



HAL
open science

Développement d'une méthode d'évaluation de l'âge relatif des globules rouges par la mesure de l'hémoglobine glyquée intracellulaire en cytométrie en flux : application en drépanocytose

Nassima Djouder

► **To cite this version:**

Nassima Djouder. Développement d'une méthode d'évaluation de l'âge relatif des globules rouges par la mesure de l'hémoglobine glyquée intracellulaire en cytométrie en flux : application en drépanocytose. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2023. Français. NNT : 2023PESC2015 . tel-04457234

HAL Id: tel-04457234

<https://theses.hal.science/tel-04457234>

Submitted on 14 Feb 2024

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

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



Sciences de la Vie
et de la Santé

UNIVERSITÉ PARIS-EST

Ecole doctorale : SVS – Sciences de la Vie et de la santé

Laboratoire : Transfusion et Maladies du Globule Rouge

(INSERM U955 – IMRB – EFS)

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Développement d'une méthode d'évaluation de l'âge relatif des globules rouges par la mesure de l'hémoglobine glyquée intracellulaire en cytométrie en flux. Application en drépanocytose

Nassima DJOUDER

Dirigée par le **Pr Pablo Bartolucci**

Co-encadrée par le Dr Nicolas Hebert

Soutenue le 4 avril 2023

Devant le jury composé de

Pr. Patricia Aguilar Martinez

Rapporteur

Pr. Carlo Brugnara

Examineur

Pr. Loïc Garçon

Examineur

Dr. Philippe Joly

Rapporteur

Président de jury

Dr. Stéphane Moutereau

Membre invité

À mes parents qui m'ont
donné le goût du travail et de la persévérance,
appris la droiture,
et insufflé l'esprit de la résistance,

À mes sœurs et à mon beau-frère qui m'ont
soutenu indéfectiblement,

À la mémoire de mon cher père,
l'homme qui m'a accompagnée pour devenir
la personne que je suis aujourd'hui.

Remerciements

Je tiens à remercier,

L'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de bien accepter d'étudier avec attention mon travail,

Le Pr. France Pirenne de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire,

Le Pr. Pablo Bartolucci de m'avoir accueillie dans son groupe de recherche et de m'avoir accordée l'opportunité de réaliser une thèse de doctorat scientifique,

Le Dr. Nicolas Hebert de m'avoir encadrée pour que je puisse mener à bien mon projet de recherche,

Le Dr. Stéphane Moutereau, que je considère comme mon deuxième co-encadrant, de m'avoir encadrée et accompagnée dans mes différentes expériences et ma recherche bibliographique,

L'équipe ADDmedica de m'avoir fait confiance, d'avoir accepté de financer ma thèse de science et de m'avoir suivie et accompagnée notamment par Corinne et Carlousse,

L'association pour le développement de la recherche pour l'aide financière qu'elle m'a accordée durant les derniers mois de ma thèse,

L'école doctorale SVS, notamment, le Pr. Fanen et Madame David, de m'avoir suivie, accompagnée et facilité les démarches administratives,

L'équipe de l'UMGGR de leur collaboration et aide,

Les patients drépanocytaires qui ont accepté de participer à mon projet de recherche,

Josette et José de m'avoir facilité l'accès au laboratoire notamment le soir et le week-end,

Mes collègues : Corinne, Véronique et Philippe. Je les remercie pour l'aide et l'amitié, les conseils, l'encouragement et le soutien qu'ils m'ont apportés durant ces 3 ans de thèse,

Mes collègues : Laura, Laurent, Elisa, Imane. Je les remercie de m'avoir formée et assistée pour réussir mes différentes expériences lors de mes premiers jours au laboratoire. Je les remercie pour leurs conseils et orientations.

Également Benoit et Marie pour leur aide en tout ce qui est informatique et bonnes pratiques de laboratoire respectivement.

Toutes les belles personnes que j'ai eu l'honneur de rencontrer et de connaître : Emmanuel, Steeve, Christian, Déborah, Nathalie, Saskia, Lamisse, Sandra, Roxane, Gabriela, Aline, Jessika, Rémi, Elliott, Mehdi et Léonie.

Toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin et qui ont participé directement ou indirectement à ce travail de recherche

En fin, Un grand et chaleureux merci à :

Ma famille et mes amis qui ont su me soutenir, m'encourager et pardonner mon absence durant ces 3 ans de travail acharné !

Table des matières

TABLE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEUX	11
Chapitre I : Cycle de vie du globule rouge : de l'érythropoïèse à la clairance.....	1
1. GLOBULE ROUGE ET SES PRINCIPAUX CONSTITUANTS	2
1.1. HEMOGLOBINE : STRUCTURE, BIOSYNTHESE ET FONCTIONS	3
1.2. MEMBRANE PLASMIQUE ET CYTOSQUELETTE	10
1.3. METABOLISME ET SYSTEME OXYDOREDUCTION	14
2. ERYTHROPOÏÈSE OU PRODUCTION DU GLOBULE ROUGE DANS LA MOELLE OSSEUSE.....	17
2.1. ERYTHROPOÏÈSE A L'EQUILIBRE.....	17
2.2. REGULATION DE L'ERYTHROPOÏÈSE PAR L'ERYTHROPOÏÉTINE.....	20
2.3. TROUBLES DE L'ERYTHROPOÏÈSE	21
3. SÉNESCENCE DU GLOBULE ROUGE ET MODIFICATIONS AGE-DEPENDANTES DE SES PROPRIETES.	21
4. CLAIRANCE OU ELIMINATION DU GLOBULE ROUGE DE LA CIRCULATION SANGUINE	25
4.1. MECANISMES DE CLAIRANCE PAR ERYTHROPHAGOCYTOSE.....	25
4.2. MECANISME DE CLAIRANCE PAR HEMOLYSE	27
4.3. AUTRES MECANISMES DE CLAIRANCE	27
Chapitre II : Méthodes de mesure de la durée de vie des globules rouges et de séparation de globules rouges sénescents	29
5. METHODES DE MESURE DE LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES	30
5.1. METHODES DE MARQUAGE DE POPULATION DE GR	29
5.2. METHODES DE MARQUAGE DE COHORTE DE GR	39
6. VARIABILITE INTER-INDIVIDUELLE DE LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES	47
7. METHODES DE SEPARATION DES GLOBULES ROUGES EN FONCTION DE LEUR AGE IN VITRO ET CHEZ L'ANIMAL	50
7.1. METHODES D'ISOLATION DES SOUS POPULATIONS DE GR D'AGE PROGRESSIF APPLIQUEES IN VITRO.....	50
7.2. ISOLATION IN VIVO DES GR SENESCENTS CHEZ L'ANIMAL	52
8. UTILISATION DE L'HEMOGLOBINE GLYQUEE COMME INDICATEUR D'AGE DES GLOBULES ROUGES	53
Chapitre III : Glycation et hémoglobine A1C (HbA1c)	57
9. TERMES CARACTERISANT LA GLYCATION.....	57
10. BASES BIOCHIMIQUES DE LA GLYCATION.....	58
11. GLYCATION DE L'HEMOGLOBINE.....	59
11.1. ANALYSE STRUCTURALE DE L'HbA _{1c} ET DES ESPECES GLYQUEES.....	60
11.2. FORMATION DE L'HbA _{1c} ET DES ESPECES GLYQUEES.....	64
11.3. PROPRIETES FONCTIONNELLES DES ESPECES GLYQUEES.....	65
12. GLYCATION DES AUTRES HEMOGLOBINES	65
13. DEGLYCATION DE L'HEMOGLOBINE GLYQUEE (A_{1c}).....	67
13.1. FRUCTOSAMINE-3-KINASE	67
13.2. MECANISME DE DEGLYCATION PAR LA FN3K	67
14. METHODES D'ANALYSE DE L'HbA_{1c}.....	70
14.1. METHODES BASEES SUR LA MODIFICATION DE LA CHARGE.....	70
14.2. METHODES BASEES SUR LA MODIFICATION DE LA STRUCTURE.....	73
15. INTERFERENCES DANS L'ANALYSE ET L'INTERPRETATION DE L'HbA_{1c}	81
15.1. FACTEURS INFLUENÇANT LA MESURE DE L'HbA _{1c}	81
15.2. FACTEURS PHYSIOLOGIQUES INFLUENÇANT L'INTERPRETATION DE L'HbA _{1c}	87
16. STANDARDISATION DE LA MESURE DE L'HbA_{1c}	93
17. HbA_{1c} COMME MARQUEUR D'EQUILIBRE GLYCEMIQUE	94

Chapitre IV : Durée de vie réduite des globules rouges drépanocytaires et rôle de l'hémoglobine foetale dans l'allongement de leur durée de vie	97
18. DREPANOCYTOSE	97
18.1. EPIDEMIOLOGIE, DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE ET COUT DES SOINS	97
18.2. RAPPELS SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE.....	98
19. DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES	105
20. VARIABILITE CLINIQUE DE LA DREPANOCYTOSE.....	111
21. MODULATION GENETIQUE DE LA SEVERITE DE LA DREPANOCYTOSE PAR L'HEMOGLOBINE FCETALE.....	113
21.1. CONCENTRATION ET DISTRIBUTION GLOBULAIRES DE L'HEMOGLOBINE FCETALE.....	119
21.2. EFFET DE L'HEMOGLOBINE FCETALE SUR LA POLYMERISATION	124
21.3. EFFET DE L'HEMOGLOBINE FCETALE SUR L'HEMOLYSE	127
21.4. EFFET DE L'HEMOGLOBINE FCETALE SUR LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES.....	130
22. HYDROXYUREE ET SON INDUCTION DE L'HEMOGLOBINE FCETALE.....	131
23. AUTRES STRATEGIES THERAPEUTIQUES IMPLIQUEES DANS L'INDUCTION DE L'HEMOGLOBINE FCETALE.....	139
Problématique et objectifs	142
Chapitre V. Matériel et Méthodes	144
24. GROUPES DE PARTICIPANTS A LA RECHERCHE : CRITERES D'INCLUSION ET D'EXCLUSION	144
25. PRELEVEMENTS SANGUINS	144
26. COURBES DE DENSITE SUR GRADIENT DE PHTALATES	144
27. FRACTIONNEMENT DES GLOBULES ROUGES EN FONCTION DE LA DENSITE	145
28. PARAMETRES ERYTHROCYTAIRES	146
29. MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.....	147
30. MESURE DU CONTENU EN HEMOGLOBINE A1C ET EN HEMOGLOBINE F.....	148
31. MESURE DE LA DEFORMABILITE DES GLOBULES ROUGE EN EKTACYTOMETRIE A GRADIENT OSMOLAIRE.....	149
32. ANALYSES STATISTIQUES	150
Chapitre VI. Résultats	153
33. VALIDATION DE L'ESTIMATION DE L'AGE RELATIF DES GR AVEC LA MESURE DE L'HbA1C PAR CYTOMETRIE DE FLUX CHEZ LES DONNEURS SAINS.....	153
33.1. VALIDATION AVEC DE L'HbA1C FORMEE <i>IN VITRO</i>	153
33.2. VALIDATION AVEC DE L'HbA1C FORMEE <i>IN VIVO</i>	153
33.2.1. Dans les réticulocytes (cellules CD71+) et les GR matures.	153
33.2.2. Dans des fractions de GR d'âge différent isolées par fractionnement en fonction de la densité.	155
34. PREUVE DE CONCEPT : VALIDATION DE LA ROBUSTESSE DE L'ESTIMATION DE L'AGE RELATIF DES GR PAR LA MESURE DE L'HEMOGLOBINE GLYQUEE EN CYTOMETRIE DE FLUX CHEZ LES PATIENTS SS TRANSFUSES.....	162
35. APPLICATION DE LA METHODE DE MESURE DE L'AGE RELATIF DES GR PAR L'ANALYSE DE LA GLYCATION EN CYTOMETRIE DE FLUX CHEZ LES PATIENTS SS NON TRANSFUSES.....	164
35.1. COMPARAISON DE L'AGE RELATIF ENTRE LES GR-SS ET LES GR-AA.....	164
35.2. COMPARAISON DE L'AGE RELATIF ENTRE LES RETICS-SS ET LES RETICS-AA.	164
35.3. EFFET DU TRAITEMENT PAR L'HYDROXYUREE SUR L'AGE RELATIF DES GR-SS	165
35.4. NORMALISATION DE LA FLUORESCENCE DE L'HEMOGLOBINE GLYQUEE EN PRESENCE D'HbF	166
35.5. EFFET DU TAUX D'HbF SUR L'AGE RELATIF DES GR-SS	171
35.6. EFFET DE LA TENEUR EN HbF/GR SUR L'AGE RELATIF DES GR-SS	172
35.7. EVALUATION DE L'AGE RELATIF DES GR-SS NON DENSES ET DENSES	176
Chapitre VII : Discussion	182
36. ÉTAPE DE VALIDATION : L'HEMOGLOBINE GLYQUEE MESUREE PAR CYTOMETRIE EN FLUX EST UN MARQUEUR D'AGE RELATIF DES GLOBULES ROUGES.....	183

36.1. L'AUGMENTATION DE LA GLYCATION DE L'Hb DANS LES GLOBULES ROUGES EST LINEAIRE EN FONCTION DU TEMPS	183
36.2. L'AUGMENTATION DE L'Hb GLYQUEE EST CORRELEE A LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES	184
37. ETAPE DE VALIDATION DE LA ROBUSTESSE DE LA METHODE : L'HEMOGLOBINE GLYQUEE MESUREE PAR CYTOMETRIE EN FLUX EST CAPABLE D'EVALUER L'AGE RELATIF DE PLUS D'UNE POPULATION DE GR CHEZ LE MEME INDIVIDU.	187
38. ETAPE D'APPLICATION DE LA METHODE CHEZ LES PATIENTS SS	187
38.1. AGES RELATIFS REDUITS DES GR ET DES RETICULOCYTES DES PATIENTS SS.....	187
38.2. ALLONGEMENT DE L'AGE RELATIF DES GR-SS PAR LE TRAITEMENT A L'HYDROXYUREE.....	188
38.2.1. Augmentation du nombre de GR-SS contenant des teneurs élevées en HbF et diminution du pourcentage de GR pauvres en HbF par l'hydroxyurée.	188
38.2.2. Allongement de l'âge relatif des GR-SS par HU via l'augmentation du taux d'HbF et des mécanismes indépendants d'HbF.	189
38.3. ALLONGEMENT DE L'AGE RELATIF DE LA SOUS-POPULATION DE GR-SS RICHES EN HbF	190
38.4. ALLONGEMENT CROISSANT DE L'AGE RELATIF DES GR-SS PAR DES TENEURS CROISSANTES EN HbF.	191
39. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA METHODE D'EVALUATION D'AGE RELATIF PAR LA MESURE DE L'HbA1C EN CYTOMETRIE EN FLUX.	192
39.1. POINTS FORTS DE NOTRE METHODE D'EVALUATION D'AGE RELATIF DES GR.	192
39.2. POINTS FAIBLES DE NOTRE METHODE D'EVALUATION D'AGE RELATIF DES GR.....	193
 Conclusion	 194
 Bibliographie	 Err
eur ! Signet non défini.	

Table des figures

FIGURE 1. CYCLE DE VIE D'UN GLOBULE ROUGE (BOSMAN, 2013).	1
FIGURE 2. STRUCTURE ET BIOSYNTHESE DES DIFFERENTS TETRAMERES D'Hb (MANNING ET AL.2020).....	5
FIGURE 3. TRANSITION DE L'HEMOGLOBINE DE LA FORME « TENDUE » VERS LA FORME « RELACHEE » (THOMAS AND LUMB 2012).....	8
FIGURE 4. COURBES DE FIXATION DE L'OXYGENE DES DIFFERENTS TETRAMERES D'Hb HUMAINES EMBRYONNAIRES, FŒTALE ET ADULTES (INDIQUEES EN ROUGE) ET DES SOUS-UNITES INDIVIDUELLES ALPHA ET BETA (INDIQUEES EN BLEU) EN FONCTION DE LA PRESSION PARTIELLE EN DIOXYGENE (MANNING ET AL. 2020).....	9
FIGURE 5. LA MEMBRANE PLASMIQUE ET LE CYTOSQUELETTE DU GLOBULE ROUGE (AGARWAL AND PRCHAL, 2019 ; IOLASCON ET AL., 2019).	11
FIGURE 6. DISTRIBUTION DES PHOSPHOLIPIDES DANS LA MEMBRANE ERYTHROCYTAIRE (STEVENS-HERNANDEZ ET AL. 2022).	12
FIGURE 7. MODELE ORGANISATIONNEL DE LA BANDE 3 DES GR HUMAINS (PROTEINE ECHANGEUSE D'ANIONS) (LUX, 2016).	14
FIGURE 8. RESUME DE L'ENSEMBLE DU METABOLISME GLYCOLYTIQUE, DU SHUNT DE L'HEXOSE MONOPHOSPHATE, DU METABOLISME DU GLUTATHION ET DU METABOLISME DES NUCLEOTIDES DU GLOBULE ROUGE (GRACE AND GLADER, 2018).	16
FIGURE 9. APERÇU DE L'ERYTHROPOÏESE, DE LA CELLULE SOUCHE HEMATOPOÏËTIQUE (CSH) AU GLOBULE ROUGE (GR) (ZIVOT ET AL., 2018).	17
FIGURE 10. DESSIN SCHEMATIQUE D'UN ILOT ERYTHROBLASTIQUE (DZIERZAK AND PHILIPSEN, 2013).	18
FIGURE 11. MATURATION DES RETICULOCYTES EN GR MATURES DANS LA CIRCULATION (STEVENS-HERNANDEZ ET AL., 2022).	20
FIGURE 12. REGULATION DE L'ERYTHROPOÏESE PAR L'ERYTHROPOÏËTINE.....	21
FIGURE 13. IMPLICATION DE LA BANDE 3 ET DU CD47 DANS LA CLAIRANCE DES GR PAR PHAGOCYTOSE.....	26
FIGURE 14. DUREE DE VIE IN VIVO DES COHORTES DE GLOBULES ROUGES (CLARK, 1988).....	29
FIGURE 15. MARQUAGE D'UNE POPULATION DE GLOBULES ROUGES (BERLIN, 1964).....	31
FIGURE 16. METHODE D'AGGLUTINATION DIFFERENTIELLE MISE EN PLACE PAR WINIFRED ASHBY	32
FIGURE 17. DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES DETERMINEE PAR LA METHODE D'AGGLUTINATION DIFFERENTIELLE ET LA METHODE DU CHROME-51 DANS LE SANG FRAIS (A) ET LE SANG CONGELE DANS L'ACIDE-CITRATE DE DEXTROSE PENDANT 15 JOURS (B) (FRANKLIN ET AL., 1953).....	34
FIGURE 18. SCHEMA GLOBAL DU MARQUAGE AVEC LA BIOTINE ET DE LA RECUPERATION DES GLOBULES ROUGES MARQUES CHEZ LE LAPIN. (SUZUKI AND DALE, 1987).....	35
FIGURE 19. METHODE D'ANALYSE DES GLOBULES ROUGES MARQUES A LA BIOTINE.	37
FIGURE 20. COURBES REPRESENTATIVES DE LA DUREE DE VIE MESUREE PAR TROIS METHODES DIFFERENTES CHEZ UN SUJET SAIN (VOIR LES EQUATIONS DE REGRESSION DANS LA PETITE TABLE)(SELON MOCK ET AL., 1999).	38
FIGURE 21. MARQUAGE DES GLOBULES ROUGES A PLUSIEURS BIOTINES DE DIFFERENTES DENSITES.....	39
FIGURE 22. MARQUAGE D'UNE COHORTE DE GLOBULES ROUGES (BERLIN, 1964).....	41
FIGURE 23. CONCENTRATION DE L'AZOTE-15 DANS L'HEME APRES L'ADMINISTRATION DE LA GLYCINE MARQUEE AU 15N PENDANT 3 JOURS (SHEMIN AND RITTENBERG, 1946).....	43
FIGURE 24. DONNEES SUR LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES EN NUAGE DE POINT. (ZHANG ET AL., 2018)..	46
FIGURE 25. SYSTEME AUTOMATISE DU TEST RESPIRATOIRE AU CO MIS EN PLACE PAR L'EQUIPE DE LEVITT (YE ET AL., 2021).....	46
FIGURE 26. FORTE CORRELATION ENTRE LES VALEURS DE LA DUREE DE VIE MOYENNE DES GLOBULES ROUGES DETERMINEES PAR LA BIOTINE COMPAREE A LA METHODE DE L'ISOTOPE STABLE (KHERA ET AL., 2015).	49
FIGURE 27. REGRESSION LINEAIRE DE LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES MESUREE PAR LA TECHNIQUE DE MARQUAGE A LA 15N-GLYCINE ET LE TEST RESPIRATOIRE AU CO (R2=0.96) (YE ET AL., 2021).	49
FIGURE 28. PROCESSUS D'ELUTRIATION (DORIN, 1994) (DORIN, 1994).	51
FIGURE 29. SCHEMA ILLUSTRANT LE PROTOCOLE DE GENERATION DE POPULATIONS DE GLOBULES ROUGES DE SOURIS AGES IN VIVO PAR LA SUPPRESSION CONTINUE DE L'ERYTHROPOÏESE A TRAVERS LA TRANSFUSION EN SERIE (CLARCK, 1988).....	53
FIGURE 30. LIEN ENTRE LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES ET LEUR CONTENU EN Hb GLYQUEE.....	55

FIGURE 31. LES ETAPES DU PROCESSUS DE GLYCATION (LAPOLLA ET AL., 2005).	58
FIGURE 32. CHROMATOGRAMME DES ESPECES GLYQUEES (ALLEN ET AL., 1958).	59
FIGURE 33. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ESPECES GLYQUEES (KOVAL ET AL., 2011).	60
FIGURE 34. LES ETAPES DE LA FORMATION DE L'HbA1c (BUNN AND HIGGINS, 1981).	61
FIGURE 35. ANALYSE PAR REGRESSION LINEAIRE DE LA CORRELATION DES TAUX DE GLYCATION ENTRE LA CHAINE A GLOBINE ET LA CHAINE B GLOBINE (XU ET AL., 2019).	63
FIGURE 36. LA FORMATION DE L'HbA1c IN VIVO (BUNN ET AL., 1976).	64
FIGURE 37. LIAISON DU (A) GLUCOSE ET DU (B) GLUCOSE-6-PHOSPHATE (GLC-6-P) AUX HEMOGLOBINES A, F ET S A 37°C (ABRAHAM ET AL., 1980).	67
FIGURE 38. PROCESSUS DE DEGLYCATION INITIE PAR LA FRUCTOSAMINE 3-KINASE (SCHAFTINGEN ET AL., 2012)...	68
FIGURE 39. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'OXYHEMOGLOBINE HUMAINE MONTRANT LES RESIDUS GLYQUES ET LES RESIDUS PHOSPHORYLES PAR LA FN3K (DELPIERRE ET AL., 2004).	69
FIGURE 40. LA MESURE DE L'HbA1c PAR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE DE CATIONS (REA AND MOLINARO, 2014).	71
FIGURE 41. LA MESURE DE L'HbA1c PAR L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE (EC) (REA AND MOLINARO, 2014).	72
FIGURE 42. LE PRINCIPE DE LA FOCALISATION ISOELECTRIQUE (POITEVIN, 2008).	73
FIGURE 43. L'INTERACTION ENTRE L'ACIDE BORONIQUE ET L'Hb1c (YAZDANPANAH ET AL., 2015).	74
FIGURE 44. LA MESURE DE L'HbA1c PAR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE AU BORONATE (REA AND MOLINARO, 2014).	75
FIGURE 45. LA MESURE DE L'HbA1c PAR UNE TECHNIQUE IMMUNOCHIMIQUE DE TYPE IMMUNO-INHIBITION TURBIDIMETRIQUE (REA AND MOLINARO, 2014).	76
FIGURE 46. LA MESURE DE L'HbA1c PAR LA TECHNIQUE ENZYMATIQUE (REA AND MOLINARO, 2014).	78
FIGURE 47. LE PRINCIPE DE LA DIGESTION PROTEOLYTIQUE DES CHAINES D'Hb (JEPPSSON ET AL., 2002).	79
FIGURE 48. LA DETECTION SPECIFIQUE DES HEXAPEPTIDES DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE DE L'HbA1c ET HbA0 EN ESI-MS (JEPPSSON ET AL., 2002).	79
FIGURE 49. EXEMPLES DE CHROMATOGRAMMES OBTENUS LORS DE LA DETERMINATION DU POURCENTAGE D'HbA1c (BRY ET AL., 2001).	83
FIGURE 50. (A) UN CHROMATOGRAMME AVEC UN PIC ANORMAL DE LA FRACTION HbA1c LABILE. (B) UN CHROMATOGRAMME NORMAL (SINGH ET AL., 2017).	87
FIGURE 51. LES ETENDUES ET LES ECARTS DE PERCENTILE MOYEN DE GLYCEMIE A 2H ET DE DOSAGE D'HbA1c A LA VISITE DE SELECTION (SCREENING) ET AU RAPPEL (RECALL) (YUDKIN ET AL., 1990).	88
FIGURE 52. SOURCES DE VARIABILITE DE L'HbA1c EXPRIMEES EN POURCENTAGE SELON LE MEILLEUR MODELE D'AJUSTEMENT MULTIVARIEES (SNIEDER ET AL., 2001).	89
FIGURE 53. LE TAUX D'Hb A1c DANS SEPT CLASSES D'AGE. LES BARRES D'ERREURS REPRESENTENT L'IC95% DANS CHAQUE CLASSE (MA ET AL., 2016).	91
FIGURE 54. ORGANIGRAMME DE LA PROCEDURE DE MESURE DE L'HbA1c DE LA REFERENCE IFCC (JOHN, 2003).	94
FIGURE 55. NOMBRE DE NOUVEAU-NES ATTEINTS D'ANEMIE DREPANOCYTAIRE DANS CHAQUE PAYS EN 2015 (PIEL ET AL., 2017).	98
FIGURE 56. REVUE SCHEMATIQUE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE (CISNEROS AND THEIN, 2020).	99
FIGURE 57. ALTERATIONS GENETIQUES DANS LE GENE HBB CODANT LA CHAINE B-GLOBINE DE L'HbA (KATO ET AL., 2018).	100
FIGURE 58. PRINCIPAUX DETERMINANTS DE LA FORMATION DE POLYMERES D'HbS (HOBAN, ORKIN, AND BAUER 2016) (NOGUCHI AND SCHECHTER, 1981 ; POILLON ET AL., 1993).	102
FIGURE 59. DOMMAGES AUX GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES INDUITS PAR LA POLYMERISATION DE L'HbS (KATO ET AL., 2018).	104
FIGURE 60. DUREE DE VIE DES GR CHEZ LES PATIENTS SS MESUREE AVEC LE 51Cr EN FONCTION DE SON TAUX D'ELUTION (Ke) (MCCURDY, 1968).	107
FIGURE 61. DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES NORMAUX ET DREPANOCYTAIRES MESUREE PAR LE 51Cr OU LA BIOTINE (FRANCO ET AL., 1998).	109

