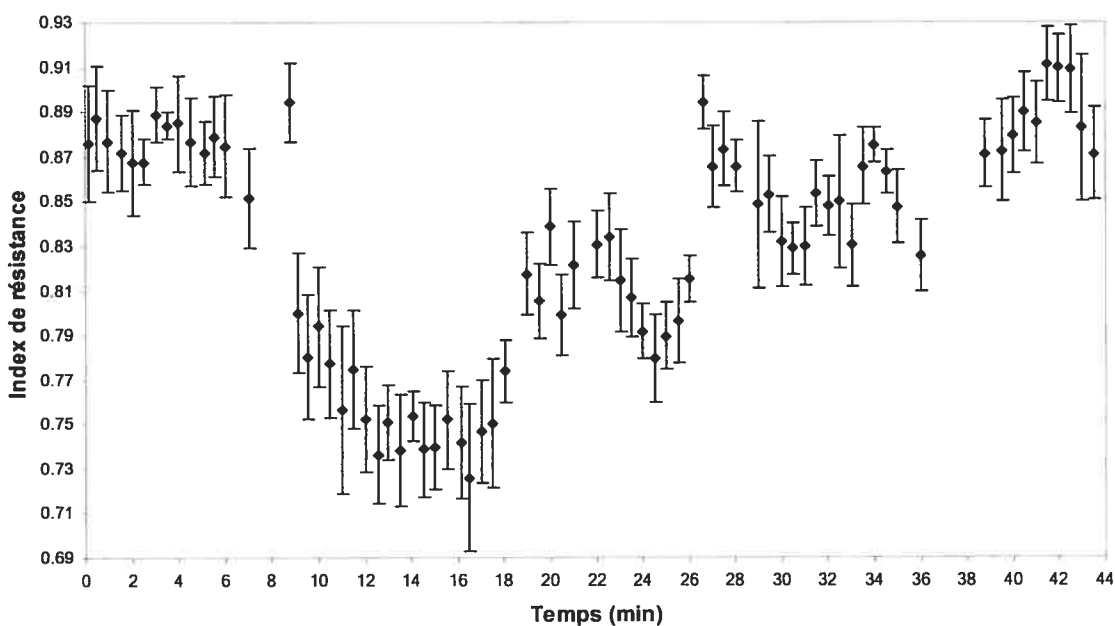


Figure 47 : Variation de l'index de résistance de l'aorte abdominale en fonction du temps suite à l'injection intraveineuse d'acétylcholine (1 µg/kg) au temps $t = 8$ minutes chez une souris témoin. Chaque point représente une moyenne de 10 valeurs d'index de résistance de Pourcelot et les barres d'erreurs présentent l'écart type.

Finalement, le débit cardiaque pourrait être mesuré de nouveau par d'autres techniques échographiques en mode B. À titre d'exemple, mentionnons la possibilité d'évaluation du volume à partir de l'aire du ventricule gauche en coupe longitudinale

²² L'acétylcholine stimule la libération de NO par l'endothélium vasculaire.

²³ Le nitroprussiate de sodium induit directement la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires.

Finalement, le débit cardiaque pourrait être mesuré de nouveau par d'autres techniques échographiques en mode B. À titre d'exemple, mentionnons la possibilité d'évaluation du volume à partir de l'aire du ventricule gauche en coupe longitudinale ou de la sommation de l'aire de disques d'épaisseur connue de la cavité ventriculaire gauche en coupe transverse (Fig. 48)⁽⁷³⁾.

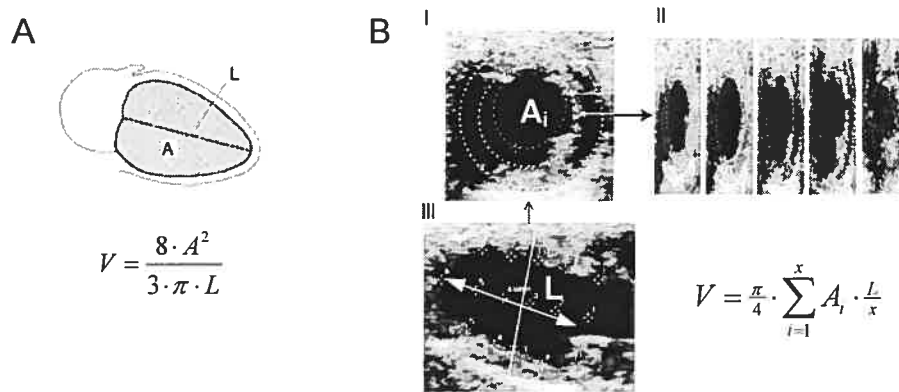


Figure 48: A) Schéma représentant la méthode du calcul bidimensionnel du volume ventriculaire gauche en coupe longitudinale. V représente le volume de la cavité ventriculaire gauche, A son aire longitudinale et L , sa longueur. B) Analyse échographique du volume ventriculaire gauche par sommation de disques. Un nombre x d'images en mode B du ventricule gauche en coupe transverse sont enregistrés à distance égale de la base à l'apex du cœur (I et II). L'aire interne (A_i) de chaque tranche i du ventricule gauche est calculée en systole et en diastole (I). La longueur L du ventricule gauche est mesurée sur une image en coupe longitudinale (III).

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer chez des souris transgéniques par une méthode non effractive les anomalies cardiovasculaires associées à la β -thalassémie et à l'anémie falciforme.

Dans un premier temps, nous avons démontré qu'il était possible de mesurer la résistance périphérique à l'écoulement sanguin chez la souris en utilisant un appareil ultrasonore à haute-fréquence. Les deux approches employées étaient la mesure de la résistance périphérique totale et l'évaluation de l'index de résistance de Pourcelot. Cette étude est à ce jour la première à rapporter la mesure de l'index de résistance de Pourcelot chez la souris. Dans un deuxième temps, nous avons montré que la résistance à l'écoulement sanguin était supérieure chez les souris transgéniques β -thalassémiques et drépanocytaires en comparaison avec les souris témoins. Finalement, la fonction cardiaque évaluée par échocardiographie n'était pas altérée chez les modèles de souris β -thalassémiques et drépanocytaires.

Bien qu'il comporte certaines limitations, l'index de résistance de Pourcelot est un outil efficace dans l'évaluation de perturbations circulatoires. L'avantage principal de cet index est sa facilité d'emploi et sa capacité d'évaluer des anomalies circulatoires. De ce fait, cette technique ultrasonore non-intrusive pourrait être utilisée pour le phénotypage de souris pathologiques et pourrait être décisive pour le suivi de stratégies thérapeutiques. Tel que mentionné à l'appendice II, cette approche est également potentiellement utilisable pour évaluer la fonction endothéliale vasoactive chez la souris de manière non-intrusive.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer chez des souris transgéniques par une méthode non effractive les anomalies cardiovasculaires associées à la β -thalassémie et à l'anémie falciforme.

Dans un premier temps, nous avons démontré qu'il était possible de mesurer la résistance périphérique à l'écoulement sanguin chez la souris en utilisant un appareil ultrasonore à haute-fréquence. Les deux approches employées étaient la mesure de la résistance périphérique totale et l'évaluation de l'index de résistance de Pourcelot. Cette étude est à ce jour la première à rapporter la mesure de l'index de résistance de Pourcelot chez la souris. Dans un deuxième temps, nous avons montré que la résistance à l'écoulement sanguin était supérieure chez les souris transgéniques β -thalassémiques et drépanocytaires en comparaison avec les souris témoins. Finalement, la fonction cardiaque évaluée par échocardiographie n'était pas altérée chez les modèles de souris β -thalassémiques et drépanocytaires.

Bien qu'il comporte certaines limitations, l'index de résistance de Pourcelot est un outil efficace dans l'évaluation de perturbations circulatoires. L'avantage principal de cet index est sa facilité d'emploi et sa capacité d'évaluer des anomalies circulatoires. De ce fait, cette technique ultrasonore non-intrusive pourrait être utilisée pour le phénotypage de souris pathologiques et pourrait être décisive pour le suivi de stratégies thérapeutiques. Tel que mentionné à l'appendice II, cette approche est également potentiellement utilisable pour évaluer la fonction endothéliale vasoactive chez la souris de manière non-intrusive.

RÉFÉRENCES

1. **Vander A., Sherman J. and Luciano D.** *Human physiology: The Mechanisms of Body Function*. New York: McGraw Hill, 2001.
2. **Guyton A.C. and Hall J.E.** *Textbook of medical physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001.
3. **Nichols WW and O'Rourke MF** . *McDonald's blood flow in arteries: theoretical, experimental and clinical principles*. London, New York: Oxford University Press, 1998.
4. **Sherwood L.** *Human physiology: from cells to systems*. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1997.
5. **Weatherall DJ and P rovan AB.** Red cells I: inherited anaemias. *Lancet* 355: 1169-1175, 2000.
6. **Weatherall DJ** . Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews Genetics* 2: 245-255, 2001.
7. **P orth CM.** *Pathophysiology: concepts of altered health states*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
8. **H offman R.** *Hematology: basic principles and practice*. New York: Churchill-Livingstone, 2000.
9. **Weatherall DJ and Clegg JB** . *The thalassemia syndromes*. Oxford: Blackwell Science, 2001.
10. **Beu tler E., Lichtman M.A., Coller B.S., Kipps T.J. and Seligsohn U.** *Williams hematology*. New York: McGraw Hill, Medical publishing division, 2001.

11. **Tuzmen S and Schechter AN** . Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations. *Blood Reviews* 15: 19-29, 2001.
12. **Stamatoyannopoulos G., Majerus P .W., Perlmutter R.M. and Varmus H.** *The Molecular Basis of Blood Diseases*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001.
13. **Olivieri NF** . The beta-thalassemias. *New England Journal of Medicine* 341: 99-109, 1999.
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. **Schrier SL** . Pathophysiology of thalassemia. *Current Opinion in Hematology* 9: 123-126, 2002.
16. **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.
17. **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.
18. **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.
19. **Olivieri NF and Brittenham GM.** Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 89: 739-761, 1997.
20. **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.
21. **Borgna -Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Piga A, Di Gregorio F, Gamberini MR, Sabato V, Melevendi C,**

- Cappellini MD and Verlato G.** Survival and disease complications in thalassemia major. *Annals of the New York Academy of Sciences* 850: 227-231, 1998.
22. **Borgna P 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.
23. **Eldor A and Rachmilewitz EA .** The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood* 99: 36-43, 2002.
24. **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.
25. **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.
26. **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.
27. **Kuypers F A, Yuan J, Lewis RA, Snyder LM, Kiefer CR, Bunyaratvej A, Fucharoen S, Ma L, Styles L, de Jong K and Schrier SL.** Membrane Phospholipid Asymmetry in Human Thalassemia. *Blood* 91: 3044-3051, 1998.
28. **H ovav 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.
29. **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.
30. **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.

31. **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.
32. **Rund D and Rachmilewitz E** . Advances in the pathophysiology and treatment of thalassemia. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 20: 237-254, 1995.
33. **Rund D and Rachmilewitz E** . New trends in the treatment of beta-thalassemia. *Critical Reviews in Oncology-Hematology* 33: 105-118, 2000.
34. **Savulescu J** . Thalassaemia major: the murky story of deferiprone. *BMJ* 328: 358-359, 2004.
35. **Lucarelli G, Andreani M and Angelucci E** . The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Reviews* 16: 81-85, 2002.
36. **Popp RA, Popp DM, Shinpock SG, Yang MY, Mural JG, Aguinaga MP, Kopsombut P, Roa PD, Turner EA and Rubin EM**. A transgenic mouse model of hemoglobin S Antilles disease. *Blood* 89: 4204-4212, 1997.
37. Sickle Cell Disease Guideline Panel. Sickle cell disease: screening, diagnosis, management, and counseling in newborns and infants. Clinical Practice Guideline No. 6. 1993. Rockville, MD, Agency for Health Care Policy and Research, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. AHCPR Pub. No. 93-0562.
38. **Yardumian A and Crawley C** . Sickle cell disease. *Clinical Medicine* 1: 441-446, 2001.
39. **Bunn H F**. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine* 337: 762-769, 1997.
40. **Bookchin RM and Lew VL** . Sickle red cell dehydration: mechanisms and interventions. *Current Opinion in Hematology* 9: 107-110, 2002.