FIGURE 62. ELIMINATION DES DREPANOCYTES MARQUES DE LA CIRCULATION DURANT LES PREMIERES 24H APRES LA REINFUSION (FRANCO ET AL., 1998).....	110
FIGURE 63. DISPARITION IN VIVO DES RETICULOCYTES DREPANOCYTAIRES MARQUES A LA BIOTINE (FRANCO ET AL., 1998).	111
FIGURE 64. COMPLICATIONS CLINIQUES COURANTES DE LA DREPANOCYTOSE (PIEL ET AL., 2017).	112
FIGURE 65. MODIFICATEURS GENETIQUES ET NON GENETIQUES DE LA SEVERITE CLINIQUE DE LA DREPANOCYTOSE (PIEL ET AL., 2017).	113
FIGURE 66. HEMOGLOBINE FCETALE EN DREPANOCYTOSE (LETTRE AND BAUER, 2016).....	114
FIGURE 67. SUIVI LONGITUDINAL DU TAUX D'HEMOGLOBINE FCETALE CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES (SOMMET ET AL., 2016).	115
FIGURE 68. ANALYSE DE LA COURBE DE SURVIE DE LA PREMIERE APPARITION DU SYNDROME THORACIQUE AIGU, LA DACTYLITE, LA SEQUESTRATION SPLENIQUE AIGUE ET DE LA CRISE DOULOUREUSE [CHEZ LES MALES (A) ET LES FEMELLES (B)] (BAILEY ET AL., 1992).	117
FIGURE 69. TAUX D'INCIDENCE AJUSTES SELON L'AGE ET L'HEMOGLOBINE FCETALE POUR LA MENINGITE-SEPTICEMIE, LA CRISE DREPANOCYTAIRE, LE SYNDROME THORACIQUE, LES HOSPITALISATIONS, LES ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX (CVA) ET LA NECROSE ASEPTIQUE (POWARS ET AL., 1984).	118
FIGURE 70. COURBES DE SURVIE DE KAPLAN-MEIER DES ENFANTS ET ADULTES ATTEINTS DE DREPANOCYTOSE HOMOZYGOTE INCLUS DANS L'ETUDE CSSCD.	119
FIGURE 71. DISTRIBUTION HYPOTHETIQUE DE L'HbF/CELLULE-F ET DU POURCENTAGE DE CELLULES F CHEZ 4 PATIENTS PRESENTANT DES TAUX D'HbF DE 5% (A), 10% (B), 20% (C) ET 30% (D). (STEINBERG ET AL., 2014).....	122
FIGURE 72. QUANTIFICATION DE L'HbF PAR GLOBULE ROUGE EVALUEE PAR CYTOMETRIE DE FLUX (HEBERT ET AL., 2020).	124
FIGURE 73. INHIBITION DE LA POLYMERISATION DE L'HbS PAR L'HEMOGLOBINE FCETALE (NOGUCHI ET AL., 1993 ; LETTRE AND BAUER, 2016 ; EATON AND BUNN, 2017).	125
FIGURE 74. RELATIONS ENTRE LA COMPOSANTE HEMOLYTIQUE ET LES MARQUEURS DONT ELLE EST ISSUE CHEZ LES PATIENTS SS (N=415). LE COEFFICIENT DE CORRELATION DE PEARSON EST FOURNI POUR CHAQUE RELATION. TOUS LES P<0,0001. (NOURAIE ET AL.,2013).	127
FIGURE 75. DISTRIBUTION DE LA COMPOSANTE HEMOLYTIQUE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS SS (N= 415) EN FONCTION DES VARIABLES CONNUES POUR INFLUENCER OU REFLECTER L'HEMOLYSE COMME (A) LE TRAITEMENT PAR L'HYDROXYUREE ET (B) LE POURCENTAGE D'HbF. (NOURAIE ET AL.,2013).	128
FIGURE 76. COMPARAISON DES NIVEAUX DE BIOMARQUEURS D'HEMOLYSE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN HbF (MOREIRA ET AL., 2015).....	129
FIGURE 77. ROLE DE L'HbF DANS LA RESISTANCE DES GR A LA LYSE. (A) POURCENTAGE ET (B) MFI DES GR-F+ (F+RBC) AVANT ET APRES UN STRESS MECANIQUE (ALEJANDRA ET AL., 2018).	130
FIGURE 78. POURCENTAGE DE SURVIE DES GLOBULES ROUGES DREPANOCYTAIRES MARQUES A LA BIOTINE EN FONCTION DE LEUR CONTENU EN HbF (FRANCO ET AL., 2006).	131
FIGURE 79. STRUCTURE DE L'HYDROXYUREE (PLATT, 2008).	132
FIGURE 80. REACTION ENZYMATIQUE CATALYSEE PAR LA RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE (A) ET EFFET INHIBITEUR DE L'HYDROXYUREE (B). (AYE ET AL., 2014).	134
FIGURE 81. CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA DREPANOCYTOSE HOMO-ZYGOTE ET L'EFFET DE L'HYDROXYUREE (PLATT, 2008).	136
FIGURE 82. SCHEMA DE COLLECTE DES DONNEES CLINIQUES (A) ET LES NIVEAUX D'HbF A TROIS POINTS DE TEMPS D'ECART PAR RAPPORT AU PBEST (PERSONAL BEST, FAIBLE OU ELEVE) (B). LA LIGNE NOIRE INDIQUE LA VALEUR MOYENNE A CHAQUE POINT DE TEMPS (GREEN ET AL., 2016).....	138
FIGURE 83. RESUME DE TOUTES LES APPROCHES PHARMACOLOGIQUES ETABLIES ET DES STRATEGIES THERAPEUTIQUES EXPERIMENTALES POUR L'INDUCTION DE L'HbF DANS LA DREPANOCYTOSE (BOU-FAKHREDIN ET AL. 2022)...	139
FIGURE 84. STRATEGIES DE THERAPIE GENIQUE POUR LA DREPANOCYTOSE : APERÇU SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES APPROCHES POUR CORRIGER LE PHENOTYPE DREPANOCYTAIRE PAR THERAPIE GENIQUE (HOBAN ET AL., 2016).	141
FIGURE 85. DETERMINATION DE LA DENSITE DES GLOBULES ROUGES EN PHTALATES. (KUEVIAKOE ET AL., 2005)....	145
FIGURE 86. EKTACYTOMETRE DE TYPE LORRCA (LORRCA® MAXSIS, PAYS-BAS).....	150

FIGURE 87. MESURE DE L'Hb GLYQUEE FORMEE IN VITRO ET IN VIVO PAR CYTOMETRIE EN FLUX DANS LES GR DE DONNEURS SAINS.	154
FIGURE 88. ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION DE DENSITE DES GR-AA ET LEUR FRACTIONNEMENT EN FONCTION DE LA DENSITE (AGE).....	156
FIGURE 89. VERIFICATION DE LA QUALITE DU FRACTIONNEMENT DES GR-AA SUR GRADIENT DE DENSITE.....	158
FIGURE 90. VERIFICATION DES RELATIONS DENSITE-AGE ET AGE-HbA1c DANS LES DIFFERENTES FRACTIONS DE GR-AA.	161
FIGURE 91. QUANTITE D'Hb GLYQUEE MESUREE PAR CYTOMETRIE DE FLUX DANS LES GR AUTOLOGUES ET TRANSFUSES DISCRIMINES PAR L'UTILISATION D'UN ANTICORPS ANTI-Bs DE DES PATIENTS SS TRANSFUSES NON DIABETIQUES.	163
FIGURE 92. APPLICATION DE LA METHODE DE MESURE DE L'AGE RELATIF DES GR PAR L'Hb GLYQUEE EN CYTOMETRIE DE FLUX CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES NON DIABETIQUES.	165
FIGURE 93. EFFET DE L'HU SUR L'AGE RELATIF DES GR PAR L'Hb GLYQUEE EN CYTOMETRIE DE FLUX CHEZ LES PATIENTS DREPANOCYTAIRES HOMOZYGOTES NON DIABETIQUES.....	166
FIGURE 94. MESURE DE L'Hb GLYQUEE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DANS DES GR D'UN PATIENT 100% HbF APRES FIXATION ET PERMEABILISATION.....	167
FIGURE 95. MESURE DE LA CHAINE ALPHA DE L'Hb PAR CYTOMETRIE EN FLUX DANS DES GR.....	168
FIGURE 96. EFFET DE L'AJOUT D'UN ANTI-HbF FLUORESCENT SUR LA MESURE DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE DE L'Hb GLYQUEE.	169
FIGURE 97. QUANTIFICATION DE L'HbF PAR GR CHEZ LES PATIENTS NON TRAITES OU TRAITES PAR HU.....	170
FIGURE 98. EFFET DU L'HbF SUR LA L'AGE RELATIF DES GR-SS MESURE PAR GLYCATION DE L'HEMOGLOBINE EN CYTOMETRIE DE FLUX.....	172
FIGURE 99. EFFET POSITIF DE L'HbF SUR LA QUANTITE D'Hb GLYQUEE MESUREE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DANS LES SOUS-POPULATIONS DE GR DE PATIENTS SS NON TRANSFUSES ET NON DIABETIQUES DISCRIMINEES EN FONCTION DE LA DISTRIBUTION DE L'HbF.....	174
FIGURE 100. EFFET POSITIF DE L'HbF SUR LA SURVIE RELATIVE DES GR DE PATIENTS.....	175
FIGURE 101. COMPARAISON DES NIVEAUX D'HbF ET D'Hb GLYQUEE CELLULES NON DENSES ET DENSES.....	177
FIGURE 102. ANALYSE DE L'HETEROGENEITE DE LA SOUS POPULATION DE GR DENSES.....	179

Liste des Tableaux

TABLEAU 1. FACTEURS AFFECTANT LA COURBE DE DISSOCIATION DE L'OXYGENE HUMAINE	9
TABLEAU 2. CHANGEMENTS DANS LES PROPRIETES DES RBC ASSOCIES AU VIEILLISSEMENT	24
TABLEAU 3. VALEURS DE LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES RAPPORTEES PAR LA LITTERATURE POUR DES SUJETS SAINS	47
TABLEAU 4. QUANTITE D'HbA1C CHEZ DES SUJETS NON DIABETIQUES	54
TABLEAU 5. COMPARAISON DES SITES DE GLYCATION DE L'HEMOGLOBINE HUMAINE IDENTIFIES DANS LES ETUDES DE SHAPIRO ET AL. (1980), ZHANG ET AL. (2001) ET DE DELPIERRE ET AL.....	62
TABLEAU 6. CARACTERISTIQUES DES METHODES D'ANALYSE DE L'HbA1C.....	80
TABLEAU 7. 32DFP ET 51Cr POUR LA MESURE DE LA DUREE DE VIE DES GLOBULES ROUGES DANS LES SYNDROMES D'HEMOGLOBINE ANORMALE	106
TABLEAU 8. EXPERIENCES DE MARQUAGE AVEC LE 51Cr ET LA BIOTINE EFFECTUEES SUR LES MEMES GLOBULES ROUGES (N1, N2) ET SUR DES GLOBULES ROUGES DIFFERENTS (N3, N4, S1, S2, S3) .	106
TABLEAU 9. DIAGNOSTIC, SYMPTOMES, FLUORESCENCE DE L'HbF ET DES CELLULES F	106
TABLEAU 10. POURCENTAGE ET RATIO DE CELLULES F PROTEGEES	106

Liste des abréviations

AGE : produits terminaux de glycation avancée

Akt : protéine kinase B

ANK1 : gène codant pour l'ankyrine

ARN : acide ribonucléique

ATP : adenosine triphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

β^A : chaîne β -globine de l'hémoglobine adulte

BasoE : érythroblaste basophile

BCL11A : B-cell lymphoma/leukemia 11A

BFU-E : unité de formation des éclats - érythroïde

2,3-BPG : 2,3-bisphosphoglycérate

β^S : chaîne β -globine de l'HbS

Ca²⁺ : ion calcium

CCMH : concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CD71 : récepteur à la transferrine

CD47 : protéine associée à l'intégrine

CE : électrophorèse capillaire

CEC-HPLC : chromatographie liquide à haute pression échangeuse de cations

CFU-E : unité de formation des colonies érythroïdes

Cl⁻ : ion chlorure

CIEF : focalisation isoélectrique ou isoélectrofocalisation

CO : monoxyde de carbone

CO₂ : dioxyde de carbone

⁵¹Cr : chrome 51 radioactif

CRISPR-Cas9 : clustered regulary interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated nuclease 9

C_{sat} : constance de solubilité

CSH : cellule souche hématopoïétique multipotente

CSSCD : cooperative study of sickle cell disease

CV : coefficient de variation

DCCT : *diabetes control and clinical trial*

DF³²P : di-isopropylfluorophosphate

3-DG : 3-deoxyglucosome

DMT : dose maximale tolérée

2,3-DPG : 2,3-disphosphoglycerate également appelé 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BPG)

EASD : association européenne pour l'étude du diabète

EFS : établissement français du sang

ELISA : immunoabsorption par enzyme liée

EMA : agence européenne des médicaments

EPO : érythropoïétine

EPOR : récepteur d'érythropoïétine

FACS : tri cellulaire activé par fluorescence

Fc : récepteur Fc

FDA : Food and drug administration

⁵⁹Fe : fer radioactif

FID : fédération internationale du Diabète

FL : femtolitre (1 fL = 10⁻¹⁵ L)

FL : fructoselysine

FL3P : fructose-3-phosphate

FN3K : enzyme de déglycation

FVO : fructosyl valine oxydase

GCK : gène codant pour glucokinase

GHb : hémoglobine glyquée totale

GLUT1 : transporteur de glucose

GMPC : guanosine monophosphate cyclique

G6PC2 : gène codant pour la glucose-6-phosphatase 2

G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase

GR : globule rouge

GR-AA : globule rouge d'un donneur sain

GR-F⁺ : globule rouge avec une hémoglobine fœtale détectable par cytométrie en flux

GR-F⁻ : globule rouge avec une hémoglobine fœtale non détectable par cytométrie en flux

GR-SS : globule rouge drépanocytaire homozygote

GSH : forme réduite glutathion

GWAS : études d'association génétique à grande échelle

H⁺ : ion hydrogène

Hb : hémoglobine

HbA : hémoglobine adulte

HbA₀ : hémoglobine adulte non modifiée

HbA₁ : hémoglobine glyquée

HbA_{1c} : fraction C de l'hémoglobine glyquée (HbA1)

HbA₂ : hémoglobine adulte 2

HbCarb : hémoglobine carbamylée

H₂CO₃ : acide carbonique

HbF : hémoglobine fœtale

HbF₀ : hémoglobine fœtale non modifiée

HbF₁ : fraction acétylée de l'hémoglobine fœtale

HbF_{1c} : fraction glyquée de l'hémoglobine fœtale

Hb - R : Hb de forme saturante en oxygène

HbS : hémoglobine « sickle » qui veut dire faucille

Hb - T : Hb de forme désoxygénée

HCO₃⁻ : bicarbonate

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HPLC : chromatographie liquide à haute pression

HK1 : gène codant pour l'hexokinase 1

HK : hexokinase

HU : Hydroxyurée

ICSH : comité international pour la standardisation en hématologie

IDA : anémie ferriprive

IE : indice d'élongation

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

Jak2 : Janus kinase 2

KCNN4 : canal Gardos

K_e : taux d'élution

K_M : constante d'affinité d'une enzyme pour son substrat

LCR : région de contrôle de locus

LDH : Lactate déshydrogénase

LORCA : *Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer*

MALDI-TOF MS : *matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight mass spectrometry*

MAPK : voie des *mitogen activated protein kinases*

MCF-R2: séquence conserve par multiples espèces

MCHbF : mean concentration of HbF

MDF : 1-déoxy-1-morpholino-fructose

MFI : intensité moyenne de fluorescence

MTNR1B : gène codant pour un récepteur de la mélatonine

m/z : rapport masse/charge

Na₂Cr⁵¹O₄ : chromate de sodium

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NGSP : *National Glycohemoglobin Standardization Program*

NHLBI : *National Heart, Lung, and Blood Institute*

NHS-biotine : N-hydroxysuccinimido-biotine

NMDA : acide N-méthyl D-aspartate

NO : oxyde nitrique

normGHb : intensité de la fluorescence de l'hémoglobine glyquée normalisée

O₂ : dioxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONU : Organisation des Nations-Unies

OrthoE : érythroblaste orthochromatique

P₅₀ : saturation en oxygène pour laquelle l'hémoglobine est saturée à 50%

PBS : phosphate buffered saline

PC : phosphatidylcholine

PD : pharmacodynamique

PE : phosphatidyléthanolamine

PGx : pharmacogénétique

pHi : point isoélectrique

PHHF : persistance héréditaire de l'hémoglobine foetale

Pi : phosphate inorganique

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

pg : picogramme

PK : pharmacocinétique

PK : pyruvate kinase

PKG : Protéine kinase

PMT : photomultiplicateur

PO₂ : pression partielle de l'oxygène

PolyE : érythroblastes polychromatophiles

Pré-HbA1c : base Schiff instable

ProE : proérythroblastes

PS : phosphatidylsérine

PVP : polyvinylpyrrolidone

QTL : *quantitative trait locus*

RCS : survie des globules rouges

RCV : volume des GR circulants

RE : réticuloendothélial

Rétics : réticulocytes

RMN : résonance magnétique nucléaire

RR : ribonucléotide réductase

SLC2A1 : transporteur de glucose

SLC4A1 : bande 3

SIRPα : protéine régulatrice du signal α

SNPs : *single nucleotide polymorphisms*

SO₂ : saturation en oxygène

SP : sphingomyéline

SPTA1 : gène codant pour la spectrine

STA : syndrome thoracique aigu

Stat5 : transducteur de signal et activateur de transcription 5

S/V : rapport surface/volume

TALENS : transcription activator-like effector nucleases

99Tc : technétium-99

TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

T_d : *delay time*

TFR1 : récepteur de la transferrine 1

Thal : thalassémie

TO : thiazole orange

TSP-1 : thrombospondine-1

Tyr-P : phosphorylation de la tyrosine

UKPDS : *United Kingdom Prospective Study of Diabetes*

VGM : volume globulaire moyen

ZFNs : zinc finger nucleases

Cycle de vie du globule rouge : De l'érythropoïèse à la clairance

Introduction

1. Le globule rouge et ses principaux constituants
 - 1.1. Hémoglobine : structure, fonction et biosynthèse
 - 1.2. Membrane cytoplasmique et cytosquelette
 - 1.3. Métabolisme et système d'oxydoréduction
2. Erythropoïèse ou production du globule rouge dans la moelle osseuse
 - 2.1. Erythropoïèse à l'état d'équilibre
 - 2.2. Régulation de l'érythropoïèse par l'érythropoïétine
 - 2.3. Troubles de l'érythropoïèse
3. 3. Sénescence du globule rouge et modifications âge-dépendantes de ses propriétés.
4. Clairance ou élimination du globule rouge de la circulation sanguine
 - 4.1. Mécanismes de clairance par érythrophagocytose
 - 4.2. Mécanisme de clairance par hémolyse
 - 4.3. Autres mécanismes de clairance

Chapitre I : Cycle de vie du globule rouge : de l'érythropoïèse à la clairance

Les globules rouges (GR) appelés également érythrocytes ou hématies sont produits par un mécanisme complexe finement régulé appelé érythropoïèse. In utero, l'érythropoïèse a lieu tout au début au niveau du sac vitellin (mésoderme), puis au niveau du foie. Au moment de la naissance, elle se situe déjà au niveau de la moelle osseuse (médullaire). La fabrication des GR dans la moelle osseuse commence avec des cellules souches pluripotentes hématopoïétiques qui à travers plusieurs cycles de division et de différenciation donnent naissance à des progéniteurs (BFU-E et CFU-E) puis à des précurseurs (érythroblastes) érythroïdes. L'érythroblaste, la première forme de précurseur érythrocytaire reconnaissable dans la moelle osseuse, augmente au fil des différentes étapes son contenu en hémoglobine et finit par former le réticulocyte une fois que le noyau est expulsé (Figure 1).

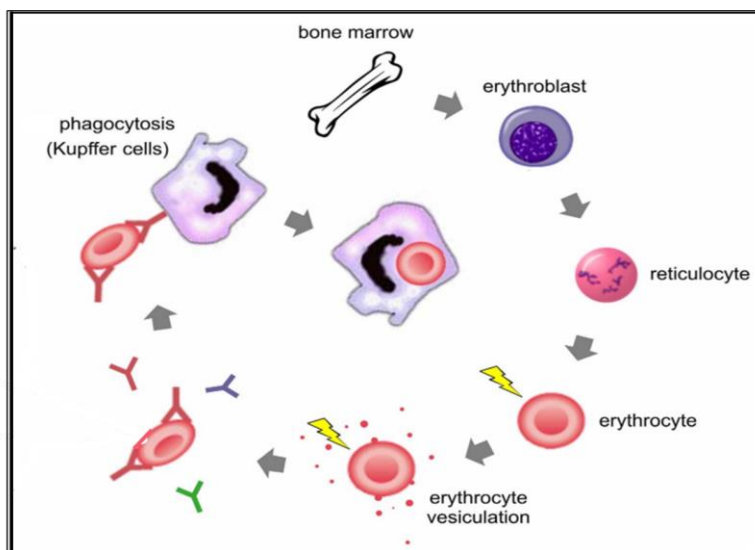


Figure 1. Cycle de vie d'un globule rouge (Bosman, 2013).

Après quelques jours (1-2 jours) dans la circulation sanguine et via un processus de maturation caractérisé par une perte d'organites intracellulaires et un important remodelage membranaire, le réticulocyte se transforme en un GR mature doté d'une forme biconcave unique qui lui offre une élasticité, flexibilité et une résistance aux contraintes de cisaillement dans la microcirculation ce qui lui permet d'assurer avec succès ses fonctions. La fonction principale d'un GR consiste à transporter l'oxygène (O_2) vers les tissus périphériques et de véhiculer le dioxyde de carbone (CO_2) vers les poumons. Au cours de sa mission, le GR est constamment confronté à des zones de stress. Ces zones incluent les poumons, les capillaires et les reins où le GR est exposé au stress oxydatif, mécanique et au choc osmotique respectivement. Anucléé, dépourvu de ses ribosomes, de ses mitochondries et de sa capacité de synthèse protéique *de novo*, le GR ne peut pas remplacer tous ses constituants moléculaires endommagés qui au fil du processus de vieillissement s'accumulent et marquent la phase de

fin de vie de la cellule, dite sénescence. Ces changements âge-dépendants irréversibles appelés aussi marqueurs de sénescence sont rapidement reconnus par les macrophages du système réticuloendothélial (RE) de la rate ou du foie qui procèdent à la clairance par érythrophagocytose des GR âgés après une durée de vie d'environ 120 jours chez le sujet sain. Environ 5 millions de GR sont éliminés de la circulation chaque seconde. Une clairance prématurée des GR est la caractéristique principale de certaines maladies associées à l'anémie telle que la drépanocytose. Dans ce type de pathologie, la sénescence est accélérée puisqu'un ou plusieurs marqueurs de sénescence apparaissent de manière précoce (Vittori and Nesse, 2012, Kaestner and Bogdanova, 2014, Repsold and Joubert 2018).

Ce chapitre a pour objectif de donner un aperçu sur les connaissances reflétant la compréhension actuelle des mécanismes d'érythropoïèse, de sénescence et de clairance des GR. Mais avant, quelques notions essentielles concernant le globule rouge et ses principaux constituants sont d'abord présentées.

1. Globule rouge et ses principaux constituants

Les GR sont les cellules les plus abondantes dans le corps humain puisque 83% des cellules de l'organisme sont des GR. Dans les conditions physiologiques normales, la concentration de GR est maintenue à une valeur relativement constante de 4 - 6 X 10⁶ par µl de sang total, grâce à l'équilibre production-destruction. Avec approximativement 5 litres de sang, l'organisme contient environ 25 X 10¹² GR circulants (Föller and Lang 2020). L'abondance des GR dans la circulation traduit le besoin de l'organisme en larges quantités d'hémoglobine, la protéine majeure du GR responsable du transport de l'O₂ des poumons aux organes, tissus et aux cellules qui l'utilisent pour la phosphorylation oxydative. La molécule en charge de la fixation de l'O₂ au niveau de l'hémoglobine est l'hème qui consiste en une protoporphyrine maintenant en son centre un atome de fer sous forme réduite (Fe²⁺). À peu près 66% d'atome de fer total de l'organisme (~2,275 g) est lié à l'hème. Etant peu soluble dans le plasma, l'hème libre serait catabolisé et excrété par le foie et les reins. Afin d'optimiser la capacité à véhiculer l'O₂, l'hème est conditionné dans un groupe de protéines tétramétriques hautement solubles appelées hémoglobines (Hb). D'énormes quantités d'Hb sont nécessaires pour assurer la distribution de l'O₂ et la survie de toutes les cellules du corps humain. À l'état libre, l'Hb ne peut persister plus de quelques minutes dans la circulation sanguine où elle se dissocie en dimères éliminés par les reins. L'énergie qu'il faudrait pour reconstituer littéralement des kilos d'Hb perdue chaque jour submergerait toutes les ressources de l'organisme. La nature a résolu ce problème en emballant l'Hb dans le GR (Benz et al., 2017). Un GR contient environ 250 à 270 millions de molécules d'Hb qui assurent le transport de jusqu'à un milliard de molécule d'O₂ (D'Alessandro et al. 2019). Dépourvu d'organites (noyau, mitochondries, ribosomes) et d'acides nucléiques (ADN et ARN), ayant un métabolisme rudimentaire limité à la dégradation

du glucose en anaérobiose, un système redox très modeste, et 90% de son poids sec représenté exclusivement par l'Hb, le GR mature a souvent été décrit comme « une poche ou un sac d'Hb » plutôt qu'une vraie cellule (D'Alessandro and Zolla 2017). Toutefois, le GR est considéré comme une cellule relativement complexe qui, au cours de sa vie, subit un stress notable qui résulte des considérations suivantes : i) un GR nécessite en moyenne 30 secondes pour effectuer un parcours complet de poumon à poumon, cela signifie ii) qu'au cours d'une durée de vie d'environ 120 jours, le GR subit 345 600 cycles. En outre, iii) en supposant que 20,9 mL d'oxygène sont transportés par 1 mL de GR et que la moitié de l'O₂ transporté est libéré dans les tissus à chaque cycle, un seul GR transporte donc un volume d'O₂ de plus de 3 000 000 fois son propre volume (Samaja et al., 1990), iv) Le GR circule dans un environnement caractérisé par une large variété de stimulations physiques et chimiques telles que la pression, les contraintes de cisaillement (shear stress), les hormones et les changements d'osmolarité et de pH ; et iv) doit assurer la survie des cellules, des tissus et des organes vitaux ainsi que les fonctions physiologiques de l'organisme humain (Benz et al., 2017; von Lindern et al. 2022). En hématologie, différents paramètres mesurés ou calculés sont utilisés pour caractériser les GR : i) leur quantité ou le nombre de cellules par litre de sang, ii) leur taille ou volume globulaire moyen (VGM, MCV en anglais) et iii) leur contenu en Hb ou teneur corpusculaire moyenne en Hb (TCMH, MCH en anglais) et concentration corpusculaire moyenne en Hb (CCMH, MCHC en anglais). Le VGM, la TCMH et la CCMH sont connus sous le nom d'indices érythrocytaires ou globulaires et jouent un rôle clé dans la classification morphologique des anémies. Le GR est caractérisé par une forme discoïde biconcave unique. Chaque discocyte a un diamètre d'environ 7 - 8 µm, une épaisseur maximale au bord de 2,0 - 2,5 µm et au centre de 1 µm, un rapport diamètre/épaisseur au bord de ~ 3,4 ; un volume désigné comme VGM de 83 à 98 femtolitres, une aire (surface) de 140 µm² et contient environ 30 – 35 pg d'Hb. La forme des GR circulants change en permanence dans les conditions normales (état statique et état dynamique) ou pathologiques facilitant le diagnostic (Corrons et al., 2021).