41. **Hebbel RP**. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* 77: 214-237, 1991.
42. **Ballas SK**. Sickle cell anaemia: progress in pathogenesis and treatment. *Drugs* 62: 1143-1172, 2002.
43. **Kaul DK, Fabry ME and Nagel RL**. The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood Reviews* 10: 29-44, 1996.
44. **Kaul DK, Fabry ME and Nagel RL**. Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 3356-3360, 1989.
45. **Patt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH and Klug PP**. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *New England Journal of Medicine* 330: 1639-1644, 1994.
46. **Frenette PS**. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Current Opinion in Hematology* 9: 101-106, 2002.
47. **Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP and Vercellotti GM**. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 96: 2451-2459, 2000.
48. **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.
49. **Ataga KI and Orringer EP**. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *American Journal of Medicine* 115: 721-728, 2003.
50. **Morris CL, Rucknagel DL and Joiner CH**. Deoxygenation-induced changes in sickle cell-sickle cell adhesion. *Blood* 81: 3138-3145, 1993.

51. **Schmid -Schonbein H and Heidtmann H.** Nonspecific rheological abnormalities in sickle cell disease. *Blood Cells* 8: 89-101, 1982.
52. **Tomer A, Harker LA, Kasey S and Eckman JR.** Thrombogenesis in sickle cell disease. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 137: 398-407, 2001.
53. **Bookchin RM and Lew VL .** Pathophysiology of sickle cell anemia. *Hematology - Oncology Clinics of North America* 6: 1241-1253, 1996.
54. **Steinberg MH .** Management of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine* 340: 1021-1030, 1999.
55. **Manci EA, Culbertson DE, Yang YM, Gardner TM, Powell R, Haynes J, Jr., Shah AK and Mankad VN.** Causes of death in sickle cell disease: an autopsy study. *British Journal of Haematology* 123: 359-365, 2003.
56. **Steinberg MH , Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Varma M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Sauntharajah Y, Telfer M, Vichinsky E, Claster S, Shurin S, Bridges K, Waclawiw M, Bonds D and Terrin M.** Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA* 289: 1645-1651, 2003.
57. **Skow LC, Burkhart BA, Johnson F M, Popp RA, Popp DM, Goldberg SZ, Anderson WF, Barnett LB and Lewis SE.** A mouse model for beta-thalassemia. *Cell* 34: 1043-1052, 1983.
58. **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.
59. **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.

60. **P aszty C, Brion CM, Mancini E, Witkowska HE, Stevens ME, Mohandas N and Rubin EM.** Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. *Science* 278: 876-878, 1997.
61. **Ryan TM, Ciavatta DJ and Townes TM .** Knockout-transgenic mouse model of sickle cell disease. *Science* 278: 873-876, 1997.
62. **Trudel M, De P aepe ME, Chretien N, Saadane N, Jacmain J, Sorette M, Hoang T and Beuzard Y.** Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood* 84: 3189-3197, 1994.
63. **Trudel M, Garel MC, Saadane N, Rouyer-Fessard P, Vidaud D, Costantini F and Beuzard Y.** Towards a mouse model for sickle cell disease: HB SAD. *Nouvelle Revue Francaise d Hematologie* 32: 407-408, 1990.
64. **McDicken WN .** *Diagnostic ultrasonics : Principles and use of instruments.* Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone, 1991.
65. **Johns C, Gavras I, H andy DE, Salomao A and Gavras H.** Models of Experimental Hypertension in Mice. *Hypertension* 28: 1064-1069, 1996.
66. **Krege JH , Hodgkin JB, Hagaman JR and Smithies O. A** Noninvasive Computerized Tail-Cuff System for Measuring Blood Pressure in Mice. *Hypertension* 25: 1111-1115, 1995.
67. **Lorenz JN .** A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology* 282: R1565-R1582, 2004.
68. **P ourcelot L.** Applications cliniques de l'examen Doppler transcutané. In: *Vélocimétrie ultrasonore Doppler*, edited by Perroneau P. Paris: 1975, p. 213-240.
69. **H alpern EJ, Merton DA and Forsberg F.** Effect of distal resistance on Doppler US flow patterns. *Radiology* 206: 761-766, 1998.

70. **Spencer JA, Giussani DA, Moore P J and Hanson MA.** In vitro validation of Doppler indices using blood and water. *Journal of Ultrasound in Medicine* 10: 305-308, 1991.
71. **Vogel J .** Measurement of cardiac output in small laboratory animals using recordings of blood conductivity. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* 273: H2520-H2527, 1997.
72. **Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A and Zoghbi WA.** Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: A report from the Doppler quantification task force of the nomenclature and standards committee of the American Society of Echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography* 15: 167-184, 2002.
73. **Schiller NB, Shah P M, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D and Schnittger I.** Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *Journal of the American Society of Echocardiography* 2: 358-367, 1989.
74. **Saka N, Sukur M, Bundak R, Anak S, Neyzi O and Gedikoglu G.** Growth and puberty in thalassemia major. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 8: 181-186, 1995.
75. **Soliman AT, El Banna N, Abdel F M, ElZalabani MM and Ansari BM.** Bone mineral density in prepubertal children with beta-thalassemia: correlation with growth and hormonal data. *Metabolism: Clinical & Experimental* 47: 541-548, 1998.
76. **Silva CM and Viana MB .** Growth Deficits in Children with Sickle Cell Disease. *Archives of Medical Research* 33: 308-312, 2002.
77. **Thomas P W, Singhal A, Hemmings-Kelly M and Serjeant GR.** Height and weight reference curves for homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 82: 204-208, 2000.
78. **Janssen BJA and Smits JF M.** Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetic modification. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R1545-R1564, 2002.

79. **Mattson DL** . Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *American Journal of Hypertension* 14: 405-408, 2001.
80. **Veglio F , Melchio R, Rabbia F, Molino P, Genova GC, Martini G, Schiavone D, Piga A and Chiandussi L**. Blood Pressure and Heart Rate in Young Thalassemia Major Patients. *American Journal of Hypertension* 11: 539-547, 1998.
81. **Nath KA, Shah V, Haggard JJ, Croatt AJ, Smith LA, Hebbel RP and Katusic ZS**. Mechanisms of vascular instability in a transgenic mouse model of sickle cell disease. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology* 279: R1949-R1955, 2000.
82. **Kaul DK, Liu XD, Fabry ME and Nagel RL**. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* 278: H1799-H1806, 2000.
83. **Foucan L, Geneviev I, Bangou J, Etienne-Julan M, Le Turdu C and Salmi LR**. Arterial blood pressure in homozygote patients with drepanocytosis. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 47: 329-334, 1999.
84. **Johnson CS and Giorgio AJ** . Arterial blood pressure in adults with sickle cell disease. *Arch Intern Med* 141: 891-893, 1981.
85. **McKerrell TD, Cohen HW and Billett HH**. The older sickle cell patient. *American Journal of Hematology* 76: 101-106, 2004.
86. **Pegelow CH, Colangelo L, Steinberg M, Wright EC, Smith J, Phillips G and Vichinsky E**. Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *American Journal of Medicine* 102: 171-177, 1997.
87. **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.
88. **Heart CYT, Burnett JC, Jr. and Redfield MM**. Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1938-H1945, 2001.

89. **Roth DM, Swaney JS, Dalton ND, Gilpin EA and Ross J, Jr.** Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* 282: H2134-H2140, 2002.
90. **P ourcelot L.** Indications of Doppler's ultrasonography in the study of peripheral vessels. *Revue du Praticien* 25: 4671-4680, 1975.
91. **P latt JF.** Doppler ultrasound of the kidney. *Seminars in Ultrasound, CT, and MRI* 18: 22-32, 1997.
92. **F lais S, Lassau N and Leclere J.** Tumor vascularization: contribution of Doppler ultrasonography. *Journal de Radiologie* 77: 1207-1212, 1996.
93. **Joynt LK, P latt JF, Rubin JM, Ellis JH and Bude RO.** Hepatic artery resistance before and after standard meal in subjects with diseased and healthy livers.[see comment]. *Radiology* 196: 489-492, 1995.
94. **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.
95. **Strandness DE .** *Duplex scanning in vascular disorders*. New York: Raven Press, 1993.
96. **Van Bortel LM and Spek JJ .** Influence of aging on arterial compliance. *Journal of Human Hypertension* 12: 583-586, 1998.
97. **Moore A, Mangoni AA, Lyons D and Jackson SHD.** The cardiovascular system. *British Journal of Clinical Pharmacology* 56: 254-260, 2003.
98. **Bude RO and Rubin JM .** Relationship between the Resistive Index and Vascular Compliance and Resistance. *Radiology* 211: 411-417, 1999.
99. **Cheung YF , Chan GC and Ha SY.** Arterial stiffness and endothelial function in patients with beta-thalassemia major. *Circulation* 106: 2561-2566, 2002.
100. **Tsomi K, Karagiorga -Lagana M, Karabatsos F, Fragodimitri C, Vliet-Konstantinidou C, Premetis E and**

- Stamoulakatou A.** Arterial elastorrhexis in beta-thalassaemia intermedia, sickle cell thalassaemia and hereditary spherocytosis. *European Journal of Haematology* 67: 135-141, 2001.
101. **Tsomi K, Karagiorga -Lagana M, Fragodimitri C, Karabatsos F and Katsiki V.** Arterial elastorrhexis: manifestation of a generalized elastic tissue disorder in beta-thalassaemia major. *European Journal of Haematology* 63: 287-294, 1999.
102. **Eberhardt RT, McMahon L, Duffy SJ, Steinberg MH, Perrine SP, Loscalzo J, Coffman JD and Vita JA.** Sickle cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels. *American Journal of Hematology* 74: 104-111, 2003.
103. **Janssen BJA, Debets J, Leenders P and Smits J.** Chronic measurement of cardiac output in conscious mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R928-R935, 2002.
104. **Bale TL, Hoshijima M, Gu Y, Dalton N, Anderson KR, Lee KF, Rivier J, Chien KR, Vale WW and Peterson KL.** The cardiovascular physiologic actions of urocortin II: Acute effects in murine heart failure. *PNAS* 101: 3697-3702, 2004.
105. **Melo LG, Veress AT, Ackermann U, Pang SC, Flynn TG and Sonnenberg H.** Chronic hypertension in ANP knockout mice: contribution of peripheral resistance. *Regulatory Peptides* 79: 109-115, 1999.
106. **Bo si 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.
107. **Denenberg BS, Criner G, Jones R and Spann JF.** Cardiac function in sickle cell anemia. *American Journal of Cardiology* 51: 1674-1678, 1983.
108. **Lonsdorfer J, Bogui P, Otayeck A, Bursaux E, Poyart C and Cabannes R.** Cardiorespiratory adjustments in chronic sickle cell anemia. *Bulletin Europeen de Physiopathologie Respiratoire* 19: 339-344, 1983.