1.1. Hémoglobine : structure, biosynthèse et fonctions

L'hémoglobine est le composant majoritairement prédominant du globule rouge. D'ailleurs, si les GR peuvent répondre aux besoins de l'organisme en O₂, c'est uniquement parce qu'ils transportent suffisamment d'Hb pour soutenir le métabolisme oxydatif et donc la vie des cellules. Les GR ont également d'autres fonctions importantes telles que la contribution à la régulation du pH sanguin et la modulation du tonus vasculaire via la fixation et la libération du monoxyde d'azote (NO). Cependant, mêmes ces fonctions physiologiques « mineures » des GR sont médiées par l'Hb. Il est alors important de revoir d'abord la structure, la biosynthèse et la fonction de l'Hb.

Structure de l'hémoglobine. L'hémoglobine est une protéine tétramérique composée de 4 chaînes de globines polypeptidiques semblables deux à deux. Chaque globine est liée à une molécule d'hème constituée d'une partie organique, une protoporphyrine IX formée de 4 noyaux pyrroles unis par des ponts méthényles, et d'un atome de fer central à l'état ferreux. La protoporphyrine est synthétisée à partir de la condensation de la glycine avec du succinyl-coenzyme A. Huit molécules de chaque composé sont nécessaires pour former une tetrapyrrole linéaire qui se transforme en un noyau cyclique de protoporphyrine. Ce dernier tient en son centre un atome de Fe^{2+} . Le fer établit au total 6 liaisons avec la molécule d'hème. Quatre sont covalentes et impliquées avec les 4 atomes d'azote du noyau protoporphyrinique, une a lieu avec l'histidine « proximale » en position 87 de la chaîne alpha-like et la dernière est impliquée dans la fixation de l' O_2 (Bunn and Forget 1986). Il existe un autre résidu d'histidine dit histidine « distale » d'une importance majeure qui a pour fonction i) d'empêcher l'oxydation de l'atome de Fe^{2+} en Fe^{3+} par l'hème d'une autre sous-unité, ii) de prévenir une liaison irréversible du monoxyde de carbone (CO) avec l'atome de Fe^{2+} . Dans le tétramère de l'Hb, chaque sous-unité lie une chaîne de globine de nature différente à travers deux sortes d'interfaces (**Figure 2a**) : une interface dimère – monomère (chaîne alpha 1-like/chaîne beta 1-like) et une interface tétramère – dimère (chaîne alpha 1-like/chaîne beta 2-like).

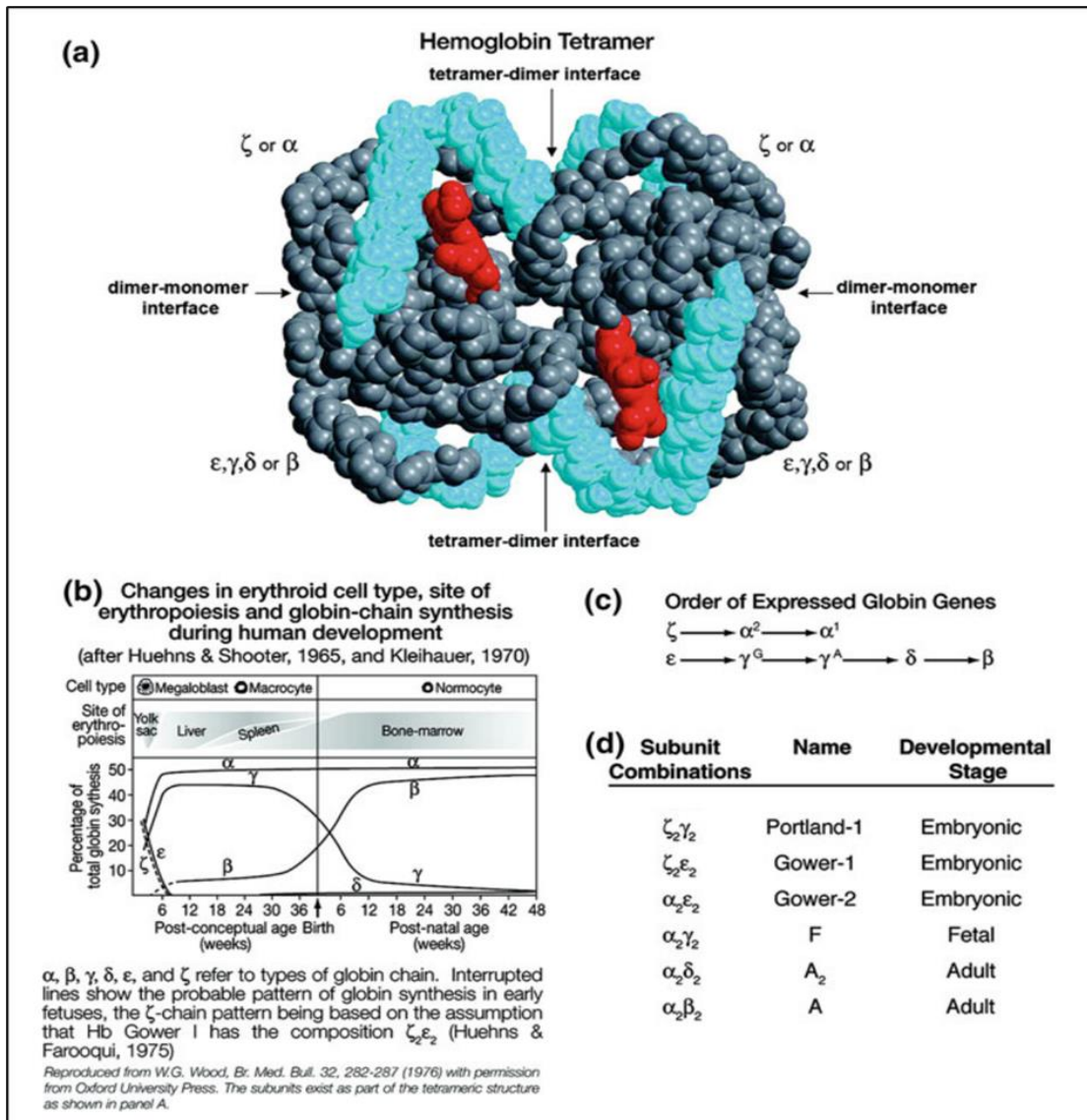


Figure 2. Structure et biosynthèse des différents tétramères d'Hb (Manning et al.2020).

(a) Le tétramère d'Hb avec les différentes sous-unités de globine indiquées en lettres grecques et les deux types d'interfaces désignés par des flèches. **(b)**. Le changement de l'expression des gènes codant les chaînes de globine en fonction de développement. **(c)** L'ordre d'expression des sous-unités de globine. **(d)** Les noms des six différents types d'Hb humains formés en fonction du stade de développement par combinaison des différentes sous-unités.

Cette dernière se caractérisant par une interaction moins forte par rapport à celle du premier type d'interface peut à l'équilibre se réarranger en deux conformations distinctes : conformation T (*Tense* ou *taut*, forme désoxygénée de faible affinité pour l'O₂) et conformation R (*Relaxed*, forme oxygénée de forte affinité pour l'O₂). Les monomères de globine sont instables et capables à l'état libre de précipiter et d'endommager le GR entraînant une anémie hémolytique (Ahmed et al., 2020).

Gènes de globine. Le tétramère de l'Hb est constitué de deux types de chaînes de globine : chaînes alpha-like (α -like ou α) et chaînes non α ou beta-like (β -like ou β) codées par deux clusters de gènes génétiquement éloignés puisque situés sur deux chromosomes différents. L'expression de ces gènes est tissu-spécifique et s'effectue dans l'ordre de leur position topographique au cours des étapes de la vie (**Figure 2c**) donnant ainsi lieu aux différents tétramères d'Hb. Les chaînes α comportent 141 résidus et dépendent des gènes situés sur le bras court du chromosome 16 codant pour le gène embryonnaire Dzêta, ζ (*HBZ*) et les gènes foetal/ adulte α (α_1 et α_2) (*HBA1* et *HbA2*). La chaîne ζ est l'homologue chez l'embryon de la chaîne α . Les chaînes de globine β correspondent à des chaînes polypeptidiques de 146 acides aminés dont la synthèse est sous le contrôle de gènes situés sur le bras court du chromosome 11. Les gènes β -globine comprennent cinq gènes fonctionnels : un gène embryonnaire epsilon, ϵ (*HBE*), deux gènes foetaux γ et δ (*HBG2* et *HBG1*) et les gènes adultes δ et β (*HBD* et *HBB*). L'expression des gènes α et des gènes β est régulée par des régions situées en amont des clusters de gènes comme la région MCR-R2 (*Multispecies Conserved Sequence*) connue aussi sous le nom de HS-40 et la région LCR (*Locus Control Region*) respectivement (Schechter, 2008; Thomas and Lumb 2012; Lee et al. 2021). D'autres niveaux de régulation plus complexes impliquant des processus transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels interviennent pour coordonner finement l'expression des gènes de la famille α et de la famille β . Le but d'un tel contrôle est de s'assurer qu'à n'importe quel stade de développement, la production des chaînes de globine α soit strictement égale à celle des chaînes de globine β (le rapport $\alpha/\text{non } \alpha=1$) et que l'assemblage de l'Hb soit correct (Grosso et al. 2012).

Différents types d'Hémoglobines. Au cours de l'ontogenèse, le besoin physiologique en O_2 change et par conséquent différentes Hb se succèdent et se chevauchent à la suite du phénomène de commutations ou « switch » d'Hb. Deux « switches » ont lieu chez l'être humain et permettent un changement progressif et séquentiel dans l'expression des gènes de globines : le premier switch concerne le passage des Hb embryonnaires à l'Hb foetale et le deuxième switch est celui de l'Hb foetale à l'Hb adulte. Dans le GR, plusieurs Hb existent toujours simultanément. Elles se distinguent par la nature des chaînes qui les constituent ainsi que leurs proportions relatives. Ces dernières évoluent parallèlement avec le changement du lieu de l'érythropoïèse : sac vitellin chez l'embryon, le foie et la moelle osseuse chez le foetus et la moelle osseuse chez l'adulte (**Figure 2b**). Durant les 4-5 premières semaines de la gestation, les GR de l'embryon contiennent 3 types d'Hb embryonnaires (**Figure 2d**) : Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) et Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Chez le foetus, à la 6^{ème} semaine de la vie intra-utérine, l'érythropoïèse se déroule désormais dans le foie et les Hb embryonnaires sont alors progressivement substituées par l'Hb foetale HbF ($\alpha_2\gamma_2$). À l'approche de la naissance, la moelle osseuse devient le site principal de l'érythropoïèse et la synthèse de l'HbF commence

à décliner au profit de l'Hb adulte HbA de structure $\alpha_2\beta_2$ (Grosso et al. 2012; Manning et al. 2020). Le phénotype adulte d'Hb est constitué de 97% d'HbA, 2-3% d'HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) qui est un constituant mineur dont la synthèse débute pendant la période néonatale et de moins de 1% d'HbF. L'HbF en trace est limitée à une sous-population restreinte de GR appelée les cellules F (ou cellules fœtales). (Thomas and Lumb 2012; Dunn and Grocott 2016). Cependant, des mutations peuvent se produire au niveau des gènes de globine et entraîner diverses modifications telles qu'une persistance héréditaire de l'HbF (PHHF), un défaut de synthèse (anomalie quantitative), partiel ou total, d'une ou plusieurs chaînes de globine (thalassémies) ou une synthèse de variant d'Hb de structure anormale (anomalie qualitative) (Grosso et al. 2012). L'exemple qui illustre le mieux ce dernier cas est l'HbS en drépanocytose, le produit d'une mutation ponctuelle au niveau du gène β globine, capable de polymériser et de réduire la durée de vie des GR du fait d'une anémie hémolytique. En outre, chez certains patients drépanocytaires, l'HbF continue à être synthétisée et peut atteindre jusqu'à 30% de l'Hb totale. Ces patients manifestent peu de crises vaso-occlusives. En plus des mutations, certaines Hb peuvent également subir au niveau de l'extrémité N-terminale de leurs chaînes β -like des modifications covalentes post-traductionnelles telles que la glycation non enzymatique de l'HbA (HbA_{1c}) (Schechter, 2008) et l'acétylation de l'HbF (HbF1) (Manning et al. 2020).

Fonctions de l'hémoglobine. L'hémoglobine est une molécule multifonctionnelle. Néanmoins, la mission majeure reste le transport de l'O₂ moléculaire des poumons aux tissus et l'élimination du gaz carbonique (CO₂). L'oxygène est transporté dans le GR par la molécule d'Hb sous forme d'oxyhémoglobine. Une fois diffusé à travers la membrane alvéolaire, l'oxygène dans les capillaires pulmonaires se lie de manière réversible au premier groupement d'hème produisant un léger mouvement au centre de la chaîne de globine qui se transmet ensuite vers la surface de la molécule d'Hb. Cette dynamique moléculaire déstabilise les interactions ioniques qui lient ensemble les quatre sous-unités de globine et entraîne un changement de conformation dans la structure quaternaire de la molécule d'Hb. Dans la nouvelle réorganisation structurelle de l'Hb, la fente abritant l'hème, site de fixation, s'élargie, ce qui augmente l'affinité des autres groupements d'hème pour l'oxygène facilitant ainsi à l'Hb la transition de sa forme T (forme désoxygénée) à sa forme R (la forme saturante en O₂) fixant jusqu'à quatre molécules d'O₂ (**Figure 3**) (Thomas and Lumb 2012).

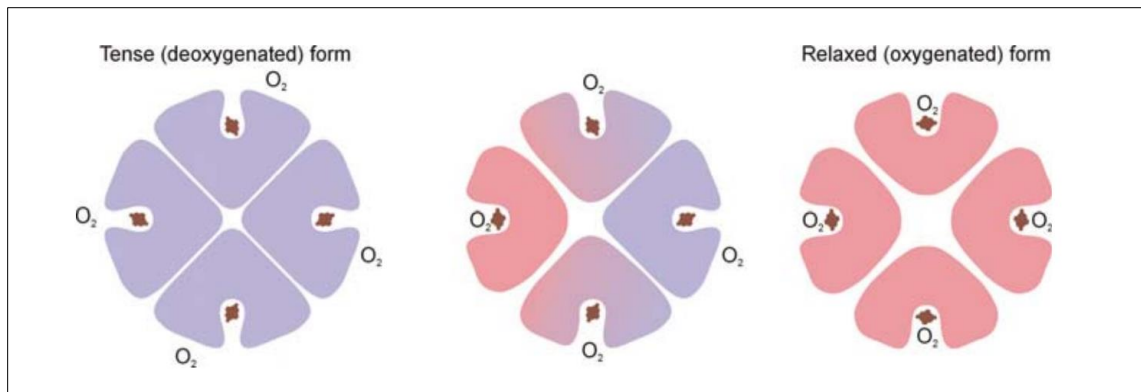


Figure 3. Transition de l'hémoglobine de la forme « tendue » vers la forme « relâchée » (Thomas and Lumb 2012).

Dans sa forme « tendue » désoxygénée, la crevasse contenant la molécule d'hème est étroite, limitant l'accès de l'oxygène à son site de liaison. Au fur et à mesure que chaque molécule d'oxygène se lie, la position de la molécule d'hème change, ce qui affecte l'interaction entre les chaînes de globine adjacentes, relaxant la molécule et permettant ainsi un accès plus facile des molécules d'oxygène suivantes à leur site de liaison.

La liaison de l'O₂ à l'Hb est un exemple de coopérativité positive qui est à l'origine de la forme sigmoïdale (ou forme S) de la courbe de dissociation. Celle-ci représente la relation entre la saturation en O₂ (SO₂) (axe des y) et la pression partielle de l'O₂ (PO₂) (axe des x). En effet, aux fortes PO₂ dans les capillaires pulmonaires, l'affinité pour l'O₂ augmente considérablement aidant l'Hb à lier le maximum de molécules d'O₂ jusqu'à atteindre la saturation. En se dirigeant vers les tissus, la PO₂ et l'affinité pour l'O₂ diminuent ce qui permet une forte délivrance de l'O₂ aux cellules métaboliquement actives (Patel et al. 2022). Deux paramètres de la courbe de dissociation permettent de quantifier l'affinité de l'Hb pour l'O₂ : la P₅₀ et le coefficient de Hill. La P₅₀ est définie comme la SO₂ pour laquelle l'Hb est saturée à 50% en oxygène. Une faible P₅₀ correspond à une forte affinité Hb-O₂ ou un décalage (« shift ») de la courbe de dissociation vers la gauche. En revanche, une P₅₀ élevée reflète une faible affinité Hb-O₂ ou un décalage (« shift ») de la courbe de dissociation vers la droite. Le coefficient de Hill est souvent utilisé pour décrire la courbure de la courbe de dissociation (Dunn et al., 2016; Ahmed et al., 2020; Webb et al. 2022). La **figure 4** présente les courbes de dissociation de trois types d'Hb humaines, Hb embryonnaires, foetale et adultes. Les capacités de liaison des différents tétramères à l'O₂ sont considérablement différentes. Elles ont évolué de sorte que chacune puisse lier de la manière la plus optimale l'oxygène auquel elle est exposée à un moment donné de son développement (Manning et al. 2017; Manning et al. 2020).

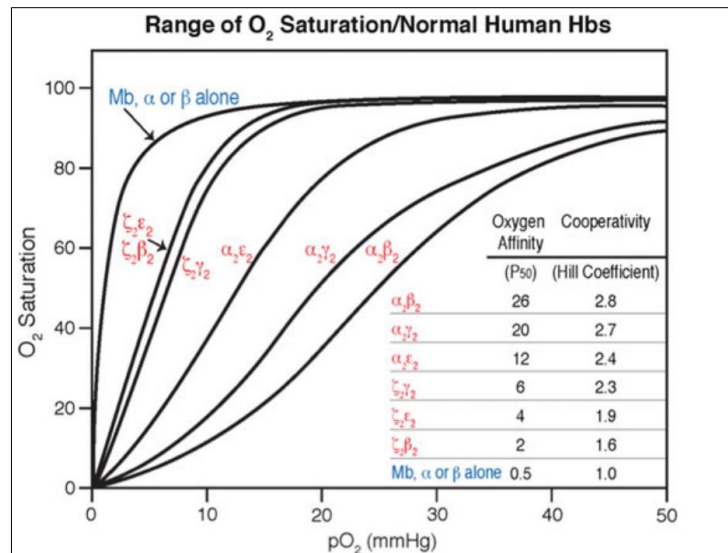


Figure 4. Courbes de fixation de l'oxygène des différents tétramères d'Hb humaines embryonnaires, fœtale et adultes (indiquées en rouge) et des sous-unités individuelles alpha et beta (indiquées en bleu) en fonction de la pression partielle en dioxygène (Manning et al. 2020).

En plus de la structure de l'hémoglobine et de la PO_2 , l'affinité Hb- O_2 est déterminée par plusieurs autres facteurs allostériques (**Tableau 1**) tels que la température, le pH, le CO_2 , les ions H^+ et Cl^- , le 2,3-disphosphoglycerate (2,3-DPG). Le 2,3-DPG, régulateur le plus puissant, est un phosphate organique produit dans le GR lors de la glycolyse. Le 2,3-BPG agit en stabilisant la forme désoxygénée de l'Hb. Ainsi, à de fortes concentrations, le 2,3-DPG favorise la libération des molécules d' O_2 de l'Hb. Une production importante du 2,3-DPG est observée en cas d'anémie ce qui peut minimiser l'hypoxie tissulaire et déplacer la courbe de dissociation vers la droite (Dunn et al. 2016; Webb et al. 2022)

Tableau 1. Facteurs affectant la courbe de dissociation de l'oxygène humaine (Dunn, Mythen, and Grocott 2016).

	Left-shifted ODC ($\downarrow P_{50}$)	Right-shifted ODC ($\uparrow P_{50}$)
Causes	$\uparrow pH$ ($\downarrow H^+$) $\downarrow Pa_{CO_2}$ \downarrow 2,3-diphosphoglycerate \downarrow Temperature	$\downarrow pH$ ($\uparrow H^+$) $\uparrow Pa_{CO_2}$ \uparrow 2,3-diphosphoglycerate \uparrow Temperature
Effect	Increased haemoglobin oxygen affinity, enhanced oxygen binding	Decreased haemoglobin oxygen affinity, enhanced release of oxygen in the tissues
Others	Fetal haemoglobin Carbon monoxide poisoning Methaemoglobinaemia	Adult haemoglobin

Le dioxyde de carbone est véhiculé vers les poumons par trois mécanismes : environ 5% du CO₂ diffuse dans le sang et se dissout directement dans le plasma, 6% se lie aux extrémités N-terminales des chaînes d'Hb dans le GR pour former la carbaminohémoglobine qui a une affinité diminuée pour l'O₂ et 89% est transformé par l'anhydrase carbonique en acide carbonique (H₂CO₃) qui se dissocie en hydrogène (H⁺) et bicarbonate (HCO₃⁻) dans le cytosol du GR. Le bicarbonate quitte le GR en échange par les ions chlorure (Cl⁻) à travers son transporteur membranaire la bande 3. Au niveau des capillaires pulmonaires, la réaction chimique qui produit le bicarbonate est inversée, et le CO₂ est de nouveau produit et diffuse à travers la membrane respiratoire des alvéoles pour être en fin expiré dans la ventilation respiratoire (Thomas and Lumb 2012; Dunn et al. 2016).

1.2. Membrane plasmique et cytosquelette

Dans la microcirculation, de nombreux capillaires sont 2 à 3 fois plus étroits que le diamètre d'un GR normal. Pour retourner à la circulation veineuse dans la rate, les GR doivent également se glisser à travers des fentes de cellules inter-endothéliales de seulement quelques micromètres de largeur. L'adaptation à ces défis exige non seulement une forte résistance à la traction (étirement), mais aussi une souplesse, une élasticité et une flexibilité nécessaires pour tolérer des changements extraordinaires dans le volume, la forme et la biochimie des GR. Cette adaptation qui caractérise typiquement le GR est assurée par la structure et la fonction unique de sa membrane et son cytosquelette sous-jacent (Benz et al., 2017). Ces derniers sont étroitement liés et ensemble forment un complexe structural appelé « squelette membranaire » essentiel pour maintenir l'osmolarité, la forme et la déformabilité réversible du GR. En effet, grâce au squelette membranaire, le GR est environ 100 fois plus élastique qu'une membrane en latex d'épaisseur comparable, plus fort que l'acier en termes de résistance et répond aux contraintes de fluide appliquées avec des constantes de temps de l'ordre de 100 millisecondes. Bien qu'un GR puisse se déformer avec une extension linéaire allant jusqu'à 250 %, une augmentation de 2-3 % de sa superficie entraîne son hémolyse (Mohandas and Gallagher 2008). La modification soit de l'osmolarité ou de la composition protéique du squelette membranaire peut réduire la durée de vie des GR (Narla and Mohandas 2017; Caulier et al. 2019; Iolascon et al., 2019). La membrane plasmique est composée d'une bicouche lipidique dans laquelle viennent s'intégrer des protéines transmembranaires pour former des complexes multiprotéiques qui servent de points d'ancrage pour des protéines du cytosquelette. L'assemblage moléculaire des principales protéines est indiqué dans la **figure 5**. Deux types d'interactions existent : verticales et horizontales. Les interactions verticales sont perpendiculaires au plan de la membrane présentées par des complexes macromoléculaires d'ankyrine et de protéines jonctionnelles qui relient le squelette de la spectrine aux protéines intégrales ou transmembranaires intégrées dans la bicouche lipidique (**Figure 5, A**). Les

interactions horizontales sont parallèles au plan de la membrane et indiquées par les tétramères de la spectrine et la protéine 4.1R ((Iolascon et al., 2019).

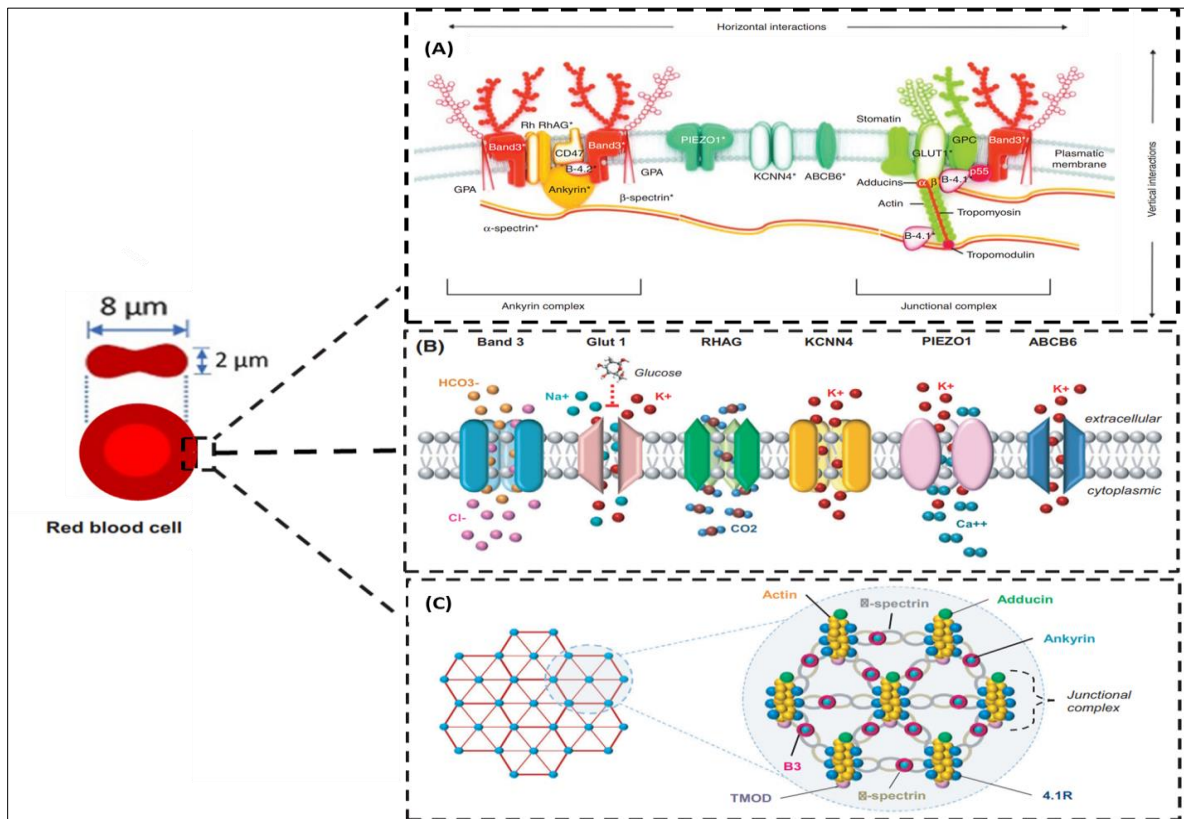


Figure 5. La membrane plasmique et le cytosquelette du globule rouge (Iolascon et al., 2019).

(A) L'assemblage moléculaire des principales protéines qui constituent la membrane plasmique et le cytosquelette et les interactions verticales et horizontales qui les relient. Les protéines et les lipides ne sont pas dessinés à l'échelle (GPA= glycophorine A, GLUT1= transporteur de glucose-1). (B) La représentation schématique des transporteurs ioniques transmembranaires de la membrane. (C) Le réseau pseudo-hexagonal du cytosquelette se liant au complexe jonctionnel composé de spectrine, d'actine et de la protéines 4.1R (B3= bande 3, TMOD = Tropomoduline).

Lipides membranaires. La bicouche lipidique est constituée de proportions égales de cholestérol et de phospholipides. Contrairement au cholestérol qui est uniformément et équitablement réparti entre les deux feuillets de la membrane plasmique pour réguler sa fluidité, la distribution des phospholipides est asymétrique. La monocouche externe de la membrane contient principalement les phospholipides de choline, la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SP), tandis que les aminophospholipides, la phosphatidyl-éthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS) ainsi que les constituants mineurs des phospho-inositides sont confinés au niveau du feuillet interne. Les phospholipides se diffusent passivement à travers la membrane, leur disposition asymétrique est maintenue et régulée par des enzymes spécifiques : deux translocases ATP-dépendantes (flippases et floppases) et une scramblase dépendante du Ca^{+2} (Figure 6).

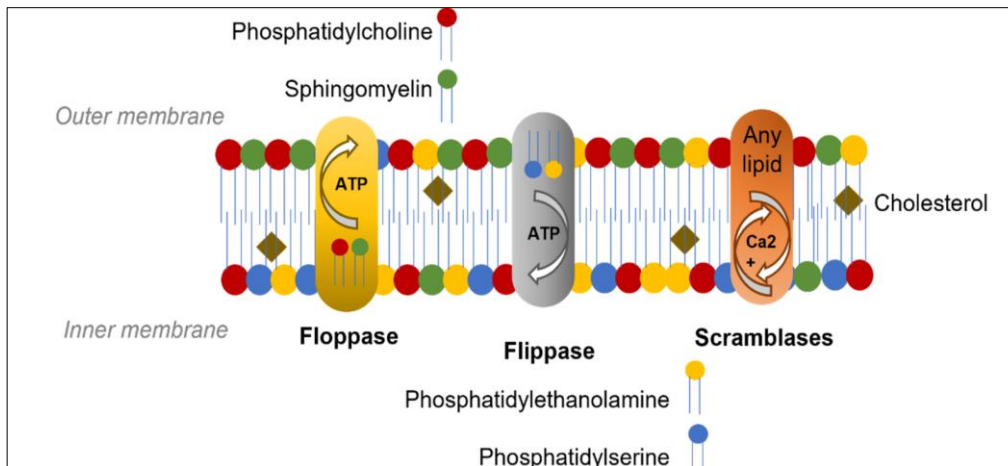


Figure 6. Distribution des phospholipides dans la membrane érythrocytaire ((Stevens-Hernandez et al. 2022).

Les phospholipides ont une distribution asymétrique tandis que le cholestérol est réparti uniformément. La localisation des phospholipides est maintenue par les translocases dépendantes de l'ATP et les scramblases. Les flippases transportent la PS et PE de la monocouche externe à la monocouche interne et les floppases transportent la PC et la SP du feuillet interne au feuillet externe. Les scramblases dépendantes du Ca^{2+} peuvent transporter les phospholipides dans les deux sens.

La flippase déplace la PS et la PE du feuillet externe vers le feuillet interne et la floppase transporte la PC et la SP de la monocouche interne vers la monocouche externe en utilisant de l'énergie. La maintenance des amino-phospholipides (PS et PE) dans le feuillet interne peut être favorisée également par leur interaction avec le cytosquelette via la spectrine (Mohandas and Gallagher, 2008; Benz et al., 2017; Stevens-Hernandez et al. 2022). La scramblase peut déplacer rapidement les phospholipides de manière non sélective dans les deux sens. Cependant, il est à noter que cette enzyme n'est active que lorsqu'il y a une augmentation de l'influx de Ca^{2+} , un phénomène qui se produit normalement dans des conditions physiopathologiques ou lors de la stimulation mécanique de la membrane mécanique des GR (Pretorius et al., 2016). La régulation de l'asymétrie des phospholipides est essentielle pour maintenir l'intégrité de la membrane. Sa perte conduit entre autres à l'externalisation de la PS qui semble jouer un rôle dans la destruction prématurée des GR en drépanocytose et dans d'autres pathologies (Yasin et al. 2003; Mohandas and Gallagher 2008).

Protéines membranaires. La membrane du GR est composée de nombreuses protéines dont beaucoup d'entre elles sont transmembranaires ancrées dans la bicouche lipidique. D'autres protéines sont périphériques attachées à la membrane via des interactions protéine-protéine ou protéine-lipide (Stevens-Hernandez et al. 2022). La grande majorité des protéines périphériques sont des lipoprotéines ou des glycoprotéines liant des résidus chargés négativement qui créent un nuage électrostatique répulsif autour de la cellule minimisant ainsi les interactions GR-GR et l'agrégation des GR (Benz et al., 2017; Pretini et al., 2019). La plus

abondante parmi celles-ci est la glycophorine qui est fortement modifiée par l'acide sialique sur sa surface externe. Les fragments exposés vers l'extérieur des protéines périphériques sont sujets à des polymorphismes aussi bien au niveau de la séquence en acides aminés que dans la composition de leurs modifications glucidiques et lipidiques. Ces polymorphismes sont cliniquement reconnus comme les antigènes majeurs et mineurs du GR qui jouent un rôle important dans la caractérisation des anémies hémolytiques auto-immunes, la transplantation de la moelle osseuse et en médecine transfusionnelle (Benz et al., 2017).

Plus de 50 protéines intégrales ou transmembranaires d'abondance variée allant de quelques centaines à des millions d'exemplaires par globule rouge ont été bien caractérisées. Bryk et Wisniewski ont identifié 41 protéines membranaires intégrales exprimées à plus de 100 exemplaires par GR. Les résultats de cette étude ont montré que les protéines les plus abondantes étaient la bande 3 (> 1 000 000 copies par GR), suivie par des protéines impliquées dans le transport de l'eau, l'urée, l'ammoniac, les nucléosides, le calcium et le fer (20 000 – 60 000 exemplaires), du transporteur de glucose, GLUT1 ou SLC2A1 (environ 200 000 exemplaires) et de la Na⁺/K⁺ ATPase et du canal K⁺ Gardos (KCNN4) présents à 3000 – 5000 exemplaires (Bryk and Wiśniewski, 2017). La bande 3 appelée aussi SLC4A1 est constituée de deux domaines structurellement et fonctionnellement distincts : un domaine de liaison cytoplasmique N-terminal qui est le site de fixation du cytosquelette, des enzymes de la glycolyse et de la désoxy-hémoglobine et un domaine transmembranaire C-terminal qui forme un canal d'échange d'anions facilitant le transport du dioxyde de carbone (**Figure 7**). Les enzymes glycolytiques forment un complexe métabolique ou un métabolon s'étendant de la phosphofructokinase à la déshydrogénase lactique. Trois enzymes se lient directement à l'extrémité N-terminale de la bande 3 : phosphofructokinase, aldolase et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. Les autres enzymes rejoignent le complexe métabolique mais ne lient pas la bande 3. Lorsque les enzymes glycolytiques sont liées à la bande 3, elles sont à l'état inactif mais elles passent à leur état actif une fois déplacées par soit la désoxyhémoglobine qui se lie également à l'extrémité N-terminale, ou par la phosphorylation de deux tyrosines (Tyr21-P et Tyr8-P) dans les sites de liaison. La localisation des enzymes glycolytiques ainsi que leur adénosine triphosphate au niveau d'amas discrets le long de la membrane, et l'augmentation du flux glycolytique de 45% dans les GR intacts une fois que ces enzymes sont déplacées de la membrane sont deux évènements qui soutiennent l'idée de l'existence d'un métabolon fonctionnel. L'Ankyrine se lie également à la bande 3 en tétramère au niveau de deux boucles en N-terminal. Comme dans le cas des enzymes glycolytiques, l'Ankyrine est séparée de la bande 3 par la désoxyhémoglobine. L'affinité de la désoxyHb pour la bande 3 est faible. Cependant, la concentration de l'Hb est tellement élevée dans le GR que la moitié des molécules de la bande 3 sont liées à la désoxy-Hb lorsque les GR sont désoxygénés (Campanella et al., 2005; Lux, 2016).

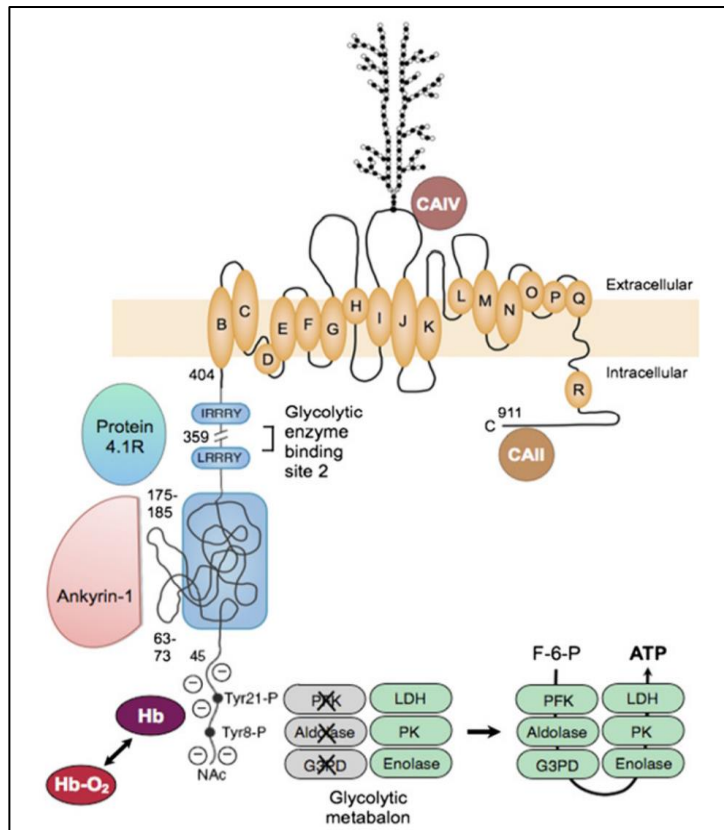


Figure 7. Modèle organisationnel de la bande 3 des GR humains (protéine échangeuse d'anions) (Lux, 2016).

(F-6-P = fructose 6-phosphate ; Hb-O₂ = oxyhemoglobine ; NAc = acetylated amino terminus).

En plus de sa fonction essentielle dans la structure de la membrane et le transport des anions (Cl⁻/HCO₃⁻) dans les GR, la bande 3 joue un rôle dans la signalisation cellulaire pour la clairance des GR par phagocytose médiée par les macrophages (Badiou and Casey, 2018). Les protéines de la membrane plasmique du GR manifestent une large hétérogénéité fonctionnelle et peuvent servir de protéines d'adhésion qui permettent aux GR d'interagir avec les autres cellules sanguines (globules blancs et plaquettes) et avec les cellules endothéliales, mais aussi de récepteurs de signalisation et de protéines de transport. Les protéines membranaires qui sont dotées d'une fonction de transport comprennent la bande 3 (transporteur d'anions), l'aquaporine 1 (transporteur d'H₂O), GLUT1 (glucose et transporteur de l'acide L-déhydroascorbique), la protéine de l'antigène Kidd (transporteur d'urée), RhAG (transporteur de gaz probablement du CO₂) et les canaux ioniques tels que le canal KCNN4 (ou Gardos), le canal PIEZO 1 et autres (Mohandas and Gallagher, 2008). Certains de ces transporteurs membranaires sont représentés dans la [figure 5B](#).

1.3. Métabolisme et système oxydoréduction

Les GR matures des sujets sains sont dépourvus de noyaux, de ribosomes et de mitochondries et sont donc incapables de générer de l'énergie via le cycle de Krebs (voie de l'oxydation).

Les processus métaboliques du GR sont limités et dépendent de la conversion anaérobie du glucose par la voie glycolytique ou voie de production d'énergie ou d'Embden-Meyerhof pour la génération et le stockage de phosphates à haute énergie (ATP) (**Figure 8**) (Huisjes et al. 2018; Grace and Glader 2018). Les voies du métabolisme des GR sont détaillées ci-dessous.

Voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse). Le glucose est la source principale d'énergie du GR. Dans des conditions physiologiques normales (c'est-à-dire sans stress oxydatif excessif), 90 % du glucose est catabolisé en anaérobiose en pyruvate ou en lactate par la voie d'Embden-Meyerhof générant un gain net de 2 moles d'ATP par mole de glucose (un total de 4 moles d'ATP sont générées dont 2 moles sont utilisées par l'hexokinase et la phosphofructokinase) ((van Wijk and van Solinge 2005).

Dérivation de Luebering-Rapaport. le shunt de Rapoport- Luebering est une ramification de la voie d'Embden-Meyerhof qui ne produit pas d'ATP mais qui est responsable de la synthèse et de la régulation des niveaux de 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-DPG), un modulateur important de l'affinité du complexe Hb-oxygène ((Grace and Glader 2018).

Dérivation de l'hexose monophosphate ou pentose phosphate. Cette voie appelée aussi voie du phosphogluconate a pour rôle majeur la génération de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) qui peut être utilisé pour convertir le glutathion oxydé en glutathion réduit. Ce dernier est considéré comme le principal antioxydant du GR qui protège les enzymes et l'Hb de l'action des oxydants et les maintient sous leur forme réduite et active. Cette voie métabolique confère au GR un mécanisme de réduction (de défense) notamment pendant un défi oxydatif (Brown, 1996).

Voie de la méthémoglobine réductase. Contrairement au shunt de l'hexose monophosphate qui fournit un mécanisme pour empêcher la dénaturation du composant globine de l'Hb, la voie de la méthémoglobine réductase, ce processus auxiliaire du métabolisme érythrocytaire, prévient l'oxydation du fer (hème) de la molécule d'Hb et le maintien à l'état réduit ou actif (ferreux). La voie de la méthémoglobine réductase utilise un potentiel réducteur généré sous forme de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) par la voie d'Embden-Meyerh dans l'étape catalysée par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ((Brown, 1996; van Wijk and van Solinge, 2005). Le produit final de la glycolyse dépend de la voie de la méthémoglobine réductase. En effet, le pyruvate est le produit final si cette réaction a lieu. Toutefois, si le NADH n'est pas réoxydé il est utilisé pour réduire le pyruvate en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) lors de la dernière étape de la glycolyse (van Wijk and van Solinge 2005).

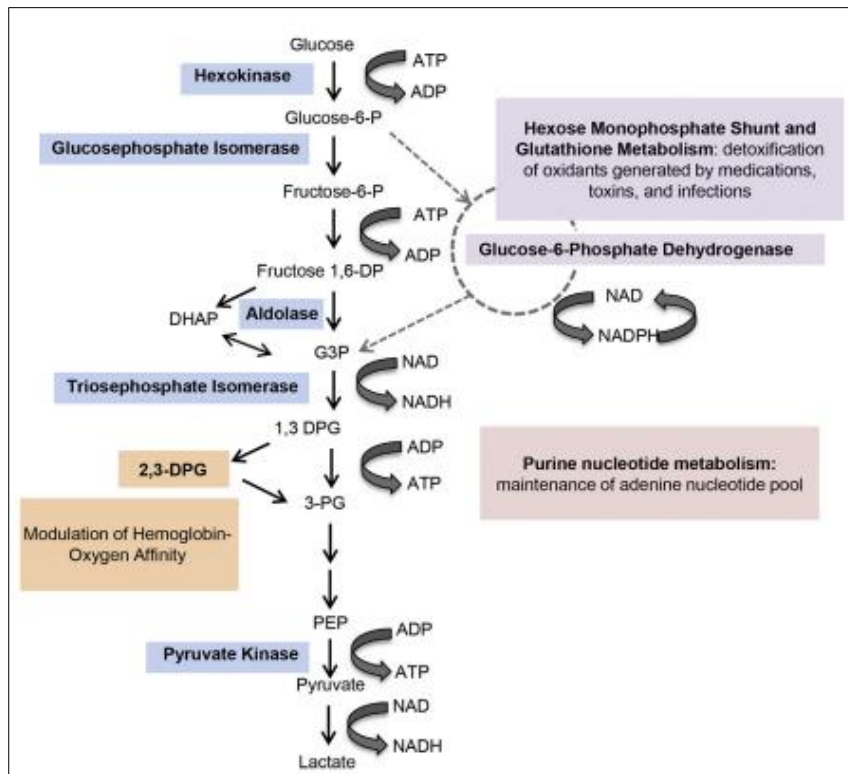


Figure 8. Résumé de l'ensemble du métabolisme glycolytique, du shunt de l'hexose monophosphate, du métabolisme du glutathion et du métabolisme des nucléotides du globule rouge (Grace and Glader 2018).

Régulation de la voie de la glycolyse dans les GR intacts. Comme mentionné précédemment, la stimulation de la glycolyse des GR est proportionnelle au taux de phosphorylation des résidus tyrosine de la partie cytoplasmique de la bande 3, puisque celle-ci lie plusieurs enzymes glycolytiques comme l'aldolase, la phosphofructokinase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase à l'état inhibé. Ce mécanisme de régulation du métabolisme érythrocytaire peut stimuler ou réduire la production d'énergie en cas de besoins particuliers, par exemple pendant une attaque de radicaux libres ((Vittori et al., 2012).

De nombreuses enzymopathies du GR ont été décrites dans la littérature. Les caractéristiques principales de ces troubles consistent en une intégrité des GR perturbée et une durée de vie cellulaire réduite. Les symptômes cliniques observés chez les patients varient d'une anémie absente ou légère avec hémolyse épisodique à une anémie chronique grave nécessitant des transfusions. Les patients ont également une érythropoïèse compensatoire, souvent accompagnée d'une réticulocytose ((Grace and Glader 2018).

2. Erythropoïèse ou production du globule rouge dans la moelle osseuse

2.1. Erythropoïèse à l'équilibre

La production de GR, ou l'érythropoïèse, est un processus complexe qui se déroule dans la moelle osseuse postnatale à partir d'une cellule souche hématopoïétique multipotente (CSH) qui sera à l'origine d'un mouvement de cellules à lignage engagé impliquant trois compartiments : des progéniteurs, des précurseurs et des GR matures. Les compartiments des progéniteurs et des précurseurs se trouvent dans des espaces extravasculaires protégés et sont associés à l'amplification et à la maturation cellulaires. Le troisième compartiment qui est fonctionnel, et soutenu par les deux premiers, consiste en des GR circulant dans le réseau vasculaire (**Figure 9**) (Palis 2014; Bhoopalan et al., 2020). Les différentes phases de l'érythropoïèse humaine sont détaillées ci-dessous.

Progéniteurs érythroïdes. Les cellules souches hématopoïétiques multipotentes subissent une série d'étapes de différenciation donnant naissance au premier progéniteur érythroïde (engagé uniquement dans la lignée érythroïde) identifiable appelé "*burst-forming unit-erythroid*" (BFU-E). Ces progéniteurs sont définis par leur capacité à former des colonies de cellules érythroïdes *in vitro* dans des milieux semi-solides. Chez l'Homme, les colonies dérivées des BFU-E ont besoin de 14 jours pour former des colonies matures contenant plus d'un millier de cellules érythroïdes. La différenciation des BFU-E produit des unités formant des colonies érythroïdes" (CFU-E) qui, contrairement aux progéniteurs les plus immatures (BFU-E), nécessitent seulement 7 jours pour produire des colonies matures qui ne sont constituées que de 16 à 32 cellules (Palis 2014; Bhoopalan et al., 2020).

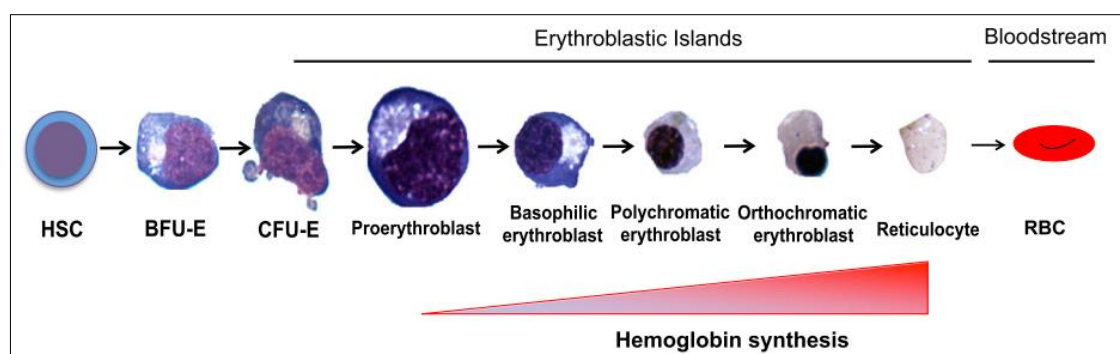


Figure 9. Aperçu de l'érythropoïèse, de la cellule souche hématopoïétique (CSH) au globule rouge (GR) (Zivot et al. 2018).

L'érythropoïèse a lieu dans la moelle osseuse, et les îlots érythroblastiques sont des niches pour l'érythropoïèse de l'UFC-E au stade réticulocyte. Ensuite, le réticulocyte rejoint la circulation sanguine où il atteint sa maturation en perdant ses organelles internes, en remodelant sa membrane plasmique et en devenant finalement un RBC.

Précurseurs érythroïdes. Les précurseurs des GR appelés érythroblastes sont un groupe de cellules nucléées générées par la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes. Les érythroblastes en cours de maturation subissent différents changements morphologiques qui définissent la nomenclature. Le précurseur le plus jeune (moins mature), dit proérythroblaste, se caractérise par une cellule de grande taille, de 12-20 µm de diamètres avec un noyau qui occupe environ 80% du volume cellulaire (Ovchynnikova et al. 2018). La forme proérythro-blastique (ProE) en cours de différenciation évolue en d'autres stades de maturation qui, par ordre croissant de maturité, sont les érythroblastes basophiles (BasoE), les érythroblastes polychromatophiles (PolyE) et les érythroblastes orthochromatiques (OrthoE) (Corrons, Casafont, and Frasnado 2021). La seconde phase de l'érythropoïèse est marquée par une augmentation de l'hémoglobinisation du cytoplasme, une diminution progressive de la taille des érythroblastes, une diminution du contenu en ARN, un arrêt du cycle cellulaire et une condensation de la chromatine aboutissant finalement à l'énucléation (Zivot et al. 2018).

Différenciation érythroïde terminale dans les îlots érythroblastiques. L'évènement le plus spectaculaire qui caractérise le dernier stade de la différenciation érythroïde terminale est la génération des cellules énucléées. L'énucléation produisant deux types de cellules, le réticulocyte de type 1 (R1) et le pyrénocyte (noyau condensé entouré d'une bicouche lipidique et d'une fine bordure de cytoplasme), a lieu dans un microenvironnement spécialisé, des niches anatomiques connues sous le nom d'îlots érythroblastiques (**Figure 10**) (Moras, Lefevre, and Ostuni 2017).

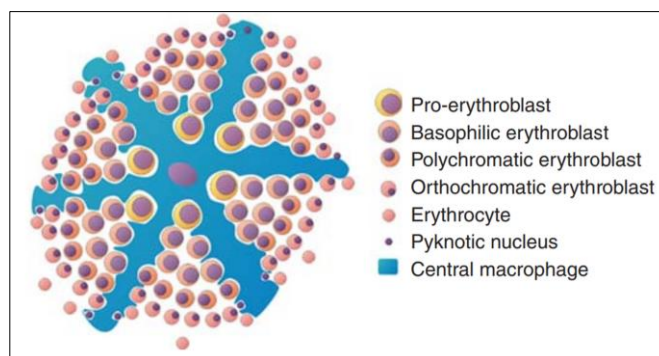


Figure 10. Dessin schématique d'un îlot érythroblastique (Dzierzak and Philipsen 2013).

Ces structures sont uniques à l'érythropoïèse des mammifères et sont constitués d'un macrophage central entouré de 5 à 30 cellules érythroïdes à différents degrés de maturation (des proérythroblastes aux réticulocytes). En plus qu'il favorise l'érythropoïèse en transférant le fer nécessaire pour la synthèse de l'hème de la molécule d'Hb aux progéniteurs érythroïdes et qu'il stimule et régule, par les interactions cellule-cellule ou la sécrétion de cytokines, leur prolifération, différenciation et survie cellulaires, le macrophage central des îlots érythroblastiques phagocyte le noyau extrudé des érythroblastes, le pyrénocyte, qui, 10 min

après son expulsion, expose à sa surface de la phosphatidylsérine (PS), ce qui constitue un signal « mangez-moi » ou « *eat-me* » (de Back et al. 2014; Moras et al., 2017).

Maturation des réticulocytes en GR matures dans la circulation. Lors de leur libération de l'îlot érythroblastique, les réticulocytes (R1) multilobulaires, de forme irrégulière et loin d'être flexible par rapport aux GR matures sortent dans la circulation sanguine (R2) pour achever le processus de maturation sous l'influence des forces externes, le *shear stress* et les interactions capillaires spléniques. Il faut compter 1 à 2 jours pour que le réticulocyte (R2) obtienne la bi-concavité et devienne un GR pleinement fonctionnel (**Figure 11A**). La maturation des réticulocytes est complexe et se traduit par trois événements majeurs : élimination des organites, contrôle du volume, remodelage de la membrane (Moras et al., 2017). La perte de tous les organites cytoplasmiques résiduels y compris les mitochondries et les ribosomes dans le réticulocyte se fait par l'autophagie et l'exocytose (**Figure 11B**). Pour adapter son volume à celui d'un GR mature, le réticulocyte perd environ 20% de la surface de sa membrane et réduit son volume cellulaire (de 115 fL à la sortie de la moelle osseuse à 85 fL dans la circulation). La perte de volume des réticulocytes peut être attribuée à deux processus : i) la perte de la membrane et des restes intracellulaires à travers la formation et l'élimination d'exosomes et de vésicules, et ii) l'action de transporteurs qui régulent la teneur en cations, anions et eau. Parmi ces derniers, le cotransporteur KCC (K⁺/Cl⁻) et le canal mécano-sensible Piezo1. Comme conséquence à la perte de volume, la concentration de l'Hb (CCMH) des réticulocytes augmente de 27 à 33 d/dL. Enfin, le réticulocyte effectue un réarrangement membranaire en utilisant des corps multi-vésiculaires pour expulser, par exosomes, les protéines indésirables. Parmi celles-ci, la perte progressive du récepteur de transferrine1 (TFR1) ou CD71+ qui est utilisée comme un marqueur informatif de la maturation réticulocytaire (*CD71-high*, *CD71-medium*, *CD71-low* et *CD71-negative*). La mise en œuvre de méthode de cytométrie en flux et l'utilisation du CD71 conjointement avec la coloration fluorescente à l'orange thiazole (TO) ont permis d'obtenir un système de classification de l'indice de maturité des réticulocytes plus avancé principalement parce que la perte de CD71 se produit avant la perte d'ARN (Ovchynnikova et al. 2018).