109. **Anand IS, Chandrashekhar Y, Wander GS and Chawla LS .** Endothelium-Derived Relaxing Factor Is Important in Mediating the High Output State in Chronic Severe Anemia. *Journal of the American College of Cardiology* 25: 1402-1407, 1995.
110. **F ung YC.** *Biomechanics: circulation.* New York, Berlin, Heidelberg : Springer, 1997.
111. **Chien S .** *Biophysical behavior of red cells in suspensions.* In *The Red Blood Cell.* D. M. Surgenor, editor. Academic Press, New York, San Francisco, London. 1031-1133, 1975.
112. **Belhassen L, P elle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C, Lacombe C, Galacteros F and Adnot S.** Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood* 97: 1584-1589, 2001.
113. **Davies SC and Roberts -Harewood M.** Blood transfusion in sickle cell disease. *Blood Reviews* 11: 57-71, 1997.
114. **Tillmann W and Schroter W .** Rheological properties of erythrocytes in heterozygous and homozygous beta thalassaemia. *British Journal of Haematology* 43: 401-411, 1979.
115. **Crowley JP , Metzger JB, Merrill EW and Valeri CR.** Whole blood viscosity in beta thalassaemia minor. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 22: 229-235, 1992.
116. **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.
117. **Richer C, Domergue V, Gervais M, Bruneval P and Giudicelli JF.** Fluospheres for Cardiovascular Phenotyping Genetically Modified Mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 36: 396-404, 2000.
118. **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.

119. **Kiatchoosakun S, Kirkpatrick D and H oit BD.** Effects of tribromoethanol anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular function in mice. *Comparative Medicine* 51: 26-29, 2001.
120. **Klabunde RE .** *Cardiovascular physiology concepts*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
121. **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.
122. **P hoon CKL, Aristizabal O and Turnbull DH.** Spatial velocity profile in mouse embryonic aorta and Doppler-derived volumetric flow: a preliminary model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H908-H916, 2002.
123. **Zhou YQ, F oster 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.
124. **Aessopos A, F armakis D, Karagiorga M, Voskaridou E, Loutradi A, Hatziliami A, Joussef J, Rombos J and Loukopoulos D.** Cardiac involvement in thalassemia intermedia: a multicenter study. *Blood* 97: 3411-3416, 2001.
125. **Covitz W, Espeland M, Gallagher D, H ellenbrand W, Leff S and Talner N.** The heart in sickle cell anemia. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD). *Chest* 108: 1214-1219, 1995.
126. **Rees AH , Stefadouros MA, Strong WB, Miller MD, Gilman P, Rigby JA and McFarlane J.** Left ventricular performance in children with homozygous sickle cell anaemia. *British Heart Journal* 40: 690-696, 1978.
127. **Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman H A, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR and Ross J.** Transthoracic Echocardiography in Models of Cardiac Disease in the Mouse. *Circulation* 94: 1109-1117, 1996.

128. **Collins KA, Korcarz CE, Shroff SG, Bednarz JE, Fentzke RC, Lin H, Leiden JM and Lang RM.** Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* 280: H1954-H1962, 2001.
129. **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 β -Thalassemia Intermedia : A Doppler Echocardiography Study. *Chest* 121: 506-512, 2002.
130. **Metz CE .** Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Medicine* 8: 283-298, 1978.

ANNEXE I

MESURE DE LA FONCTION ENDOTHÉLIALE VASCULAIRE *IN VIVO*

Protocole

Les procédures d'anesthésie et de maintien de la température sont effectuées tel que décrit dans la section 2.2.1. L'imagerie échographique en mode-B est utilisée afin de localiser l'aorte abdominale au niveau du rein avant les bifurcations rénales. La sonde échographique est fixée à l'endroit de mesure et des acquisitions Doppler sont effectuées dans l'aorte abdominale durant 5 minutes à 30 secondes d'intervalle. Une injection intraveineuse d'un bolus de 150 μL est effectuée au niveau de la veine caudale sans déplacer l'animal ou la sonde échographique. Ce bolus contient soit une dose de 1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'acétylcholine, vasodilatateur endothélium-dépendant, soit une dose de 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de nitroprussiate de sodium, vasodilatateur endothélium-indépendant, ou de la solution saline. Suite à l'injection, des acquisitions Doppler sont effectuées dans l'aorte abdominale au même niveau qu'auparavant durant 40 minutes à 30 secondes d'intervalle. L'animal est surveillé jusqu'à son réveil. Les index de résistance de Pourcelot sont ensuite calculés à partir des enregistrements Doppler et sont moyennés sur 10 cycles cardiaques.

ANNEXE II

ARTICLE DE CONFÉRENCE :

Stoyanova E., Foster F.S., Trudel M., Cloutier G., *Comparison of Doppler ultrasound flow resistance indices in beta-thalassemic, sickle cell anemic and control mice*, Proceedings of the IEEE International Symposium on Biomedical Imaging, Arlington, VA, vol. 1, p.956-59

COMPARISON OF DOPPLER ULTRASOUND FLOW RESISTANCE INDICES IN BETA-THALASSEMIC, SICKLE CELL ANEMIC AND CONTROL MICE

Ekatherina Stoyanova¹, Marie Trudel², F. Stuart Foster³, Guy Cloutier¹

¹University of Montreal Hospital Research Center, Montreal, Canada

²Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Canada

³Sunnybrook and Women's College Health Sciences Center, Toronto, Canada

ABSTRACT

Sickle cell anemia and β -thalassemia are two genetic hematological diseases. These conditions trigger thromboembolic events and microcirculatory disorders generating an increase in vascular resistance to blood flow, which can be measured by radiological techniques. The purpose of this study was to demonstrate the possibility of measuring non-invasively peripheral vascular resistance to blood flow in mice using a high-frequency ultrasound imaging system. Four groups were included in the study: 9 control mice, 16 β -thalassemic mice ($Hbb^{d-thal/d-thal}$) and 9 sickle cell anemic mice (α -/- SAD). The Pourcelot resistive index was used to characterize Doppler waveforms of the carotid artery and abdominal aorta. Resistive indices were significantly increased ($p < 0.05$) in β -thalassemic and sickle cell anemic mice compared to controls in both arteries. Measurements of echographic resistive indices allowed detecting the consequences of microrheological blood flow disorders in these small experimental animals. This finding is of high significance in the context of functional genomic studies.