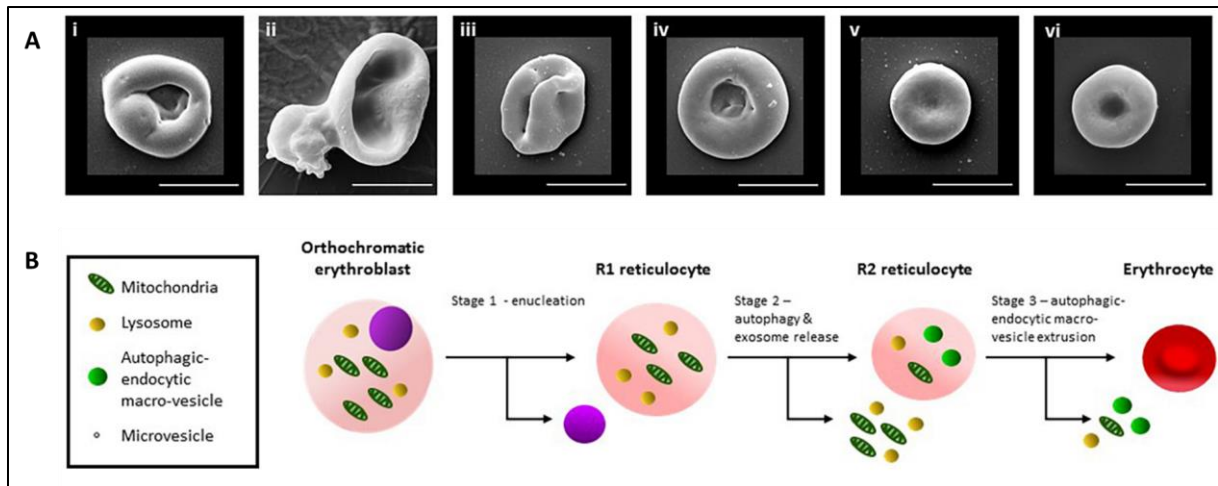


Figure 11. Maturation des réticulocytes en GR matures dans la circulation (Stevens-Hernandez et al. 2022).

(A) Microscopie électronique à balayage (SEM) de cellules érythroïdes. Des exemples illustratifs de la morphologie cellulaire typique des différents stades de maturation des érythrocytes sont présentés. (i) Réticulocyte orthochromatique réticulocyte. (ii) Réticulocyte énucléant. (iii) Réticulocyte R1. (iv) Réticulocyte R2. (v) Réticulocyte/RBC mature. (vi) RBC du donneur. Barre d'échelle 5 μm . (B) Schéma de la maturation des réticulocytes. Stage 1 : Les érythroblastes orthochromatiques s'énucléent et produisent un réticulocyte R1. Stage 2 : Organelles, lysosomes et protéines cytoplasmiques obsolètes sont éliminés par autophagie et libération d'exosomes, produisant un réticulocyte R2, probablement dans la moelle osseuse. Stage 3 : Les organelles résiduelles, les membranes internes et les protéines membranaires obsolètes sont éliminées dans des macro-vésicules endocytiques-autophagiques, extrudées à travers la membrane cellulaire, impliquant probablement des macrophages et produisant un érythrocyte.

2.2. Régulation de l'érythropoïèse par l'érythropoïétine

Bien que de multiples cytokines favorisent l'érythropoïèse, l'érythropoïétine (EPO) est le principal régulateur physiologique (Bhoopalan et al., 2020). L'EPO est une cytokine humorale synthétisée dans le rein et sécrétée dans la circulation sanguine où elle cible principalement les cellules progénitrices érythroïdes (UFC-E) dans la moelle osseuse (Figure 12A). La fonction principale de l'EPO est de réguler l'apport d'oxygène aux tissus périphériques et est facilitée par l'induction hypoxique de la transcription du gène de l'EPO (Palis, 2014). L'EPO agit par l'intermédiaire de son récepteur spécifique, EPOR, caractérisé par un domaine transmembranaire qui s'active après dimérisation lors de la formation du complexe EPO/EPOR. Des signaux en aval se produisent par les voies Jak2/Stat5, PI3K/AKT et MAPK qui active des gènes fondamentaux pour la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Figure 12B). La phosphorylation de STAT5 par JAK2 est essentielle en période de stress hypoxique puisqu'elle permet l'accélération d'érythropoïèse (Zivot et al. 2018). Il a été démontré que la perte d'EPO ou les dérèglements de la signalisation activée par l'EPO chez l'Homme provoquent une anémie, tandis que la synthèse accrue d'EPO ou l'activation chronique de la signalisation de

l'EPO ou les deux induisent une augmentation pathologique du nombre de GR (polycythémie vera) (Bhoopalan et al., 2020).

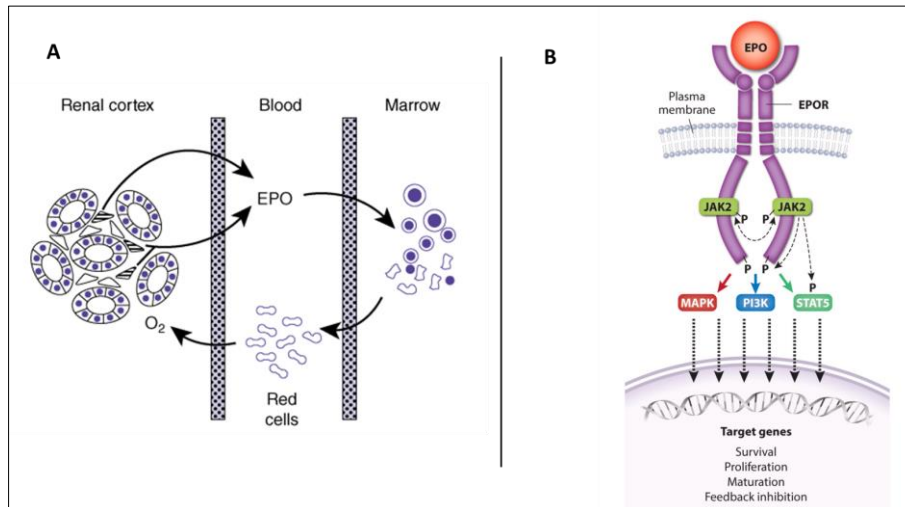


Figure 12. Régulation de l'érythropoïèse par l'érythropoïétine.

(A) Le mécanisme de rétroaction négative oxygénation-érythropoïétine (EPO) (Koury, 2016).
 (B) Activation du récepteur de l'érythropoïétine (EPOR) par l'EPO (Bhoopalan et al., 2020).

2.3. Troubles de l'érythropoïèse

L'érythropoïèse de stress et l'érythropoïèse inefficace sont deux événements, rares chez les sujets sains mais fréquents dans des circonstances pathologiques, qui peuvent altérer le taux de production des GR au niveau de la moelle osseuse. L'érythropoïèse de stress est définie comme un déséquilibre entre la prolifération et la différenciation érythroïdes qui aboutit à une augmentation rapide de la production des GR. Elle est provoquée par les situations d'hypoxie aiguë des tissus telles que la perte de sang, l'hémolyse et la stimulation accrue de la synthèse de l'EPO. Dans certains troubles, l'érythropoïèse de stress peut devenir chronique et se transformer en une érythropoïèse inefficace qui se caractérise principalement par la mort des cellules érythroïdes avant ou peu après leur libération de la moelle (Corrons et al., 2021; Gupta et al. 2018).

3. Sénescence du globule rouge et modifications âge-dépendantes de ses propriétés.

Les GR subissent plusieurs modifications physico-chimiques au cours de leur vieillissement dans la circulation. Ces changements peuvent se manifester à travers le changement de morphologie cellulaire du GR ou via des changements au niveau de ses différents constituants membranaires (protéines, glucides et lipides membranaires) ou intracellulaire (hémoglobine, enzymes de la glycolyse et du système rédox, et protéines du cytosquelette) (Shinozuka, 1994). En effet, les données ont montré qu'avec l'âge, les GR perdent 30 % de leur volume (VGM) et 15 à 20 % de leur hémoglobine (TCMH) à travers le phénomène de vésiculation, alors que la

concentration en hémoglobine (CCMH) augmente de 14 %. Cela signifie qu'avec l'âge, les GR perdent plus d'eau que d'hémoglobine et qu'ils deviennent plus petits et plus denses avec l'augmentation du temps passé dans la circulation (Bosch et al. 2009). Comme la perte en volume est plus importante que celle de la surface, rapport surface/volume (S/V) augmente. Cet effet théoriquement positif sur la déformabilité est supprimé par l'augmentation de la concentration d'hémoglobine, et probablement par une diminution de l'élasticité de la membrane (Bosman 2013). La déformabilité peut être également impactée par la réduction de la production de l'adénosine triphosphate (ATP). Les résultats de certains travaux utilisant des techniques différentes de mesure de la déformabilité des GR laissent croire que l'ATP n'est peut-être pas nécessaire pour que les GR s'allongent après l'application de forces externes, telles que la contrainte de cisaillement, mais l'ATP pourrait être essentielle dans le processus de déformation des GR vers différentes formes, comme les mesures de filtrabilités l'ont montré (Huisjes et al. 2018). Avec le vieillissement, les niveaux d'ATP intracellulaire chutent de 30 à 40%. Cette baisse est due essentiellement à deux éléments : i) la diminution de la consommation du glucose dans les GR vieux qui métabolisent 2,5 fois moins de glucose que les GR jeunes. Un phénomène lié à la diminution du transport à travers la membrane des GR avec l'âge ii) la diminution de l'activité de la majorité des enzymes du métabolisme. Cette dernière est impliquée également dans la survenue d'un déséquilibre dans la balance de la production des pro-oxydants et de leur élimination par les anti-oxydants tels que le glutathion (GSH), le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) produits via le cycle métabolique du GR. L'augmentation de la quantité des espèces oxygénées réactives générées par le stress oxydant endommage la majorité des constituants cellulaires du GR comme l'Hb (Hb oxydée est considérée comme la source principale de production d'anions superoxydes dans les globules rouges sénescents) et les protéines de la membrane notamment la bande 3 et la protéine CD47, qui à l'état altéré peuvent constituer des néo-antigènes ciblés par les mécanismes de clairance des GR de la circulation (Burger et al. 2012; Lutz and Bogdanova 2013). Un changement dans l'activité des transporteurs d'ions des GR sénescents a été également rapporté dans la littérature. Tous les transporteurs d'ions non éliminés lors de la maturation des réticulocytes en GR matures dans les exosomes subissent une inactivation liée à l'âge. L'activité du canal Gardos, l'activité de la pompe à calcium de la membrane plasmique et le nombre de copie des récepteurs N-méthyl D-aspartate (NMDA) diminuent au cours du vieillissement des GR dans la circulation (Lutz and Bogdanova, 2013). D'autres changements comme la vésiculation, la diminution de la quantité d'acide sialique ainsi que la réduction du nombre glycophorines au niveau de la membrane sont constatés également au fur et à mesure que le GR prend dans l'âge dans la circulation (Shinozuka, 1994). Les changements liés au processus du vieillissement du GR cités ci-dessus sont utilisés comme marqueurs de sénescence pour isoler, séparer et étudier *in vitro* les cellules sénescents et les mécanismes liés à l'âge (voir [tableau 2](#)). Cependant, la diminution de ces

marqueurs n'est dans la majorité des cas pas linéaires en fonction de l'âge des GR ([tableau 2](#)). Pour M. Clark (1988), la caractéristique principale d'un bon marqueur de sénescence ou d'âge est la propriété cellulaire qui n'est pas modifiée de façon marquée lors de la maturation des réticulocytes mais change progressivement, de préférence, de manière linéaire, au fur et à mesure que le GR mature circule. Quelques caractéristiques des GR sont prometteuses à cet égard. Parmi celles-ci, la proportion de l'Hb glyquée, en particulier le composant appelé HbA1c. Cette dernière est générée d'une réaction non enzymatique et par conséquent sa quantité dans un GR donnée devrait dépendre principalement de la concentration moyenne de glucose et de la durée de la période pendant laquelle le globule rouge est en contact avec le glucose (Clark, 1988). Cette protéine modifiée sera détaillée dans le 3ème chapitre.

Tableau 2. Changements dans les propriétés des RBC associés au vieillissement (Lutz and Bogdanova 2013).

RBC property or enzyme studied	Change of activity	Change of activity with cell age phase a/phase b	White cell removal	Species Studied	Data obtained by	References
METABOLIC ENZYMES						
Lactate dehydrogenase/mg protein	–	Constant	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Phosphoglycerate kinase/mg protein	–	Constant	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Pyruvate kinase /mg protein	–	Constant	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Acid phosphatase/mg protein	–	Constant	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Pyruvate kinase/mg Hb	D	Exponential	Yes	Human	Density	Haram et al., 1991
Phosphofructokinase (PFK)/Cell number	D	Linear	Yes	Human	Density + Elutriation	Jansen et al., 1986
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)/cell number	D	Linear	Yes	Human	Density + Elutriation	Jansen et al., 1986
Hexokinase/cell number or mg/Hb	D	Exponential/linear	Yes	Human	Density + Elutriation	Haram et al., 1991; Piomelli and Seaman, 1993
KINASES						
Membrane associated casein kinase/mg protein	D	Linear	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Membrane casein kinase I/mg protein	D	Linear	Yes	Human	Density	Jindal et al., 1996
Casein kinase I/mg membrane protein	D	Linear	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Membrane protein kinase C (PKC)/mg protein	I	Increase/linear		Human	Density	Ramachandran and Abraham, 1989
Cytosolic protein kinase C (PKC)/mg protein	D	Exponential	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Cytosolic protein kinase C (PKC)/mg protein	D	Exponential	Yes	Human	Density	Jindal et al., 1996
Pyruvate kinase/cell number (PK) or mgHb	D	Exponential	Yes	Human	Density + Elutriation	Jansen et al., 1986; Piomelli and Seaman, 1993
Cytosolic CKII/mg protein	D	Exponential	Yes	Human	<i>In vivo</i> biotinylation	Jindal et al., 1996
Cytosolic PKA/mg protein	D	Exponential/constant	Yes	Human/Rabbit	Density	Jindal et al., 1996
AMINO ACID MODIFICATIONS						
Glutamate/oxalacetate transaminase/mg Hb	D	Exponential	Yes	Human	Density	Haram et al., 1991; Piomelli and Seaman, 1993
Aspartate amino transferase (ASAT)/cell number	D	Exponential	Yes	Human	Density + Elutriation	Jansen et al., 1986
AMP deaminase/mg Hb	D	Exponential/constant	Yes	Rabbit	<i>In vivo</i> biotinylation	Dale and Norenberg, 1989
MARKERS OF SENEESCENCE						
Glutathione reductase (GR)/cell number	D	Linear	Yes	Human	Density + Elutriation	Jansen et al., 1986
HbA1c (glycated Hb) fraction/Whole Hb	I	Linear	–	Human	Biotinylation	Willekens et al., 2003; Cohen et al., 2008
Ratio of content of band 4.1a/4.1b/mg protein	D	Linear	Yes	Many	Density	Mueller et al., 1987; Inaba and Maede, 1988
Acetylcholinesterase units/mg Hb	D	Linear	Yes	Human	Density	Cohen et al., 1976
Creatine/cell number	D	Exponential	Yes	Human	Density	Fehr and Knob, 1979

4. Clairance ou élimination du globule rouge de la circulation sanguine

Plusieurs mécanismes d'élimination des GR sénescents de la circulation sont décrits dans la littérature. Nous traiterons ici seulement les deux mécanismes les plus connus : la phagocytose et l'hémolyse.

4.1. Mécanismes de clairance par érythrophagocytose

L'érythrophagocytose a lieu principalement dans la rate, plus exactement au niveau de la pulpe rouge riche en macrophages, qui fonctionne essentiellement comme un filtre pour le sang. Dans la pulpe rouge, le contact entre les GR et le macrophage est entamé et établi grâce à la forte densité de ces derniers, qui reconnaissent les GR endommagés, déformés et sénescents et les éliminent de la circulation par phagocytose. Le mécanisme moléculaire précis par lequel les macrophages reconnaissent les GR sénescents pour les éliminer reste encore à élucider (Kaestner and Minetti 2017; Thiagarajan et al., 2021). Les hypothèses les plus répandues tournent autour de l'expression de néo-antigènes à la surface des rouges (tels que la bande 3 et la protéine CD47) et la diminution de la déformabilité (de Back et al. 2014; Thiagarajan et al., 2021).

Bande 3 et phagocytose. La bande 3 a été proposée comme le marqueur de clairance des GR. La dénaturation de l'Hb entraîne la formation des hémichromes qui s'accumulent dans le cytoplasme et se copolymérise avec le domaine cytoplasmique de la bande 3 provoquant ainsi une altération de sa conformation. Ensemble, l'agrégat macromoléculaire insoluble (Cluster de la bande 3) est supposé exposer les néo-antigènes qui sont reconnus par les anticorps naturels puis par les macrophages avant leur élimination (Thiagarajan et al., 2021). Comme la bande 3 en cluster induite par l'hémichrome est plus sensible à la dégradation protéolytique, elle peut donc aussi après l'action de la protéase constituer une étiquette de sénescence (**Figure 13A**) (Bosman 2013).

CD47 et phagocytose. A la base, le CD47 présent sur les GR fonctionne comme un signal « ne me mange pas, *don't eat me* » puisqu'il est capable d'inhiber la phagocytose par le biais d'une interaction avec l'immunorécepteur *Signal Regulatory Protein alpha* (SIRPa) exprimé par les macrophages. L'interaction CD47-SIRPa constitue un signal négatif pour la phagocytose des GR. Cependant, des travaux de Bruggen et al. ont montré que le vieillissement expérimental des GR induit un changement de conformation du CD47 qui fait passer la molécule d'un signal inhibiteur à un signal activateur. La transmission d'un signal « mange-moi, *eat me* » par le CD 47 qui favorise la phagocytose des GR par les macrophage de la pulpe rouge nécessite en revanche l'interaction du CD 47 avec son partenaire de liaison, la thrombospondine-1 (TSP-1) (**Figure 13B**) (van Bruggen, 2013).

D'autres éléments de la membrane plasmique des GR (tels que la bande 4.1 et les résidus galactosyl), non détaillés dans cette partie, peuvent éventuellement déclencher l'érythro-phagocytose.

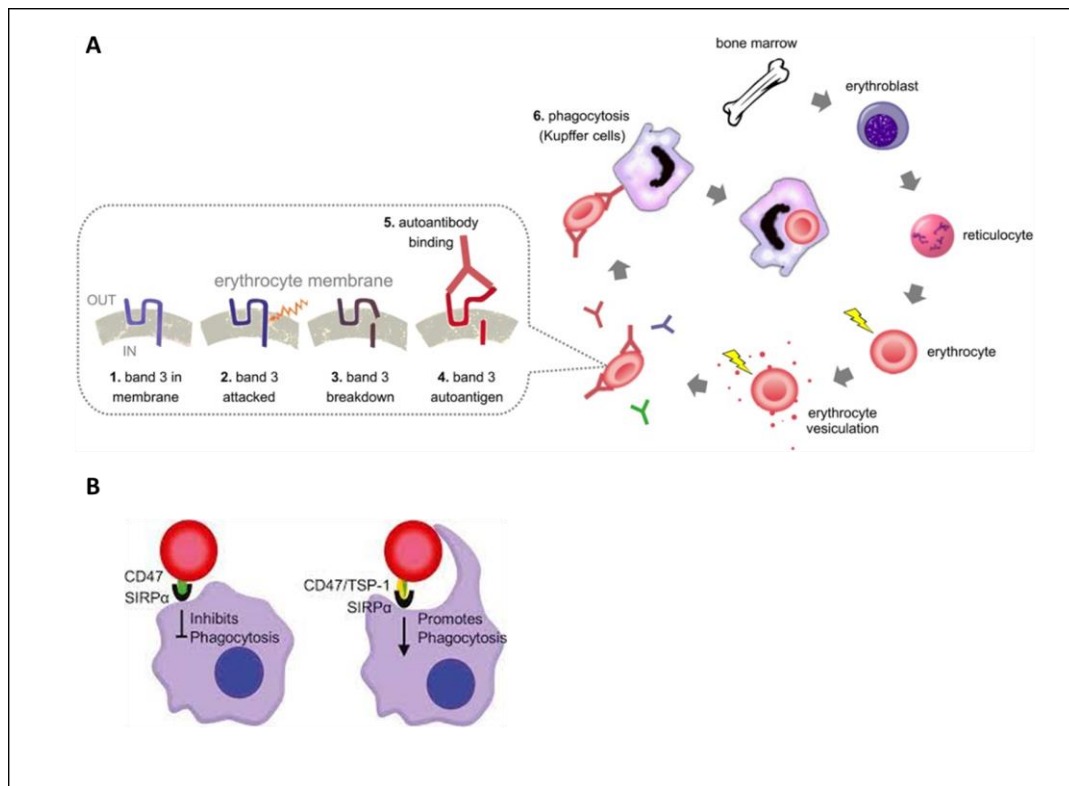


Figure 13. Implication de la bande 3 et du CD47 dans la clairance des GR par phagocytose.

(A) L'altération de la bande 3 par la formation d'amas de bande 3 ou par la dégradation protéolytique fait apparaître le néo-antigène ciblé par les anticorps naturels reconnus pas les macrophages (Bosman, 2013). (B) L'inhibition de l'érythro-phagocytose par l'interaction CD47 (GR) – SIRPα (macrophage). La liaison de la TSP-1 au CD47 sur le GR manifestant des changements conformationnels favorise la phagocytose via le SIRPα sur la macrophage (van Bruggen 2013).

Déformabilité et phagocytose. Un autre mécanisme d'élimination des GR sénescents de la circulation est leur déformabilité réduite. Au cours de leur vie dans la circulation, les GR doivent subir d'importantes déformations afin de pouvoir passer notamment à travers les capillaires étroits de la microvasculature et les fenestrons de la rate. La déformabilité des GR est régie par : i) la viscosité de leur cytoplasme (déterminée essentiellement par les propriétés physique de l'Hb), ii) le rapport surface/volume (S/V) (déterminé par la forme des cellules) et iii) l'élasticité de la membrane (déterminée par les propriétés rhéologiques de la membrane). Au niveau de la rate, les GR mal déformés sont retenus dans les cordons spléniques et finalement détruit par les macrophages de la pulpe rouge (Dinkla, 2016; Thiagarajan et al., 2021).

4.2. Mécanisme de clairance par hémolyse

L'hémolyse intravasculaire est médiée par les anticorps (IgM) via l'activation du complément par la voie classique. La destruction des GR, dans ce cas, se fait directement par les dommages induits par le complément et indirectement par la clairance via par les macrophages des GR opsonisés par le complément. L'hémolyse extravasculaire a lieu au niveau de la rate et du foie et est médiée en revanche par des macrophages spécifiques capable de lier la partie Fc des IgG qui se lient aux antigène des GR (Thiagarajan, Parker, and Prchal 2021).

4.3. Autres mécanismes de clairance

Il existe d'autres mécanismes d'élimination des GR de la circulation tels que la néocytolyse (destruction des GR jeunes) et l'éryptose (mort programmée des GR) qui ne sont pas détaillés dans cette partie.

Méthodes de mesure de la durée de vie des globules rouges et de séparation de globules rouges sénescents

Introduction

5. Méthodes de mesure de la durée de vie des globules rouges

5.1. Méthodes de marquage de population de globules rouges

5.2. Méthodes de marquage de cohorte de globules rouges

6. Variabilité inter-individuelle de la durée de vie des globules rouges

7. Méthodes de séparation des globules rouges en fonction de leur âge in vitro et chez l'animal

7.1. Méthodes de séparation des sous populations de GR d'âge progressif appliquées in vitro

7.2. Isolation in vivo des GR sénescents chez l'animal

8. Utilisation de l'HbA1c comme indicateur d'âge des globules rouges

Chapitre II : Méthodes de mesure de la durée de vie des globules rouges et de séparation de globules rouges sénescents

Une fois libérés dans la circulation sanguine, les GR normaux progressent à travers plusieurs étapes, d'abord une courte durée sous forme de réticulocytes, puis une longue période sous forme de GR matures avec des propriétés relativement stables et homogènes, enfin un bref état terminal de sénescence suivi d'une élimination rapide de GR sénescents (Franco et al. 1998 ; Cohen et al. 2008). Le temps passé dans le sang circulant, depuis leur libération de la moelle osseuse jusqu'à leur disparition de la circulation périphérique, correspond à la durée de vie des G (Franco, 2012; Zhang et al., 2018). Chez l'Homme, et chez un certain nombre d'espèces de mammifères, en condition normale, les GR ont à peu près une même durée de vie déterminée par une clairance âge-dépendante non aléatoire (Figure 14A). Cependant, l'élimination des GR de manière associée à l'âge n'est pas un mode universel. Chez certains animaux comme la souris, la cinétique de disparition d'une cohorte de GR marqués est du premier ordre, ce qui implique que les GR (jeunes et âgés) sont éliminés de la circulation au hasard sans référence à leur âge (Figure 14B) (Clark, 1988; Franco, 2009). L'élimination aléatoire des GR peut également être observée dans certaines conditions pathologiques où les GR subissent une destruction indépendante de leur âge physiologique ou cellulaire. Le lapin et le porc présentent une combinaison des deux modes de clairance de GR, âge-dépendant et aléatoire. (Figure 14C) (Clark, 1988). La détermination de la durée de vie des GR humains et l'étude de ses caractéristiques sont d'une importance conséquente dans plusieurs champs de recherche qui incluent : i) la physiopathologie de la drépanocytose, ii) le diabète et les inadéquations entre la glycémie et l'HbA1c, iii) les anémies associées à l'inflammation et aux maladies chroniques, iv) les recherches sur le vieillissement et la sénescence des GR, v) l'évaluation des milieux de conservation des concentrés de GR ainsi que l'efficacité de la transfusion des GR chez les nouveau-nés prématurés (Franco, 2012).

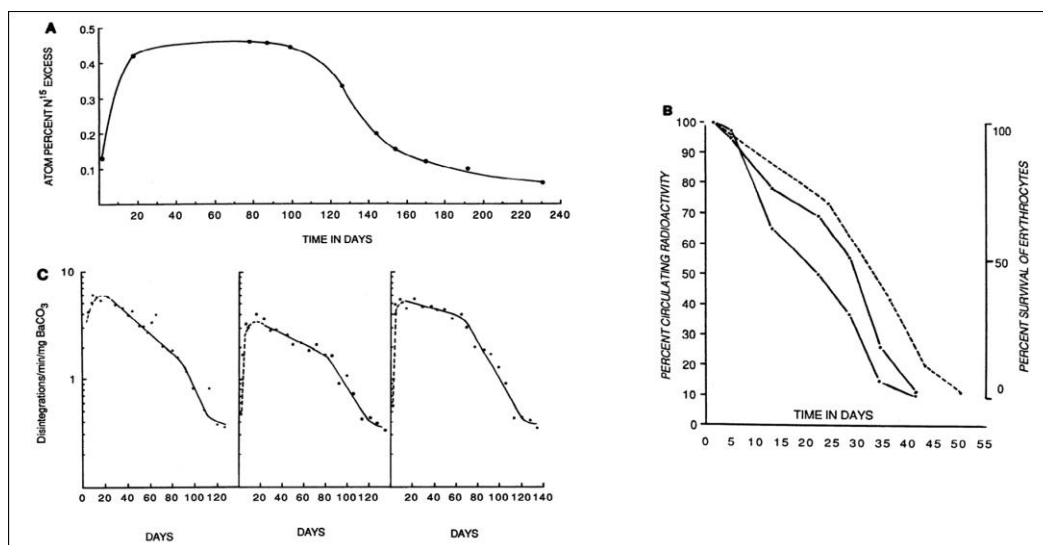


Figure 14. Durée de vie in vivo des cohortes de globules rouges (Clark, 1988).

Les courbes montrent l'apparition et la disparition d'une cohorte de GR après avoir été marqués dans la moelle osseuse. **(A)** La sénescence des GR humains marqués à la ^{15}N -glycine. A noter la disparition relativement rapide et simultanée de la cohorte labellisée en fin de durée de vie physiologique (cellulaire) estimée à 120 jours. **(B)** La destruction aléatoire des GR de souris marqués au ^{59}Fe radioactif. La durée de vie des (—) GR homologues et (---) GR autologues. A noter la disparition continue des GR marqués et l'absence d'un plateau défini la durée de vie des GR. **(C)** La durée de vie des GR de 3 porcs différents. La pente de la partie plateau de la courbe représente la superposition de modes d'élimination des GR : une destruction aléatoire et une élimination déclenchée par la sénescence. L'ampleur de la composante varie d'un animal à un autre.

En clinique, la mesure de la durée de vie des GR peut être utile dans le diagnostic et la prise en charge i) de l'hypersplénisme, ii) d'anémies inexpliquées sur une simple base morphologique, iii) d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire, et aussi dans, iv) l'évaluation de la thérapie dans l'anémie hémolytique et autres (Berlin, 1964). Un cas particulier est celui du diagnostic difficile des anémies mixtes de cause à la fois centrale (réticulocytes bas) et périphérique, puisqu'il n'y a pas de moyen actuel de confirmer l'existence de la part périphérique que la durée de vie des GR. Plusieurs techniques et méthodes ont été développées au cours des 100 dernières années pour mesurer de manière directe la durée de vie des GR, et pour isoler des GR à différents âges dans le but d'identifier les marqueurs de sénescence et d'étudier les mécanismes impliqués dans la clairance des GR circulants.

5. Méthodes de mesure de la durée de vie des globules rouges

La plupart des techniques de mesure de la durée de vie des GR, mais pas toutes, utilisent un marqueur qui doit être placé sur ou dans les GR et qui peut être suivi pendant que les GR vieillissent dans la circulation sanguine. Le choix du marqueur dépend de l'application, mais aussi des politiques réglementaires applicables et des capacités d'analyse disponibles (Donald M. Mock et al. 2014). Il existe deux grandes catégories de méthodes de mesure directe de la durée de vie des GR : méthodes de marquage de populations de GR et méthodes de marquage de cohortes de GR.

5.1. Méthodes de marquage de populations de GR

Les marqueurs de populations sont placés sur une population représentative de GR circulants de tout âge, des réticulocytes qui viennent d'être libérés de la moelle osseuse aux GR sénescents qui doivent être retirés de la circulation. Contrairement aux animaux qui peuvent recevoir le marqueur par voie intraveineuse, le marquage de populations chez l'Homme consiste d'abord à marquer les GR ex-vivo puis réinfuser (perfuser) immédiatement les GR marqués chez le receveur. En l'absence de réutilisation du marqueur, l'âge du plus jeune GR marqué de l'échantillon de sang réinfusé correspond à la période écoulée depuis la perfusion. Pour un sujet normal, le nombre de GR marqués diminue linéairement dans la circulation durant la majeure partie de la durée de vie globale avec une élimination à raison de 0,8 – 1%

par jour du nombre initial des GR marqués (**Figure 15**). La disparition des GR âgés marqués dans le sang périphérique sont remplacés par des GR jeunes non marqués. Cette approche peut aussi être utilisée pour isoler et étudier soit les GR les plus âgés (marqués) ou les plus jeunes (non marqués) (Berlin, 1964; Cohen et al., 2008). Les méthodes utilisées pour mesurer la durée de vie d'une population de GR comprennent : la méthode d'agglutination différentielle de Winifred Ashby (publiée en 1919), la méthode du chrome radioactif ou ^{51}Cr de Franklin G. Ebaugh et ses collaborateurs (publiée en 1953) et la méthode de la biotine de George Dale (publiée en 1987).

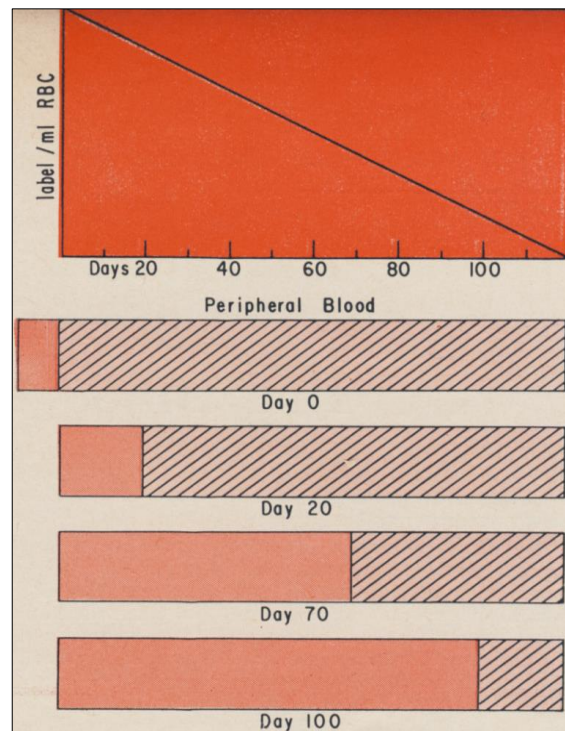


Figure 15. Marquage d'une population de globules rouges (Berlin, 1964).

La zone ombrée représente les globules rouges marqués qui une fois éliminées sont remplacées par des globules rouges non marqués.

Important. Avant de détailler ces méthodes, il est important d'expliquer très brièvement deux paramètres essentiels à tenir en compte dans le cas des méthodes de marquage de populations de GR.

Volume des GR circulants (Circulating RBC Volume, RCV). Dans le cas d'un marquage avec un marqueur de population basé sur sa concentration (le ^{51}Cr par exemple), le volume des GR circulants (RCV) est considéré comme le paramètre le plus important à déterminer et surtout à garder constant tout au long de l'expérience de suivi de la durée de vie des GR marqués. Le volume sanguin est déterminé en mesurant la dilution de GR autologues marqués au ^{51}Cr (le principe de dilution), et le RCV est calculé à partir soit d'une mesure indépendante du

volume plasmatique soit une hypothèse sur la relation entre l'hématocrite veineux et l'hématocrite corporel total (Donald M. Mock et al. 2014).

Nombre total de GR circulants (*total number of RBC in the circulation*). Pour les marqueurs de population basés sur le dénombrement des GR marqués en tant que proportion des GR totaux dans un échantillon de sang (le cas de la biotine), le nombre total de GR circulant est le paramètre à déterminer et à conserver constant durant la mesure de la durée de vie des GR marqués. Le nombre total de GR dans la circulation peut être calculé à partir du nombre de cellules marquées perfusées et du pourcentage de cellules marquées dans le sang après réinjection (GR marqués dilués). Le RCV peut être aussi déterminé en multipliant le nombre total de GR circulants par le VGM (obtenu par une NFS de routine) (Cohen et al. 2008; Donald M. Mock et al. 2014). La survie des GR (*Red Cell Survival, RCS*) est évaluée en mesurant la diminution de la concentration sanguine de ^{51}Cr ou de la proportion des GR biotinylés au fil du temps (Donald M. Mock et al. 2014) .

Méthode d'agglutination différentielle. Après l'établissement des groupes sanguins humains par Landsteiner ainsi que Jansky et Moss et tirant partie des connaissances émergentes sur le système ABO, Winifred Ashby (**Figure 16A**) a mis en place en 1919 la méthode d'agglutination différentielle considérée comme la première méthode valide et précise de mesure de la durée de vie des GR. À travers sa technique, l'auteur a montré pour la première fois que les GR transfusés pouvaient survivre plus de 100 jours dans la circulation sanguine et non des temps beaucoup plus courts (pas plus de 6 semaines) comme supposé auparavant. Le principe de la méthode d'agglutination différentielle consiste dans un premier temps à transfuser des sujets receveurs de groupes sanguins A et B avec des GR d'un donneur du type sanguin O. La mesure de la durée de vie des GR du donneur est ensuite effectuée en entraînant l'agglutination des GR endogènes (des receveurs) par l'utilisation des sérums anti-A et anti-B (**Figure 16B1 et Figure 16B2**). Le nombre de GR agglutinés en fonction du temps définit la durée de vie (Ashby, 1919).

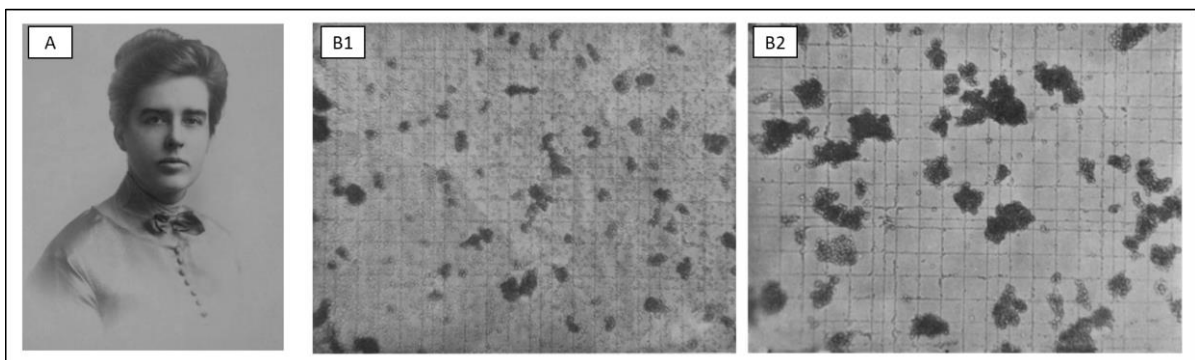


Figure 16. Méthode d'agglutination différentielle mise en place par Winifred Ashby (Ashby, 1919).

(A) Winifred Ashby (Franco, 2009), (B1) Microphotographie du sang agglutiné d'un sujet non transfusé, et (B2) Microphotographie montrant les amas de corpuscules naïfs agglutinés et les

corpuscules de sang transfusés non agglutinés d'un individu 16 jours après la transfusion (Ashby, 1919).

Bien qu'elle soit restée la norme et la méthode « standard » pour la mesure de la durée de vie des GR allogéniques pendant près de 40 ans, la méthode d'Ashby, soumise à de nombreuses variables ; suivi d'un comptage manuel de GR agglutinés et non agglutinés, était difficile à réaliser. De plus, cette méthode n'a pas pu être appliquée aux GR autologues. La technique d'agglutination différentielle a été alors remplacée à la fin des années 1940 lorsque les méthodes basées sur le marquage radioisotopique *ex-vivo* ont émergé (Ashby, 1919; Franco, 2012).

Méthode du chrome radioactif. Plusieurs isotopes radioactifs tels que le chrome-51 (^{51}Cr), le technétium-99 (^{99}Tc) et le di-isopropylfluorophosphate (DF^{32}P) ont été testés pour marquer des populations de GR et estimer leur survie *in vivo*. Introduit en 1950 pour mesurer initialement le volume total de GR circulants, le marquage au ^{51}Cr était devenu peu après la méthode la plus couramment utilisée pour déterminer la durée de vie des GR (Franco, 2009; Roussel 2018) et a été proposée comme méthode de référence, « *gold standard* », par le Comité International pour la Standardisation en Hématologie (ICSH) dans les années 1970 (*The International Committee for Standardization in Hematology, 1971*). Aujourd'hui, la méthode du ^{51}Cr est utilisée pour valider de nouvelles méthodes de mesure de la durée de vie des GR. Sous la forme de chromate de sodium ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) en solution, le chrome-51 est incubé *in vitro/ex-vivo* avec le culot de GR du donneur qui l'intègrent *via* les canaux ioniques à raison de 80% – 90%. À l'intérieur des GR, le ^{51}Cr se lie fermement mais de manière non covalente à l'hémoglobine et permet ainsi de les marquer. Les GR rendus alors radioactifs sont lavés dans une solution saline isotonique pour éliminer le ^{51}Cr non lié, puis remis en suspension dans le plasma, et enfin réinjectés en intraveineux au receveur ou au donneur s'il s'agit d'une réinfusions de GR autologues. Des prélèvements successifs suivis de comptage permettent de tracer la courbe de survie et de calculer la cinétique nécessaire à l'estimation de la durée de vie des GR. En plus de l'activité du ^{51}Cr mesurée dans un compteur automatique pour échantillons gamma, la teneur en Hb dans un hémolysât de GR est évaluée à chaque prélèvement. Les comptages observés du chrome-51 (comptages/g Hb) sont exprimés en pourcentage. La **figure 17** montre une comparaison entre les courbes de durée de vie des GR frais (panel de gauche) et des GR congelés pendant 15 jours dans l'acide-citrate de dextrose (panel de droite) obtenues avec la méthode d'Ashby et la méthode du ^{51}Cr appliquée pour la première fois ((Ebaugh et al. 1953; Garby and Mollison, 1971). Le taux faible de GR récupérés après 24h de la réinfusion, (*24-hr recovery* en anglais), observé dans le cas des GR congelés n'est pas lié à l'efficacité du marquage qui est d'ailleurs identique aux deux états des GR (frais et congelés) mais illustre plutôt l'effet des lésions au niveau des GR associées à la congélation ou à la conservation

(Ebaugh et al., 1953). La méthode du chrome-51 a plusieurs avantages qui ont permis qu'elle reste la norme pour la mesure de la durée de vie des GR au cours de ces 50 dernières années.

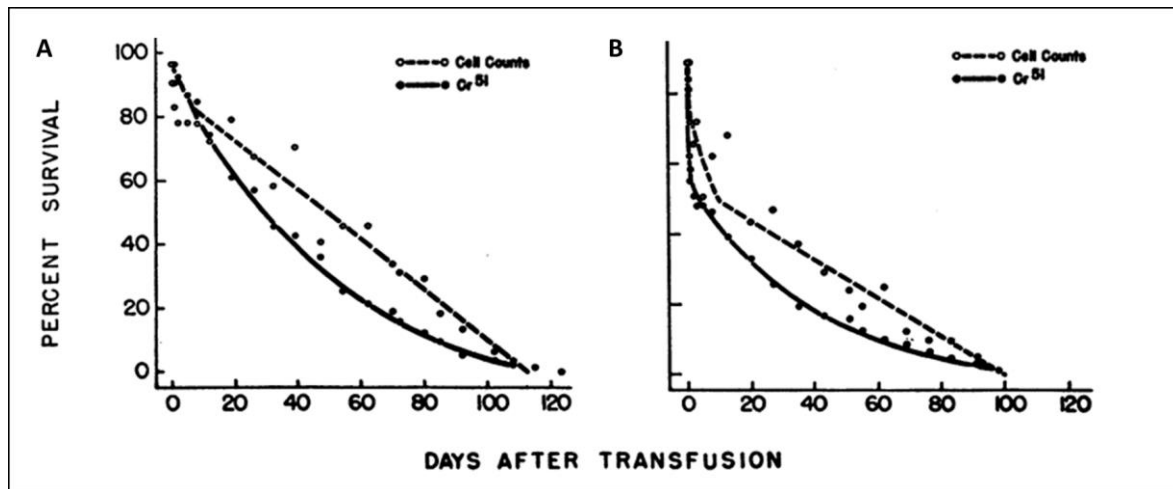


Figure 17. Durée de vie des globules rouges déterminée par la méthode d'agglutination différentielle et la méthode du chrome-51 dans le sang frais (A) et le sang congelé dans l'acide-citrate de dextrose pendant 15 jours (B) (Ebaugh et al. 1953).

En la comparant à la technique de Winifred Ashby, la méthode du ^{51}Cr est plus facile et simple d'application puisqu'elle nécessite moins de volume d'échantillon sanguin et moins de manipulation de cellules avec la capacité d'étudier les GR autologues. En outre, comme le marquage au ^{51}Cr a été standardisé par l'ICSH, ses formulations approuvées ainsi que les compteurs nécessaires à la quantification de la radioactivité de l'isotope sont largement disponibles (Ebaugh et al., 1953; Franco, 2009; Franco, 2012; Roussel 2018). Cependant, la méthode du chrome-51 présente aussi de nombreuses limites. L'inconvénient principal est la radioactivité de l'isotope utilisé dans cette méthode de marquage qui entrave notamment son application chez les populations vulnérables comme les nouveau-nés, les enfants et les femmes enceintes (Franco 2012). Le second problème rencontré avec cette méthode réside dans l'éluion du ^{51}Cr des GR intacts en circulation avant leur destruction. Ce processus d'éluion peut être divisé en deux étapes : une perte précoce qui a lieu surtout au cours des premières 24h et une perte régulière ultérieure qui se produit à un taux d'environ 1% par jour mais qui, selon certains travaux de recherche, varie considérablement d'un patient à l'autre (Bentley et al. 1974). En effet, les travaux de Cline et Berlin sur une cohorte d'individus incluant des sujets sains et des patients manifestant une maladie hémolytique ont montré un taux d'éluion du ^{51}Cr plus important que celui rapporté par d'autres études, avec des extrêmes allant de 0,62% à 2,27% par jour. Ce taux a tendance à être plus élevé chez les patients atteints d'une maladie hémolytique (1,00 - 1,51% par jour) que chez les individus sains (0,57-1,51% par jour) (Cline and Berlin, 1963). Cette variabilité importante du taux d'éluion de l'isotope, selon certains auteurs, tire son origine du protocole de la technique de marquage lui-même qui était

appliqué de manière différente d'un laboratoire à un autre surtout lorsque la méthode n'était pas encore standardisée. En plus de l'inconvénient de l'élyution, le chrome-51 est caractérisé par une autre limite liée à sa demi-vie qui est estimée à seulement 27,8 jours, ce qui rend le marquage adapté uniquement pour une analyse de survie des GR à 30 jours. Pour remédier à tous ces inconvénients, des tables standards pour la correction de l'élyution jusqu'à 30 jours ont été élaborées, néanmoins le taux d'élyution entre les individus et les différentes sous-populations de GR reste considérablement variable (Garby and Mollison 1971; Franco, 2012). La combinaison de l'élyution et de la désintégration de l'isotope rend le suivi de la durée de vie des GR marqués par le ^{51}Cr difficile et peu précis, d'où l'importance de développer d'autres méthodes de mesure plus fiables et sans risque (Franco, 2012).

Méthode de la biotine. La méthode à la biotine est une méthode relativement récente de marquage non isotopique et une alternative à la méthode du chrome-51 radioactif. Elle a été initialement développée par Dale et ses collaborateurs en 1987 pour étudier le vieillissement des GR chez le lapin (Figure 18). Plus tard, d'autres chercheurs l'ont utilisée pour déterminer le volume total des GR circulants et la durée de vie des GR chez l'animal et chez l'Homme (Suzuki and Dale 1987).

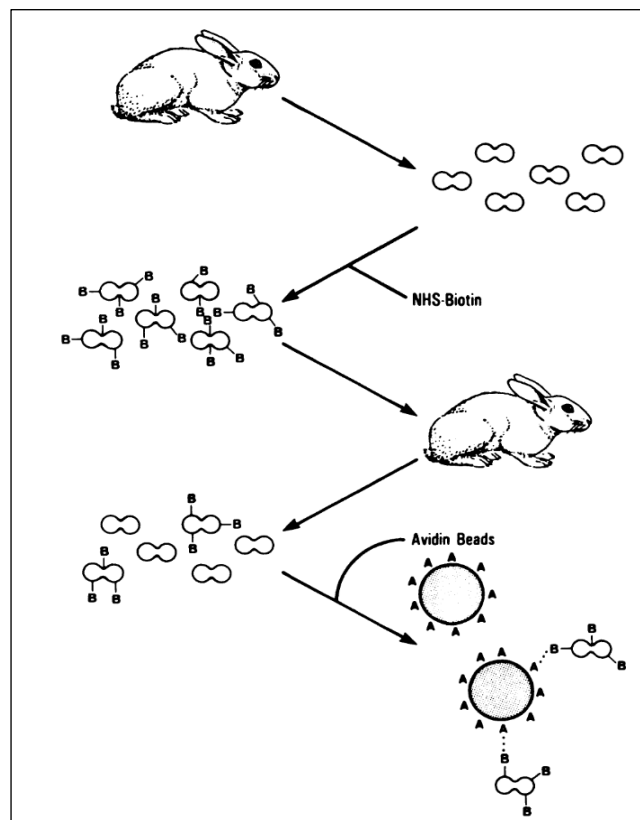


Figure 18. Schéma global du marquage avec la biotine et de la récupération des globules rouges marqués chez le lapin (Suzuki and Dale 1987).

Les GR ont été biotinylés (B) par réaction avec NHS-biotine, et sélectivement récupérés par fixation à des billes de polystyrène recouvertes d'avidine (A).

Le protocole de biotinylation consiste de manière générale à incuber *ex-vivo* des GR bien lavés et mis en suspension à 25% d'hématocrite avec le marqueur de biotinylation, la biotine, sous sa forme N-hydroxysuccinimido-biotin (NHS-biotine) liposoluble nécessitant un solvant organique ou sa forme hydrosoluble sulfo-NHS-biotine qui est actuellement utilisée dans les études menées chez l'Homme à une concentration typique de 18 µg/ml de GR. Les protéines transmembranaires sont marquées avec de la biotine *via* une liaison covalente formée entre le groupement carboxyle de la biotine et les résidus lysine des protéines membranaires. Chez l'animal, tous les GR circulants peuvent être marqués par administration intraveineuse du marqueur. Une fois les GR-biotinylés préparés, ils sont réinfusés chez le donneur (GR autologues) ou le receveur (GR homologues) et des échantillons de sang sont prélevés à des intervalles de temps successifs (Franco 2009; Mock et al., 2014). Dans la méthode originale de Dale et ses collègues, l'étape de la récupération des GR marqués qui précède la quantification, a été effectuée à l'aide de billes de polystyrènes enrobées d'avidine-biotine-gélatine. La procédure de séparation basée sur ces billes a entraîné une faible récupération de GR biotinylés (29,0 - 32,4%), cependant la population de GR récupérés était principalement des GR biotine-positifs (86,2 - 91,1%) (Suzuki and Dale 1987; Russo et al. 1992). Pour mieux identifier les GR individuels des échantillons de sang en post-perfusion au cours de leur durée de vie, Russo et ses collaborateurs ont mis en place deux méthodes analytiques. La première consiste à incuber les GR post-perfusés avec la streptavidine conjuguée à un fluorochrome qui permet de quantifier les GR biotinylés par cytométrie en flux. Cette option associée à l'utilisation de la cytométrie de flux ne permet pas seulement la détermination de la durée de vie, mais elle donne aussi la possibilité de suivre *in vivo* les changements âge-dépendants de plusieurs propriétés cellulaires pendant le processus de vieillissement des GR (**Figure 19A**). Cette première approche analytique a permis aux auteurs d'obtenir pour la première fois la courbe de survie biphasique entière chez le lapin (**Figure 19B**). La seconde méthode que les auteurs de l'étude ont élaborée pour récupérer les GR biotinylés est de mélanger les prélèvements sanguins post-perfusés avec de la streptavidine conjuguée cette fois-ci à des billes magnétiques, ce qui permet de récupérer des GR avec une tranche d'âge connue pour l'analyse (**Figure 19C**) (Russo et al., 1992; Cohen et al., 2008; Mock et al., 2014).

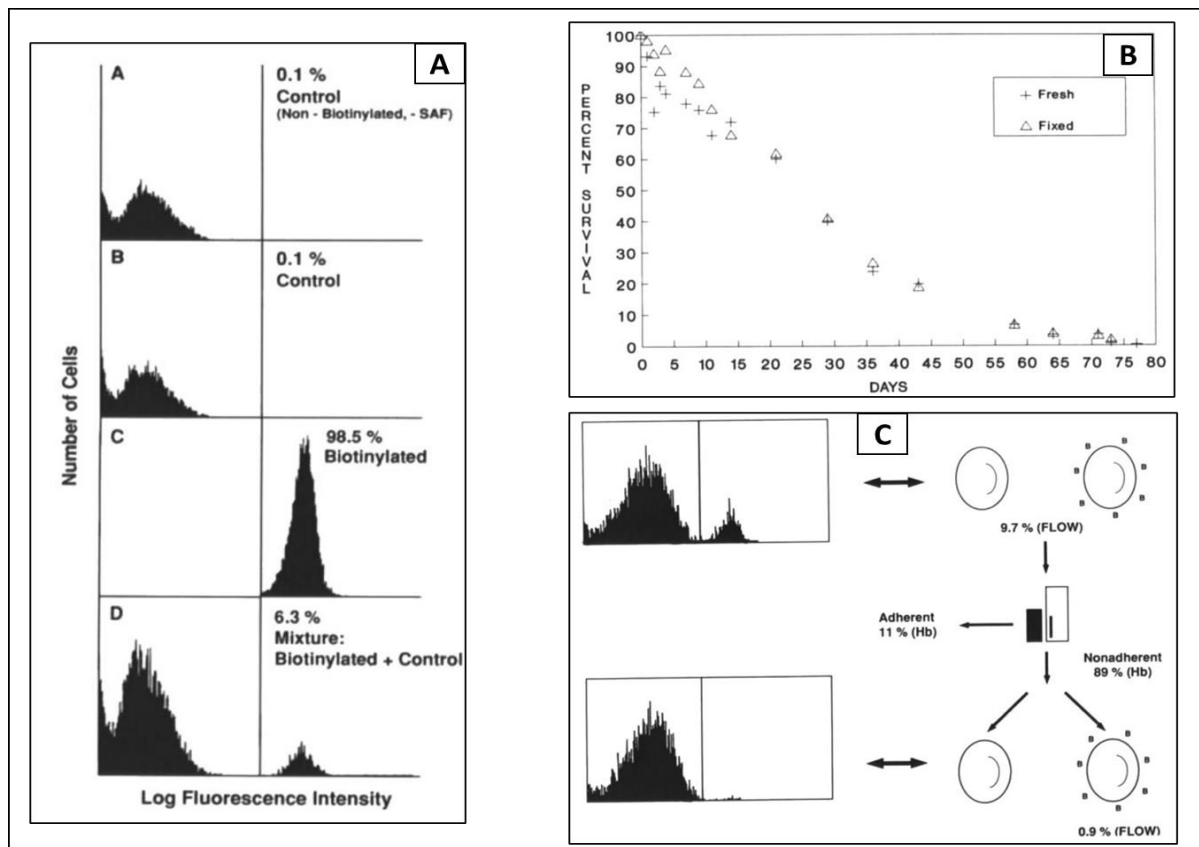


Figure 19. Méthode d'analyse des globules rouges marqués à la biotine (Russo et al., 1992).