1. INTRODUCTION

Sickle cell anemia and β -thalassemia are genetic hemoglobinopathies resulting respectively, in altered hemoglobin production and synthesis. These syndromes are characterized by morphological and functional erythrocyte abnormalities causing decreased red blood cell life span leading to chronic anemia [1,2]. Affected patients suffer from diverse clinical manifestations mainly attributed to circulatory disorders and expressed by arterial and venous thromboembolic events, transitory ischemic attacks, microcirculatory obstruction leading to cerebral and pulmonary thrombosis and chronic leg ulceration [3]. Severely affected β -thalassemic and sickle cell anemic patients usually undergo aggressive treatments [4,5]. As a consequence, this compromises pathophysiological studies of disease progression because treatments can be seen as confounding factors. This justifies the need for an animal model, which also allows the development of new treatment approaches.

Mice have been widely used as models of human pathological disorders because of their sufficient biological similarity and the possibility of modifying their genotype.

Furthermore, considering their size, mice are easy to manipulate and inexpensive to maintain. Nevertheless, the study of their physiology and phenotype requires the development and validation of new imaging techniques with high resolution.

Ultrasound imaging is a well-established diagnostic tool for human and large animals. Clinical ultrasound systems have limited use in mouse research because of their poor spatial resolution. High-frequency and thus high-resolution imaging systems have recently become commercially available (Visualsonics, Toronto, Canada). The ultrasound biomicroscope (UBM) non-invasive system was used for different applications such as embryonic development, cardiac, tumoral, ocular and dermal imaging [6,7]. The system allows *in vivo* study of physiological processes in mice. However, the main limitation in the use of high frequencies is that signal attenuation increases with frequency, which limits the depth of penetration to a few millimeters.

Transgenic mouse models displaying the β -thalassemic and sickle cell anemic phenotype have been developed [8,9]. It is hypothesized that, in these models, transient microcirculatory obstruction increases peripheral vascular resistance to blood flow and this obstruction can be detected by Doppler ultrasound. In human, regional flow resistance can be assessed by means of Doppler sonography, measuring the speed of flow and calculating the Pourcelot resistive index (RI) [10]. In mice, no attempt was made in the literature to measure the RI. The main limitation in small animal Doppler imaging is the accurate localization of blood vessels. The UBM B-mode guided Doppler acquisition facilitates the localizing of small anatomical structures and thus provides the possibility of performing Doppler ultrasound recordings in small vessels. In this study, the UBM was used to study blood flow disorders in transgenic mice.

2. MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Clinical Research Institute of Montreal (IRCM) animal care committee, and animal handling and care procedures were conducted according to the guidelines of the Canadian Council on animal care. Two groups of transgenic mice: 16 $Hbb^{d-thal/d-thal}$ β -thalassemic mice and 9 α -/- SAD sickle cell anemic mice, and one control group of 9 C57BL6 mice were studied.

Anesthesia Protocol: Mice were weighted and then anesthetized with an intraperitoneal injection of 0.0165 mL/g

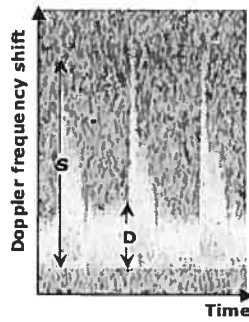


Fig. 1. Measurement of the systolic (S) and end diastolic (D) Doppler frequency shift.

2,2,2-tribromo-ethanol (Avertin 2.5%). Animals were placed on a warming pad under a heating lamp to maintain normothermia, and body hair of the anterior neck region and the lumbar region was removed using a commercial depilatory cream (Nair).

Echographic Assessment: Echographic images and Doppler waveforms were obtained with the use of a VS40 Ultrasound Biomicroscope (UBM, Visualsonics) equipped with a 40 MHz transducer. The UBM operating frequencies range between 19 and 55 MHz providing high-resolution B-mode images, and image guided high-frequency pulsed Doppler for flow detection. The spatial resolution of this system is 50-100 μm . Ultrasound gel was placed on the regions of interest to provide a coupling medium for the transducer. B-mode echography was used to localize blood vessels and place the Doppler sample volume precisely into the carotid artery or the abdominal aorta. Doppler flow waveforms were recorded for 2 seconds for both vessels. Manual measurements using MATLAB software were made of the peak systolic Doppler frequency shift (S) and of the end diastolic Doppler frequency shift (D) (Fig. 1). The Pourcelot resistive index was calculated using the following formula [10]:

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

Resistive indices were averaged over 10 cardiac cycles.

Statistical Analysis: Unless otherwise specified, data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of n observations, where n represents the number of mice per group. Comparisons of the two transgenic groups and with the control group were made by Student's unpaired t-tests. Results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. RESULTS

Average body weights for control, sickle cell anemic and β -thalassemic mouse groups were respectively $28.7 \pm 2.1\text{g}$, $28.6 \pm 4.4\text{g}$ and $28.0 \pm 2.1\text{g}$ (mean \pm standard deviation). The carotid artery and abdominal aorta were easily located with B-mode imaging. Fig. 2(a) shows a typical transverse image of the neck region before the bifurcation of carotid arteries. Common carotid artery diameters were approximately 200-400 μm . Internal or external carotid arteries were difficult to localize because of their small diameters and the Doppler signal was not assessed for these vessels. Fig. 2(b) shows a representative transverse image of the lumbar region displaying the abdominal aorta.

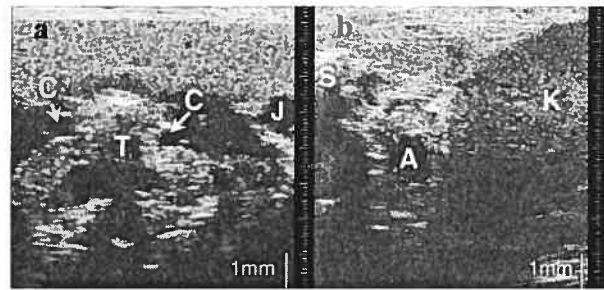


Fig. 2. *In vivo* UBM images in adult mouse: (a) cross-section of the neck region showing the common carotid arteries (C), the jugular vein (J) and the trachea (T); (b) transverse section of the lumbar region showing the abdominal aorta (A), the kidney (K) and the spine (S).