Figure (A) L'analyse des globules rouges par cytométrie en flux. (a) Le contrôle contenant des GR non biotinylés sans SAF (streptavidine-FITC), (b) Le contrôle contenant des GR non biotinylés avec SAF, (c) Les GR biotinylés + SAF, (d) Un mélange entre GR et les GR biotinylés + SAF. Le curseur a été placé au point médian entre les pics dans le mélange et était dans la même position pour tous les échantillons. Le pourcentage de GR biotinylés à droite du curseur est affiché. L'abscisse est une échelle logarithmique de trois décades.

Figure (B) Courbe de la durée de vie biphasique des GR du lapin mesurée avec de la biotine.
Figure (C) Récupération des GR biotinylés. Un mélange contenant 9,7% des GR biotinylés (panel supérieur) a été préparé. Après la fixation à des billes magnétiques, les GR adhérents ont été isolés et contenaient 11% d'Hb totale. Les GR non adhérents contenaient peu de GR biotinopositifs (moins de 1%, panel du bas).

Comparée à la méthode de référence, le ^{51}Cr , la biotinylation a montré des résultats de mesure de la durée de vie des GR équivalents (**Figure 20**) (Mock et al., 1999). Néanmoins, le marquage à la biotine présente un certain nombre d'avantages par rapport au ^{51}Cr .

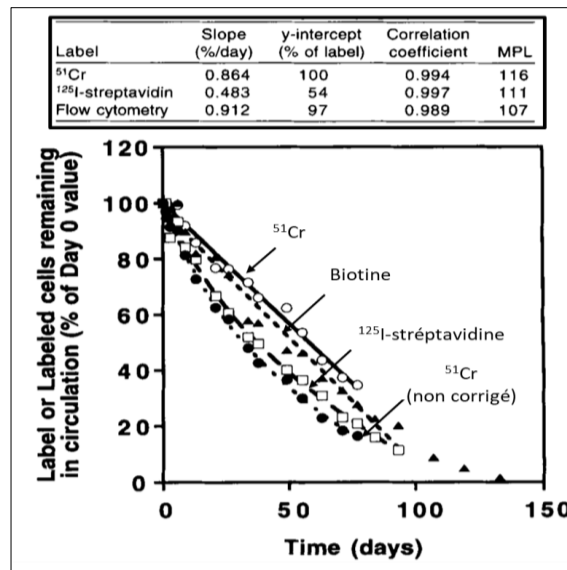


Figure 20. Courbes représentatives de la durée de vie mesurée par trois méthodes différentes chez un sujet sain (voir les équations de régression dans la petite table) (selon Mock et al. 1999).

^{51}Cr et ^{51}Cr (non corrigé) : méthode du chrome-51 corrigé et non corrigé pour son élution et sa désintégration respectivement, Biotine : méthode de la biotine combinée à la cytométrie en flux, et ^{125}I - streptavidine : méthode de quantification indirecte des GR biotinylés par liaison saturante avec la streptavidine liée à l'isotope ^{125}I . Abrév. MPL= *mean potential RBC life span*.

Contrairement au ^{51}Cr et aux autres méthodes de marquages radioactifs, la biotinylation ne pose aucun risque de radiation, ce qui la rend plus acceptable dans les études incluant les populations vulnérables (femmes enceintes, fœtus, enfants) et dans les pays qui excluent l'utilisation de tous les isotopes radioactifs (plusieurs pays de l'Europe de l'Ouest). Comme la biotine forme une liaison covalente avec les protéines de la membrane (et probablement aussi avec les protéines cytosoliques), le risque d'élution est presque négligeable. Même lorsqu'une certaine perte de biotine se produit, éventuellement en raison de l'activité de la biotinidase plasmatique, les GR légèrement débiotinylés tombent toujours dans la région (ou la « gate ») d'analyse définie positive en cytométrie de flux et sont comptés de la même manière que s'il n'y avait pas de perte. Cela signifie que contrairement au ^{51}Cr radioactif, le marquage à la biotine rend possible le suivi précis et complet de la durée de vie des GR. Un autre avantage vient de s'ajouter à la méthode de la biotine. Grâce à plusieurs biotines de différentes densités, il est devenu possible de suivre simultanément jusqu'à quatre populations de GR (cinq populations au total en comptant les GR non marqués) dans la même étude (Figure 21A et figure 21B) permettant un énorme gain de temps. Cependant, malgré tout ce panel d'avantages, le marquage à la biotine présente néanmoins quelques inconvénients par rapport au chrome-51 et aux autres radioisotopes. En effet, la procédure de biotinylation nécessite plus de manipulation des GR avec de multiples lavages qui ont pour but d'éliminer la biotine non liée et d'éviter les sous-produits de la réaction. Ces étapes de lavage pourraient

entraîner de l'hémolyse ou l'élimination d'une population de GR située dans la partie supérieure de la colonne, ce qui pourrait changer la distribution d'âge et l'allure de la courbe de survie des GR étudiés. La limite majeure pour l'utilisation de la biotine notamment chez l'Homme est le risque de développer une réponse immunitaire et des anticorps contre les GR biotinylés. Effectivement, la procédure de biotinylation pourrait induire des modifications irréversibles non seulement au niveau des résidus lysine mais également au niveau de plusieurs autres acides aminés qui composent les protéines transmembranaires, ce qui expliquerait l'immunogénicité des GR biotinylés (Franco, 2009; Franco, 2012; Mock et al., 2014; Roussel, 2018). Dans les travaux de recherche de Cordle et ses collaborateurs, il a été mis en évidence la détection par la technique d'agglutination d'anticorps de type IgG transitoires dans 3 sur 20 sujets normaux qui ont reçu des GR biotinylés. Cependant, il ne semble pas que ces anticorps aient un effet sur la durée de vie des GR et aucun n'a pu être détecté un an après la perfusion (Cordle et al. 1999).

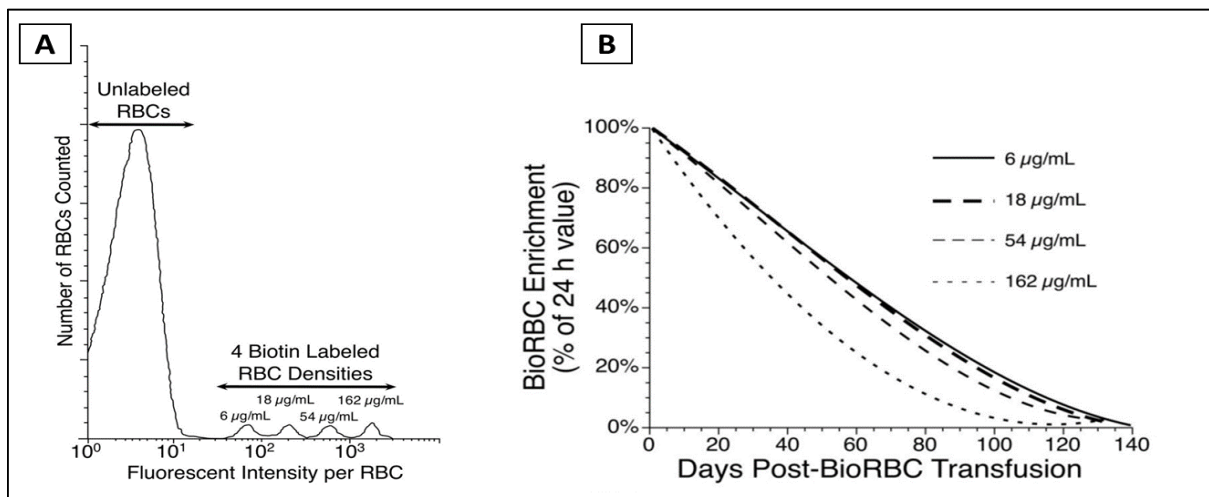


Figure 21. Marquage des globules rouges à plusieurs biotines de différentes densités.

(A) Histogramme représentatif des GR biotinylés à plusieurs densités en cytométrie (Mock et al., 2014). Dans l'histogramme présentant le nombre de GR en fonction de l'intensité de la fluorescence par GR, cinq populations de GR (quatre biotinylées et une non marquée) sont observées dans un échantillon de sang veineux après perfusion d'un mélange de GR biotinylés marqués individuellement à 4 densités de biotine différentes. (B) Comparaison des durées de vie moyennes pour les globules rouges autologues de huit adultes normaux marqués simultanément avec quatre densités croissantes d'un facteur de 3 (Mock et al., 2014). La durée de vie des GR post-perfusés diminue avec l'augmentation des densités des GR biotinylés. Les deux densités les plus élevées ont une réduction significative de la durée de vie.

5.2. Méthodes de marquage de cohorte de GR

Un autre type d'étude de la durée de vie des globules rouges utilise une cohorte de GR d'âge synchronisé libérée à partir de la moelle osseuse durant une courte période de temps bien définie. Une des approches de ce type de méthodes de marquage consiste dans un premier temps à administrer *in vivo* un marqueur qui peut être un isotope radioactif ou stable, tel que

la glycine ^{13}C , glycine ^{14}C , glycine ^{15}N , glycine ^3H ou le fer radioactif (^{59}Fe), capable de s'intégrer dans la biosynthèse ou le métabolisme d'un ou de plusieurs composants du GR (généralement hémoglobine) lors de sa production au niveau de la moelle osseuse. Cette étape génère un ensemble de GR marqués ayant à peu près tous le même âge, et est suivie par la détermination quantitative de la persistance du marquage dans les GR circulants (Berlin, 1964; Cohen et al., 2008; Franco, 2012; Mock et al., 2014). En principe, les précurseurs des GR sont marqués par impulsion puisque la quantité de l'isotope disponible pour la synthèse de l'hémoglobine diminue rapidement. La courbe montrée dans la [figure 22](#) illustre la teneur en marqueur par gramme d'Hb dans une cohorte de GR marqués. La teneur en isotope augmente dans le sang une fois que les premiers précurseurs de GR marqués rejoignent la circulation périphérique et elle atteint le maximum lorsque tous les précurseurs de GR qui ont intégré l'isotope passent de la moelle osseuse à la circulation sanguine et qu'il n'y a plus d'isotope disponible pour la synthèse de l'Hb marquée. Quand les GR de la cohorte atteignent la fin de leur durée de vie, la teneur en isotope dans le sang diminue, et la valeur résiduelle dépend du recyclage de l'isotope pour la synthèse des composants du GR (Berlin 1964). Le temps qui sépare les phases d'augmentation rapide et de diminution rapide est considéré comme un indice de la durée de vie moyenne des GR (Zhang et al., 2018). Dans les études de cohorte, il est possible de suivre et d'analyser les différentes étapes de la durée de vie des GR, de la libération de la moelle osseuse durant une période qui reflète la cinétique de la différenciation des erythroblastes, passant par une longue période de plateau où le marqueur se trouve dans les GR matures circulants, à la courte période de l'élimination des GR responsable de la variabilité de la durée de vie des GR. Les études de cohorte ont également l'avantage d'inclure dans l'analyse tous les GR qui sortent de la moelle osseuse, ce qui n'est pas le cas dans les études de population où les GR à courte durée de vie sont sous-représentés (Franco 2012).

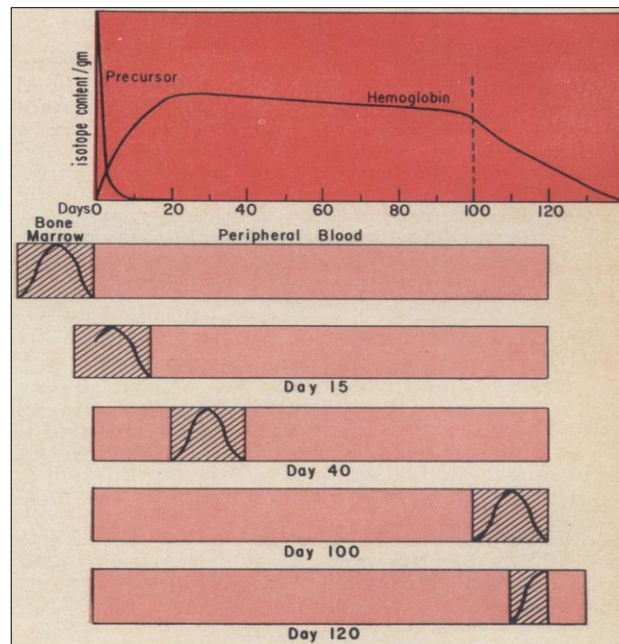


Figure 22. Marquage d'une cohorte de globules rouges (Berlin 1964).

La zone ombrée représente la cohorte de GR marqués. Le rectangle peut être considéré comme un cylindre avec une cohorte représentée comme un piston. La courbe en forme de cloche sur la zone ombrée représente la distribution de l'isotope dans les GR marqués. À noter que le terme « précurseur » correspond à l'isotope utilisé.

En plus des méthodes utilisant un précurseur métabolique, la durée de vie d'une cohorte de GR peut être également mesurée par une autre approche basée plutôt sur le suivi de la formation d'un produit du catabolisme de l'un des constituants du GR tel que la production du monoxyde de carbone (CO) reflétant le turnover des GR. Les deux approches sont détaillées ci-dessous.

Méthodes basées sur l'utilisation d'un précurseur métabolique. Deux types de méthodes sont distinguées : méthodes basées sur l'utilisation d'un isotopes radioactif tel que le fer-59 (^{59}Fe) ou la glycine marquée au carbone-14 (^{14}C -glycine) et des méthodes qui utilisent un isotope stable non radioactif comme la glycine marquée à l'azote-15 (^{15}N -glycine).

i) Méthode basée sur l'utilisation d'un isotope radioactif : le ^{59}Fe . Pour contourner les inconvénients d'éluion et de désintégration liés à la méthode du chrome-51, des approches alternatives qui consistent à utiliser des marqueurs radioactifs, capables de s'incorporer physiologiquement dans le GR sans qu'ils soient élués, ont été développées. Le fer-59 ou le fer radioactif injecté par voie intraveineuse lié à la transferrine est rapidement intégré dans les précurseurs des GR dans la moelle osseuse et y reste tout au long de leur vie jusqu'à leur destruction. Avec cette méthode, la durée de vie des GR mesurée directement via l'activité du ^{59}Fe est valable seulement durant les premiers 10-14 jours qui suivent le marquage. Après cette période, la durée de vie des GR peut être seulement déduite du taux de production des

GR qui est calculé soit à partir de la clairance plasmatique du fer radioactif soit de l'absorption du ^{59}Fe (Ricketts et al., 1977). L'impossibilité de suivre l'activité du ^{59}Fe jusqu'à la disparition des GR marquées est dû au fait que l'isotope radioactif libéré des GR éliminés est presque entièrement réutilisé par les nouveaux GR. Chez les sujets normaux, les résultats de la mesure de la durée de vie des GR obtenus jusqu'à 14 jours après le marquage au fer radioactif corrèlent significativement avec les résultats du chrome-51. Cependant, au-delà des premiers 14 jours suivant l'injection de l'isotope, une certaine discordance entre les deux méthodes est constatée. Cette discordance est amplifiée lorsque le reflux du ^{59}Fe dans le plasma est augmenté au-dessus des valeurs normales. L'augmentation de la concentration plasmatique du ^{59}Fe peut être le résultat d'une érythropoïèse inefficace. En effet, chez les patients atteints d'anémie mégaloblastique avec une érythropoïèse inefficace importante, la durée de vie des GR mesurée avec la méthode du fer radioactif peut atteindre 192 jours (Ashby 1948; Ricketts et al., 1977).

ii) Méthode basée sur l'utilisation d'un isotope non radioactif : la ^{15}N -glycine. En 1946, Shemin et Rittenberg ont introduit l'isotope stable ^{15}N dans plusieurs composés (glycine, proline, acide glutamique, leucine et ammoniac) et ont montré que la glycine était le précurseur azoté de la protoporphyrine de l'hème dans l'hémoglobine chez le rat (Shemin and Rittenberg, 1946). À la suite de cette découverte, les mêmes auteurs ont procédé à l'administration de la glycine marquée avec l'azote-15 à l'Homme et à l'étude de la forme de la courbe de survie en suivant sur une longue période de temps le ratio $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ mesuré par la spectrométrie de masse en fonction de la quantité de GR marqués dans la circulation qui traduit l'apparition et la disparition du marqueur dans la circulation sanguine. Après administration orale de la ^{15}N -glycine, la concentration du marqueur de l'hème dans le sang augmente rapidement jusqu'à atteindre sa valeur maximale après 20-25 jours (**Figure 23, courbe a**). Cette première étape est suivie par un plateau ou une période légèrement décroissante maintenue pendant de nombreuses semaines, de 20-25 jours à environ 100 jours. La troisième partie de la courbe montre une diminution rapide de la concentration de l'isotope suivie par une période lentement décroissante après 150 jours. Contrairement au fer radioactif, la forme de la courbe de la glycine marquée au ^{15}N montre que l'hème n'est pas réutilisé par les nouveaux globules rouges (Shemin and Rittenberg 1946). Bien qu'elle ait été développée dans les années 1940, la méthode de la glycine pour la mesure de la durée de vie des GR n'a pas été fréquemment utilisée, au contraire, elle a été largement remplacée par le ^{51}Cr tout au long des années 1970 à cause du coût élevé à l'époque de l'isotope stable et de la spectrométrie de masse utilisée pour détecter l'azote-15 et quantifier l'hème $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. La méthode de la glycine présente plusieurs avantages tels que i) l'administration de l'isotope par voie orale, ii) l'absence de radioactivité ou d'allergie et la possibilité de l'utiliser chez les nouveau-nés, les enfants et les femmes enceintes, iii) l'absence de manipulation de GR ex vivo qui réduit les possibilités

d'erreur dans l'identification du matériel à réinjecter et le risque de contamination bactérienne, iv) l'absence du phénomène d'élution et la possibilité de mesurer la durée de vie entière. Tous ces attributs cités ci-dessus rendent la méthode de la glycine adaptée au moins à la recherche clinique de manière générale et à l'étude et l'évaluation de la durée de vie des GR en clinique (Khera et al. 2015).

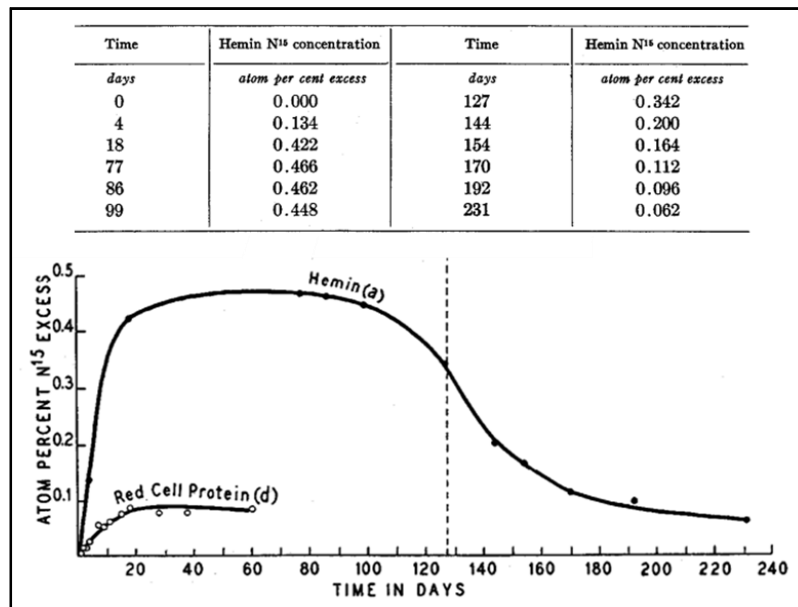


Figure 23. Concentration de l'azote-15 dans l'hème après l'administration de la glycine marquée au 15N pendant 3 jours (Shemin and Rittenberg 1946).

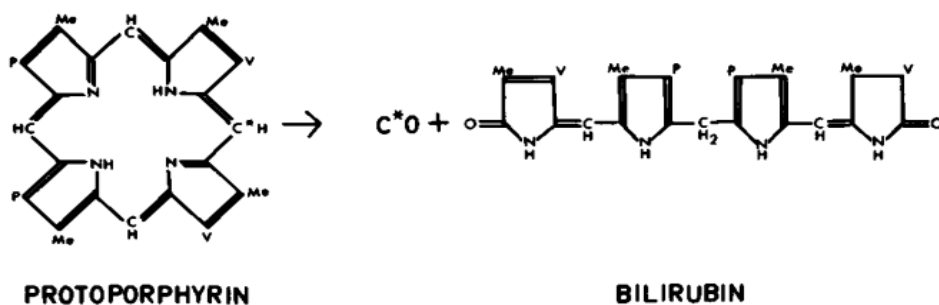
La petite table au-dessus du graphe comporte les valeurs des concentrations de l'azote-15 en fonction du temps de l'expérience.

Deux inconvénients majeurs caractérisent la méthode à la glycine. Dans les travaux de recherche réalisés par le groupe Cohen. (2015), la courbe de la glycine marquée avec l'azote-15 pour la mesure de la durée de vie des GR a été reproduite et les résultats obtenus ont montré que la concentration de l'isotope ne revient pas complètement au niveau basal, mais atteint plutôt un niveau résiduel presque stable de valeur comprise entre 15 et 25% environ. Ceci montre que le marqueur n'est pas exclusivement limité à l'hème de l'hémoglobine et que ce pourcentage du marquage résiduel est éventuellement dû au recyclage de l'isotope stable en hème dans les globules rouges qui ne faisaient pas partie de la cohorte d'âge d'origine. Plusieurs origines de ce marquage résiduel sont possibles, mais la plus probable est celle de l'incorporation du marqueur dans des protéines érythrocytaires dont le renouvellement est relativement rapide (Figure 23, courbe d). Des corrections et des normalisations qui prennent en compte le marquage résiduel doivent s'effectuer lors de l'analyse (Franco, 2009; Franco, 2012; Khera et al., 2015). La méthode de marquage à la glycine a également une autre limite liée à la fois aux multiples prélèvements sanguins effectués sur une longue période de temps de 4 à 6 mois et au coût de la spectrométrie de masse qui reste toujours relativement élevé.

Une solution pour ce dernier point pourrait être apportée prochainement avec l'apparition des laboratoires commerciaux prestataires de service pour les analyses chimiques par spectrométrie de masse qui prennent en charge les échantillons sanguins dès leur collecte (traitement, congélation, extraction chimique de l'hème marqué et sa quantification en spectrométrie de masse, présentation des résultats) (Khera et al. 2015).

Méthode basée sur l'utilisation d'un produit.

i) Méthode de la mesure de la production de monoxyde de carbone. Après l'observation originale faite par Sjostrand selon laquelle le pourcentage de saturation en carboxyhémoglobine dans le sang est élevé chez les patients atteints d'anémie hémolytique, plusieurs études utilisant le carbone radioactif ^{14}C pour marquer l'hémoglobine des globules rouges ont été effectuées chez l'animal et l'Homme. L'administration d'un précurseur marqué de l'hème (^{14}C -glycine) chez l'Homme a entraîné la production du monoxyde de carbone marqué (^{14}CO) lors de la destruction des GR qui ont incorporé le marqueur dans l'Hb. Les résultats de cette étude et d'autres ont conduit à la détermination de l'origine du CO contenu dans le sang. L'atome de carbone dans le CO endogène provient de l'atome de carbone alpha-méthène des cycles de la protoporphyrine de l'hème pendant le catabolisme de l'Hb. D'autres travaux de recherche ont montré que le CO endogène provient presque exclusivement de l'hème et qu'une mole de CO est produite lors du catabolisme d'une mole d'hème comme indiqué dans le schéma ci-dessous (Coburn, 1970).



Cependant, des études supplémentaires réalisées avec différents isotopes ont montré que 20 à 25% du CO endogène sont produits à partir d'une autre source d'hème que l'Hb, comme la catalase, la tryptophane pyrrolase, la myoglobine, le cytochrome P-450 et probablement le cytochrome B5 (Gartner and Arias, 1969). Étant donné que la majeure partie du CO provient du catabolisme de l'hème lors de la destruction des GR et que tout le CO libéré par ce processus est éjecté par les poumons, la concentration de CO respiratoire attribuable à cette production endogène mesurant le taux de renouvellement ou du *turnover* de l'Hb a été utilisée comme un indicateur quantitatif de la durée de vie des GR (Mitlyng et al., 2006). Deux

protocoles ont été élaborés pour pouvoir mesurer avec précision le CO endogène expiré tout en excluant le monoxyde de carbone qui provient de l'environnement (CO exogène). La première méthode de mesure du CO endogène a été conçue par Coburn et ses collaborateurs en 1966 en faisant réinspirer les sujets dans un système fermé (*rebreathing system* en anglais) pendant plusieurs heures (~ 12h) jusqu'à ce qu'une augmentation constante du CO soit observée. La complexité de cette technique a limité son application en clinique, cependant son principe n'a pas été définitivement abandonné puisqu'en 1992, l'équipe de recherche de Levitt a développé un test respiratoire au CO après amélioration et simplification de la méthode de Coburn (Furne et al., 2003). Le principe du test respiratoire au CO mesure la concentration de CO endogène dans l'air alvéolaire et calcule la quantité d'exhalation de CO par unité de temps en fonction du volume de ventilation alvéolaire qui est ensuite utilisé pour calculer la quantité de dégradation de l'hémoglobine par unité de temps. À partir de ce taux, le temps nécessaire à la dégradation complète de l'hémoglobine sanguine totale (ou la durée de vie estimée des GR) peut alors être calculé (Ye et al. 2021). Ci-dessous la formule simplifiée de Levitt en estimant à 70% le CO endogène dérivé du *turnover* de l'hémoglobine. Cette formule permet une détermination facile et rapide de la concentration du CO expiré et la durée de vie des GR en seulement 15 min (Zhang et al., 2018).

$$\text{RBC}_{\text{span}} = \frac{[\text{Hb}] \times 1380}{\text{endoPco}}.$$

La méthode de la mesure du CO alvéolaire terminal a montré une corrélation avec les valeurs de la durée de vie des GR obtenues avec la méthode standard, le chrome-51 (Mittlyng et al. 2006) et a fourni une discrimination claire et fiable entre la durée de vie normale des GR de sujets sains et la durée de vie réduite des GR de patients atteints d'anémie hémolytique (**Figure 24**) (Zhang et al., 2018).