Doppler waveforms were recorded in the common carotid artery and abdominal aorta (Fig. 3). Doppler recordings in the carotid artery were assessed before the carotid bifurcation, and in the abdominal aorta measurements were done before the renal bifurcation using the kidney as a reference point. Kidney, liver and spleen were studied by B-mode imaging but no difference in image texture was observed.

Results are summarized in Fig. 4. Resistive indices in carotid arteries were 0.826 ± 0.009 , 0.879 ± 0.008 and 0.913 ± 0.009 for control, β -thalassemic and sickle cell anemic mice, respectively. In abdominal aortas, resistive indices in control, β -thalassemic and sickle cell anemic mice were 0.804 ± 0.014 , 0.855 ± 0.013 and 0.888 ± 0.011 , respectively.

Resistive indices for both transgenic mouse models were significantly higher compared to control mice for both blood vessels.

4. DISCUSSION

The purpose of this study was to demonstrate the possibility of evaluating non-invasively disturbance to blood flow in mice. Sick cell anemic and β -thalassemic mice exhibited significantly higher resistive indices compared to control mice.

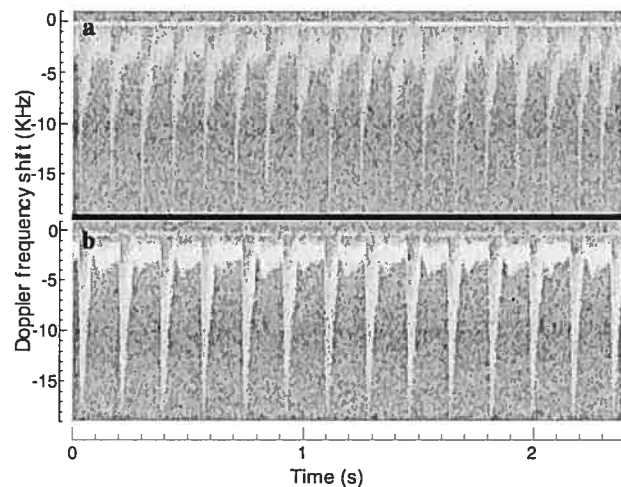


Fig. 3. UBM image guided pulsed Doppler waveforms in an adult mouse: (a) flow through the common carotid artery; (b) flow through the abdominal aorta.

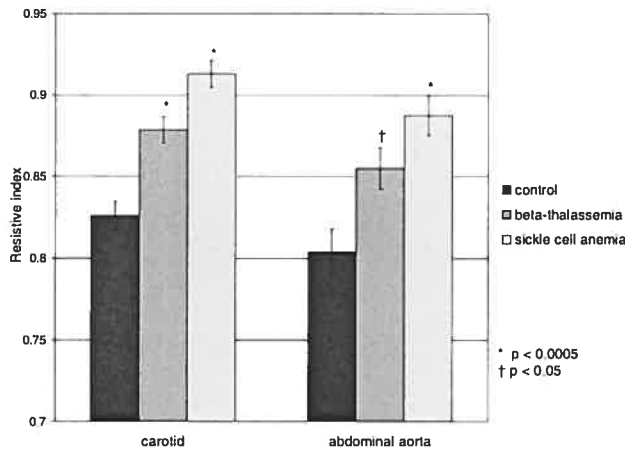


Fig. 4. Bar graph of the average resistive indices in the carotid artery and abdominal aorta of control, beta-thalassemic and sickle cell anemic mice.

Several mechanisms might explain an increase in vascular resistance in those mice, including enhanced erythrocyte aggregation, increased adhesion of red blood cells to the endothelium, activation and adhesion of leukocytes to the endothelium and chronic platelet activation and aggregation [1,3]. Sickle cell anemic and β -thalassemic erythrocytes present altered cellular membrane properties leading to enhanced rigidity and interfering with their capacity to deform in capillaries with diameter inferior to their own [2]. Furthermore, sickle cell anemic red blood cells often get trapped in

microcirculation because of their elongated shape, called sickled [8]. The understanding of the contribution of these factors to peripheral vascular resistance awaits further consideration.

In this study, the resistive index was considered to reflect peripheral vascular resistance. However, the RI should not be directly interpreted as the true peripheral resistance. Clinically, the resistive index is used to assess regional flow disorders in small vessels (renal, ocular, hepatic). Referring to the literature, systemic vascular resistance depends on the cardiac output (CO) and on the systemic vascular pressure. Systemic vascular resistance (SVR) [11] is defined as:

$$SVR = (MAP - CVP)/CO,$$

where MAP represents the mean arterial pressure and CVP the central venous pressure (considered generally negligible). Unfortunately, since it is difficult to determine the cardiac output in mice non-invasively and even invasively, SVR measurement remains complex. The RI, although it has inherent limitations, is an interesting alternative.

The RI depends on several factors, including vascular pressure, vascular compliance and the site of measurement [10,12]. Reference points were used to locate the same site of measurement in each mouse, but very small mislocations may induce high errors in RIs especially in the abdominal aorta, which contains numerous bifurcations (celiac, renal, mesenteric). Furthermore, one of the major functions of the vascular endothelium consists in regulating vascular tonus by secreting vasodilators and vasoconstrictors, which act upon vascular smooth muscle cells. Endothelial dysfunction may then affect peripheral resistance to flow and RI values. Although, these factors may intervene in the interpretation of RI, it is believed that the increases of RI observed in Fig. 4 are due to microcirculatory disorders.

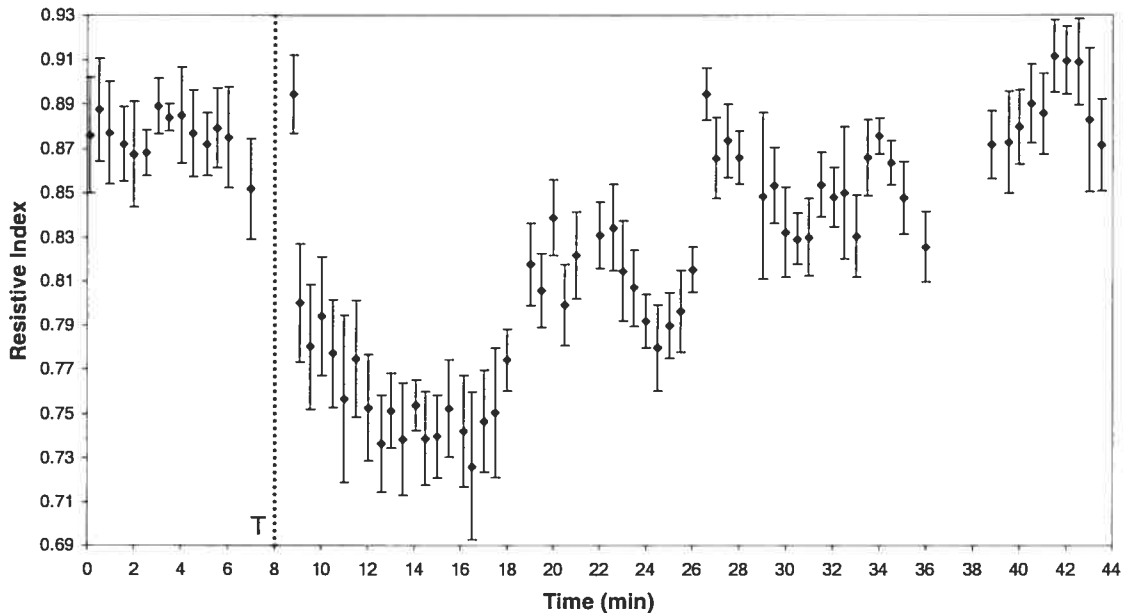


Fig. 5. Variation of the resistive index following an intravenous injection of acetylcholine at time T in control mouse as a function of time. Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

5. CONCLUSION

To complete this study, the vascular endothelial function in sickle cell anemic and β -thalassemic mice will be evaluated by assessing *in vivo* hemodynamic responses to an endothelium-dependant vasodilator, acetylcholine. Preliminary results allowed us to trace curves of the variation in resistive index as a function of time following an intravenous injection of acetylcholine in control mice (Fig. 5).

Cardiac function in pathological mice will also be evaluated by measuring non-invasively cardiac output by Doppler imaging using the UBM system. Systolic and diastolic pressures will be monitored with the XBP 1000 (Kent Scientific) tail-cuff system. This will allow the measurement of systemic vascular resistance, which will be compared to the resistive index.

In summary, the UBM imaging system represents a valuable potential tool for monitoring hemodynamic perturbations in small animals. Yet, confounding factors affecting hemodynamic processes must be taken into account to establish RI as a valuable index of red blood cell microrheological disorders in the mouse models considered here.

6. REFERENCES

- [1] T. Hovav, A. Golgarb, G. Artmann, S. Yedgar, G. Barshtein, "Enhanced adherence of β -thalassemic erythrocytes to endothelial cells," *British Journal of Haematology*, 1, pp. 178-181, 1999.
- [2] C. Paszty, "Transgenic and gene knock-out mouse models of sickle cell anemia and the thalassemias," *Current opinion in Hematology*, 4, pp. 88-93, 1997.
- [3] P.C. Borgna, V. Carnelli, V. Caruso, F. Dore, D. De Mattia, A. Di Palma, F. Di Gregorio, M.A. Romeo, R. Longhi, A. Mangiagli, C. Melevendi, G. Pizzarelli, S. Musumeci, "Thromboembolic events in beta thalassemia major: an Italian multicenter study," *Acta Haematologica*, 99(2), pp.76-79, 1998.
- [4] D. Rund, E. Rachmilewitz, "New trends in the treatment of β -thalassemia," *Critical Reviews in Oncology-Hematology*, 33, pp.105-118, 1999.
- [5] M.H. Steinberg and C. Brugnara, "Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease," *Annual Reviews in Medicine*, 54, pp. 89-112, 2003.
- [6] F.S. Foster, C.J. Pavlin, K.A. Harasiewicz, D. A. Christopher and D.H. Turnbull, "Advances in ultrasound biomicroscopy," *Ultrasound in Medicine and Biology*, 26(1), pp. 1-27, 2000.
- [7] F.S. Foster, M.Y. Zhang, Y.Q. Zhou, G. Liu, J. Mehi, E. Cherin, K.A. Harasiewicz, B.G. Starkoski, L. Zan, D.A. Knapik and S.L. Adamson, "A new ultrasound instrument for *in vivo* microimaging of mice," *Ultrasound in Medicine and Biology*, 28(9), pp. 1165-72, 2002.
- [8] M. Trudel, N. Saadane, M.C. Garel, J. Bardakdjian-Michau, Y. Blouquit, J.L. Guerquin-Kern, P. Rouyer-Fessard, D. Vidaud, A. Pachnis, P.H. Romeo, Y. Beuzard and F. Costantini, "Towards a transgenic mouse model of sickle cell disease: hemoglobin SAD," *EMBO Journal*, 10(11), pp. 3157-65, 1991.
- [9] L.C. Skow, B.A. Burkhart, F.M. Johnson, R.A. Popp, S.Z. Goldberg, W.F. Anderson, L.B. Barnett and S.E. Lewis, "A mouse model for β -thalassemia," *Cell*, 34(3), pp. 1043-52, 1983.
- [10] R.O. Bude, J.M. Rubin, "Relationship between the resistive index and vascular compliance and resistance," *Radiology*, 211(2), pp. 411-17, 1999.
- [11] F.L. Belloni, "Teaching the principles of hemodynamics," *American Journal of Physiology*, 277, pp. S187-202, 1999.
- [12] R.O. Bude, J.M. Rubin, "Effect of downstream cross-sectional area of an arterial bed on the resistive index and the early systolic acceleration," *Radiology*, 212(3), pp. 732-38, 1999.