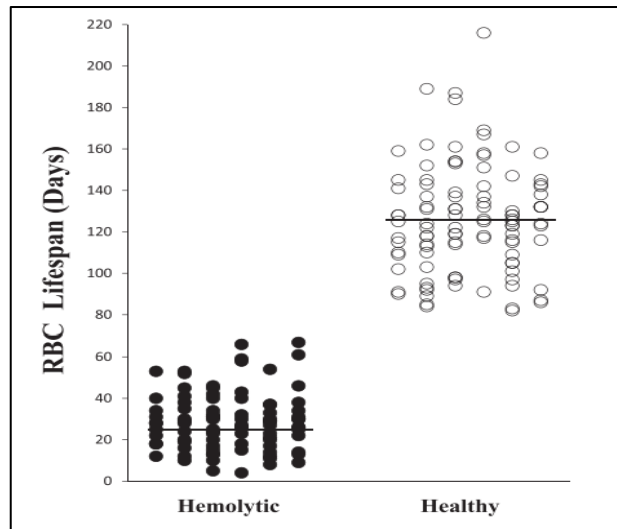


Figure 24. Données sur la durée de vie des globules rouges en nuage de point (Zhang et al. 2018).

Les durées de vie des GR observées chez 104 sujets sains (cercles vides) étaient systématiquement supérieures à celles observées chez 91 patients atteints d'anémie hémolytique chronique (cercles pleins).

Après 30 ans d'améliorations et de simplifications, l'équipe de Levitt a réussi récemment à mettre en place un système entièrement automatisé de leur test respiratoire au CO (Figure 25) manipulable après une formation rapide. La dernière version améliorée de l'automate utilise la spectroscopie Infra-Rouge (IR) non dispersive comme technique de détection qui pourrait être particulièrement utile en milieu clinique pour la détermination de la durée de vie des GR (Ye et al. 2021).

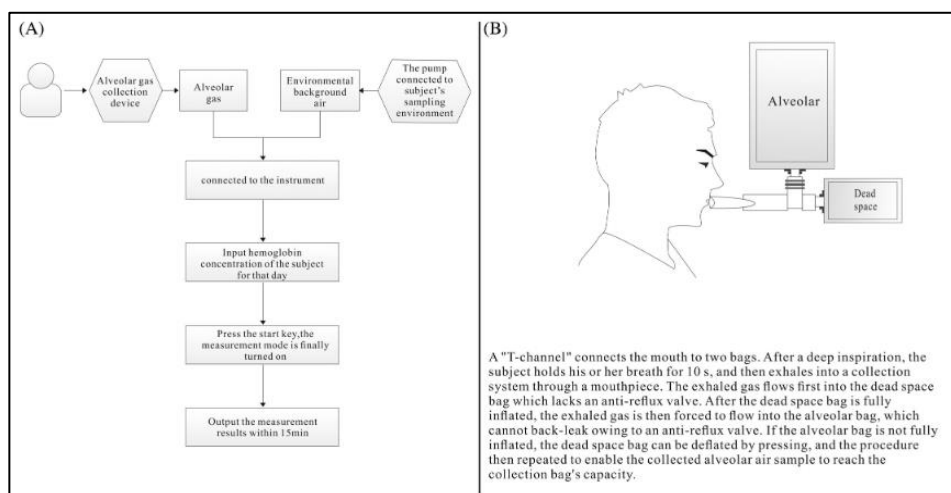


Figure 25. Système automatisé du test respiratoire au CO mis en place par l'équipe de Levitt (Ye et al. 2021).

(A) Organigramme du test respiratoire au CO de Levitt et (B) schéma du dispositif de collecte du gaz alvéolaire.

Contrairement aux autres méthodes, la technique du monoxyde de carbone est non invasive, simple d'application ne nécessitant pas de manipulation ni de marquage *in vivo* ou *ex vivo* des GR et fournit des mesures en temps quasi-réel du taux de destruction des GR. Son avantage principal réside dans la possibilité de l'utiliser même dans des conditions où le volume total des GR circulants ou le nombre total des GR dans le sang n'est pas stable (en dehors du *steady-state*). En effet, le test de Levitt au CO reste pour le moment la seule méthode capable d'estimer les fluctuations à court-terme du taux de destruction des GR. Malgré les différentes modifications et améliorations apportées au fil des années, la méthode au CO présente encore quelques limites : i) une large différence entre la valeur calculée du CO endogène et la valeur réelle après exposition à l'air pollué, ii) une sous-estimation de la durée de vie mesurée après un exercice physique intense ou chez les sujets fumeurs ou les sujets présentant un dysfonctionnement cardiopulmonaire sévère, une atteinte musculaire, une érythropoïèse inefficace importante (Mitlyng et al. 2006; Zhang et al. 2018; Ye et al. 2021).

6. Variabilité inter-individuelle de la durée de vie des globules rouges

La mesure de la durée de vie des globules rouges chez les sujets sains avec la méthode de référence, le ^{51}Cr , a montré une large variabilité interindividuelle attribuée au moins au taux d'éluion considérablement variable entre les individus et les différentes sous-populations de GR. Cependant, les résultats obtenus avec les autres techniques utilisant la biotine non isotopique, le fer radioactif, la ^{15}N -glycine stable ou la production de CO ont également révélé une variabilité inter individuelle de la durée de vie des GR de personnes normales (**Tableau 3**). De manière générale, le taux de cette variabilité est estimé à 10 % - 20 % pour toutes les méthodes (Franco, 2009; Mock et al., 2014)

Tableau 3. Valeurs de la durée de vie des globules rouges rapportées par la littérature pour des sujets sains (Zhang et al. 2018).

Study [reference]	N	RBC lifespan, days			Method
		Range	Mean	SD	
Ashby, 1921 [2]	1	110	110	—	Ashby method ^a
Callender <i>et al</i> 1945 [3]	3	—	120	—	Ashby method ^a
Shemin and Rittenberg 1946 [5]	1	127	127	—	^{15}N -glycine label
Khera <i>et al</i> 2015 [6]	9	99–129	113	11	^{15}N -glycine label
Ebaugh <i>et al</i> 1953 [7]	9	94–115	—	—	^{51}Cr label ^a
Mollison and Garby 1971 [8]	22	—	115	—	^{51}Cr label
Bentley <i>et al</i> 1974 [9]	13	81–151	110	21	^{51}Cr label
Franco <i>et al</i> 1998 [10]	4	67–120	—	—	Biotin label
Cohen <i>et al</i> 2008 [11]	6	38.4–59.5 ^b	50.7	6.9	Biotin label
Mock <i>et al</i> 2011 [12]	8	70–140	115	8	Biotin label
Fume <i>et al</i> 2003 [21]	40	73–175	122	22	CO breath test
Present study	104	82–215	126	26	CO breath test

a Transfusion sanguine allogénique du groupe O.

b Durée de vie des GR exprimée en âge moyen des GR, soit environ la moitié de la durée vie.

—non rapporté

L'origine de cette variabilité peut-être de nature technique ou biologique. La variabilité expérimentale inclut les différences au niveau des méthodes, la variable utilisée pour exprimer la durée de vie, les modèles, les corrections, les normalisations appliquées pour analyser les données brutes mais aussi la taille de l'échantillon. À l'exception de la technique du CO, toutes les méthodes de marquage ne peuvent pas être réalisées sur de larges cohortes d'échantillons car elles sont considérées comme des techniques lourdes qui nécessitent beaucoup de temps, des semaines voire des mois (Franco, 2009; Zhang et al., 2018). La différence des résultats obtenus par les méthodes de mesure peut être expliquée également par un autre paramètre, très peu abordé dans la littérature, qui pourtant semble être d'une importance capitale. Il s'agit de la population de GR à très courte durée de vie ou l'inefficacité de l'érythropoïèse au niveau de la moelle osseuse qui n'est prise en compte que dans la méthode du CO. Dans les méthodes utilisant les marquages *ex vivo* ou *in vivo*, la population de GR à courte durée de vie n'est pas incluse dans le calcul de la durée de vie des GR. Les méthodes du ^{51}Cr et de la biotine ne sont pas influencées par l'érythropoïèse au niveau de la moelle osseuse (Zhang et al., 2018). La variabilité interindividuelle dans la durée de vie des GR peut être d'origine génétique ou épigénétique, résider au niveau des précurseurs érythroïdes ou émerger plus tard dans la circulation sanguine en contact avec les différentes variétés d'environnements, elle peut être également intrinsèque ou déclenchée par un style de vie ou des conditions environnementales ou dépendante de l'état de l'organisme (inflammation, infection, etc.) (Bogdanova et al., 2020). Pour évaluer la variation biologique, des mesures répétées de la durée de vie des GR chez le même individu sont nécessaires. Cela permettra de comparer les différences intra-individuelles aux différences inter-individuelles constatées à l'échelle de la population. Si les différences intra-sujets s'avéraient relativement faibles, alors la plupart des variations observées dans la table 2 seraient d'origine biologique. Il ne semble pas exister à l'heure actuelle des publications scientifiques fournissant des preuves directes de la stabilité de la mesure de la durée de vie des GR au fil du temps. Cependant, les travaux de Khera et ses collaborateurs. (2015) ont indirectement apporté une réponse à l'hypothèse émise ci-dessus. En effet, dans leur étude, les auteurs ont mis en évidence une corrélation entre les mesures appariées de la durée de vie moyenne des GR obtenues par la méthode de la biotine et la technique de l'isotope stable (^{15}N -glycine) à environ cinq ans d'intervalle montrant ainsi à la fois la comparabilité des deux méthodes de mesure et la stabilité de la durée de vie des GR dans le temps chez la même personne (Figure 26).

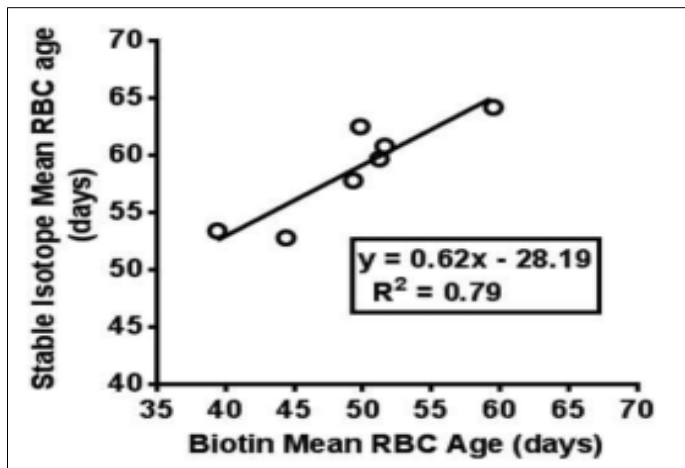


Figure 26. Forte corrélation entre les valeurs de la durée de vie moyenne des globules rouges déterminées par la biotine comparée à la méthode de l'isotope stable (Khera et al. 2015).

Les travaux de recherche de Ye et ses collègues. (2021) dont l'objectif était de comparer la fiabilité du test de Levitt au CO utilisant une spectroscopie IR non dispersive à la technique de marquage ^{15}N -glycine pour la détermination de la durée de vie des GR des sujets humains ont apporté des résultats complètement différents à ceux de Khera et al. (2015) en montrant qu'il existe non seulement une grande variabilité dans la durée de vie des GR entre les individus, mais également une grande variabilité intra-individuelle qui traduit des fluctuations du taux de destruction des GR chez les individus à différents moments ou à différents états de santé (Figure 27).

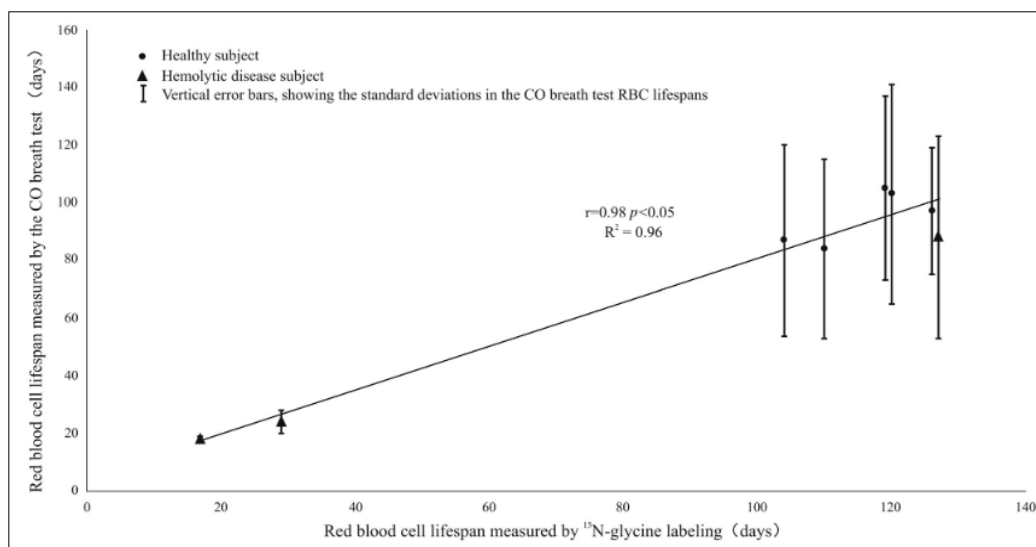


Figure 27. Régression linéaire de la durée de vie des globules rouges mesurée par la technique de marquage à la ^{15}N -glycine et le test respiratoire au CO ($R^2=0.96$) (Ye et al. 2021).

7. Méthodes de séparation des globules rouges en fonction de leur âge *in vitro* et chez l'animal

Les GR en circulation sont un mélange de cellules d'âges différents. Le besoin d'identifier et d'étudier de manière approfondie le développement des propriétés, caractéristiques ou marqueurs lié(e)s à l'âge et/ou à la sénescence ainsi que les mécanismes impliqués dans l'élimination et la clairance des globules rouges a conduit les chercheurs à la mise en place d'un certain nombre de méthodes et techniques, appliquées *in vitro* ou chez l'animal, qui permettent de séparer et d'isoler des populations de GR d'âges différents. Les principales approches utilisées sont présentées ci-dessous.

7.1. Méthodes de séparation des sous populations de GR d'âge progressif appliquées *in vitro*

La majorité de ces méthodes sont issues des expériences de marquage de cohortes de GR *in vivo* et exploitent les propriétés et les différences liées à l'âge définies par ces dernières.

i) Séparation des GR en fonction des différences de densité. Comme mentionné précédemment dans le chapitre traitant le cycle de vie des GR, la densité des GR augmente au cours du vieillissement. En effet, lors de l'étude des cellules marquées au fer radioactif, il a été constaté que la couche inférieure des cellules centrifugées (cellules à haute densité) contenait de manière prépondérante de vieux globules rouges, tandis que les jeunes globules rouges étaient concentrés dans la couche supérieure des cellules centrifugées (cellules à faible densité) (Shinozuka, 1994). Centrifuger le sang total dans une centrifugeuse simple avec un rotor pivotant n'est pas un moyen efficace pour fractionner les GR par densité. Ceci est expliqué par le fait que les GR denses se trouvant au haut du tube de centrifugation ne peuvent pas traverser la colonne de GR déjà densément sédimentés et tassés. Un meilleur rendement de fractionnement est obtenu par la centrifugation en gradient de densité à grande vitesse dans un rotor angulaire d'une ultracentrifugeuse (Salvo et al., 1982; Clark, 1988; Shinozuka, 1994). Il existe plusieurs types de matériaux tels que l'albumine de sérum bovin (BSA), la gomme d'acacia, les esters de phtalate, le Stractan (arabino-galactane), le Dextran, le Ficoll-Triosil qui peuvent être utilisés pour construire les gradients de densité, néanmoins, ces derniers présentent de nombreux inconvénients. Le développement du Percoll (particules de silice colloïdale recouvertes de polyvinylpyrrolidone), caractérisé par sa faible viscosité, sa faible pression osmotique et sa non-toxicité, a permis de surmonter ces problèmes. Ce matériau peut être facilement adapté aux conditions physiologiques (Salvo et al., 1982; Shinozuka, 1994).

ii) Séparation des GR en fonction des différences de volume globulaire moyen. Les altérations que subit le GR au cours de son vieillissement comme la perte de fragments de membrane et la déshydratation progressive entraînent son rétrécissement en fonction du temps passé dans la circulation. Les GR âgés sont donc plus petits que les GR jeunes. En se basant sur cette

caractéristique, les chercheurs ont développé une technique qui permet de séparer les GR d'âges différents principalement en fonction de leur volume/taille. Cette technique est connue sous le nom d'élutriation (counterflow centrifugation en anglais). Dans le processus d'élutriation (**Figure 28A**), la suspension de GR est placée dans un rotor ou une chambre de centrifugeuse spécialement conçu(e) et soumis(e) à un champ centrifuge (Dorin, 1994).

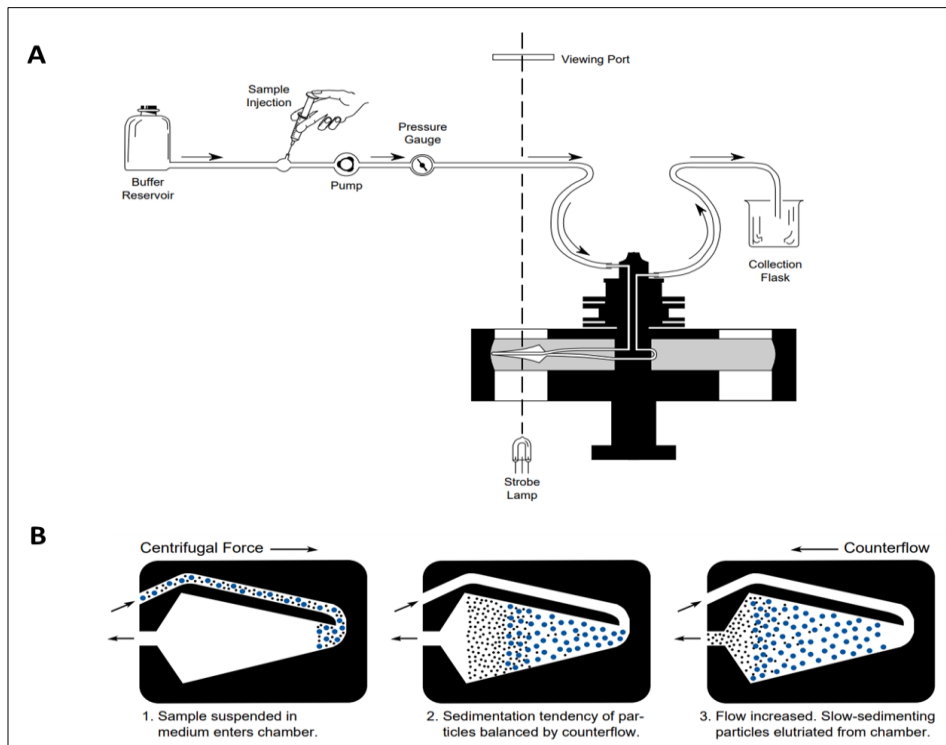


Figure 28. Processus d'élutriation (Dorin, 1994)

(A) Eléments essentiels d'un système d'élutriation (Elutriateur Backman modèle JE-6B) et (B) représentation schématisée du processus d'élutriation.

Sous l'effet d'un courant tampon qui circule dans le sens opposé au champ centrifuge, les GR sont éliminés de manière séquentielle de la chambre centrifuge essentiellement en fonction de leur taille (les GR les plus petits sortent en premier) (Dorin, 1994). Lorsque le système est en équilibre, c'est-à-dire, la force centrifuge est égale au flux tampon opposé, les GR de toute taille prédéterminée peuvent être sélectivement éliminées du mélange (**Figure 28B**). L'avantage de l'élutriation est qu'elle est un processus doux qui maintient et conserve la variabilité et la fonction des cellules puisqu'elle est basée sur l'utilisation de milieux physiologiques. Par conséquent, les cellules ne sont généralement pas activées ou stimulées artificiellement (Dorin, 1994). Selon l'étude réalisée par *vegt et al.* (1985), cette technique permet d'obtenir un certain degré de séparation en fonction de l'âge en utilisant des études de marquage chez l'homme (van der Vegt et al., 1985).

iii) Séparation des GR en fonction des différences d'autres propriétés cellulaires.

Des méthodes se basant sur des différences d'autres propriétés cellulaires telles que la fragilité osmotique et la charge de surface ont également été développées pour caractériser les populations de GR en fonction de l'âge. Cependant, ces méthodes ne sont plus utilisées vu l'interprétation incertaine des résultats qu'elles génèrent (Clark, 1988; Shinozuka, 1994).

7.2. Séparation *in vivo* des GR sénescents chez l'animal

Le principe général des méthodes décrites ci-dessus repose sur la capacité à séparer physiquement les GR jeunes, et les GR âgés d'une population de GR normaux qui vieillissent de manière hétérogène en utilisant certaines différences de propriétés cellulaires qui seraient liées à l'âge. Une autre approche ingénieuse et innovante, chez l'animal (rongeurs), a été proposée avec l'objectif de surveiller le vieillissement des GR réintroduits dans la circulation. Brièvement, cette stratégie consiste à hypertransfuser les animaux : des GR sont prélevés sur des animaux sacrifiés (souris ou rats) et transfusés à des animaux syngéniques. Cela provoque l'augmentation de l'hématocrite impliquant la suppression de l'hématopoïèse et l'accumulation de GR sénescents *in vivo* relativement homogènes après que la procédure a été répétée *n* fois tous les quelques jours (**Figure 29**). L'approche de l'hypertransfusion chez les rongeurs pour la séparation des GR sénescents présente deux inconvénients : i) c'est une méthode qui ne peut pas être appliquée à d'autres espèces, ii) les expériences ont lieu chez les souris qui sont caractérisées par un mode de destruction des GR largement aléatoire différent de celui des GR humains. Cependant, les résultats de cette approche ont montré que la densité cellulaire n'augmente pas de façon linéaire avec le temps, suggérant une réévaluation minutieuse de la relation entre l'âge et la densité des GR humains (Clark, 1988).

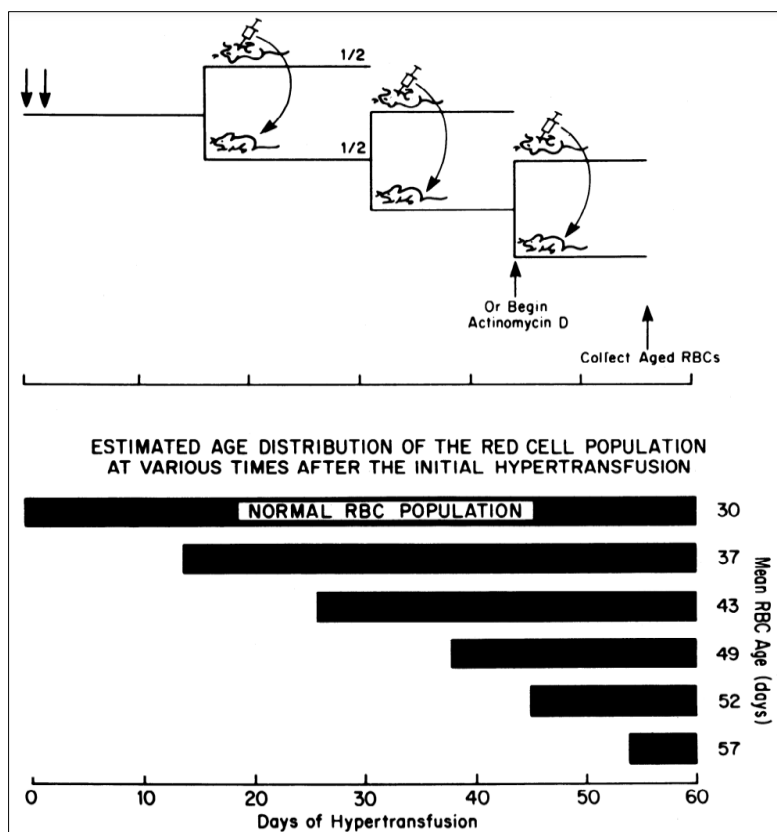


Figure 29. Schéma illustrant le protocole de génération de populations de globules rouges de souris âgés *in vivo* par la suppression continue de l'érythropoïèse à travers la transfusion en série (Clark, 1988).

8. Utilisation de l'hémoglobine glyquée comme indicateur d'âge des globules rouges

En se basant sur les résultats de l'étude *in vivo* de Bunn et ses collaborateurs (1970) concernant la formation linéaire de l'HbA_{1c} au cours de la durée de vie des GR, des travaux de recherche ciblant à vérifier la possibilité d'utiliser l'HbA_{1c} comme indicateur d'âge des GR ont été lancés. Parmi ces projets, celui de Fitzgibbons *et al.* (1976) qui avait pour objectif d'étudier *in vitro* l'évolution de l'HbA_{1c} et les autres espèces glyquées en fonction du processus de vieillissement. Pour ce faire, les auteurs ont procédé, chez les donneurs sains et les patients diabétiques, à la quantification par chromatographie de type Bio-Rex 70 des espèces glyquées dans des GR de différents âges obtenus par fractionnement en fonction de la densité sur un gradient de dextran (Fitzgibbons *et al.*, 1976). L'analyse des données a montré qu'aussi bien dans les GR normaux que dans les GR de sujets diabétiques, le contenu en HbA_{1c} est plus élevé dans les GR âgés que dans les GR jeunes indiquant ainsi que l'âge des GR et le diabète sont des déterminants significatifs de la quantité érythrocytaire d'HbA_{1c} (Tableau 4).

Tableau 4. Quantité d'HbA1c chez des sujets non diabétiques (Fitzgibbons et al., 1976).

Subject	Age	Sex	Hb A _{1a+b}			Hb A _{1c}			Plasma sugar*
			Young Rbc	Whole Rbc	Old Rbc	Young Rbc	Whole Rbc	Old Rbc	
Controls									
M. K.	21	F	1.3	1.2	1.5	4.1	5.2	6.3	
B. M.	25	M	1.3	1.6	1.6	2.0	3.9	5.0	
A. S.	28	M	1.0	1.4	1.3	3.3	4.2	5.6	
L. M.	29	F	1.2	2.2	1.9	2.1	4.0	5.4	
J. F.	29	M	1.0	1.3	1.3	2.6	3.8	5.5	
J. L.	30	F	1.6	1.7	1.2	2.4	3.1	4.0	
A. D.	37	F	1.3	1.6	1.6	3.3	4.8	6.5	
M. C.	43	F	1.2	1.8	1.6	1.9	4.2	5.0	102‡
R. J.	46	M	1.2	1.3	1.7	2.8	3.8	4.8	
R. K.	51	M	1.1	2.6	2.5	3.0	4.5	7.0	
D. V.	57	F	1.1	1.7	1.9	3.0	5.4	6.9	
M. K.	57	F	1.2	2.0	2.5	4.8	6.0	8.2	65‡
J. M.	66	M	1.5	2.0	1.9	3.7	6.1	6.8	79‡
E. T.	75	F	1.2	1.9	1.9	3.1	4.9	6.5	84‡
R. B.	81	M	0.7	2.2	1.8	3.8	5.0	6.9	105‡
Mean±SD			1.2±0.2	1.8±0.4	1.8±0.4	3.1±0.8	4.6±0.9	6.0±1.1	
Diabetics									
S. M.	22	F	1.3	2.7	2.8	3.7	8.0	9.9	45-422
B. M.	22	F	1.7	2.9	2.4	5.8	6.8	8.6	217-530
H. C.	27	F	1.4	1.3	1.3	3.5	4.4	5.5	75-84
D. H.	33	F	1.8	1.8	1.7	4.3	6.7	7.8	62-190
J. J.	41	M	1.4	2.1	2.3	2.0	5.5	6.5	20-256
H. L.	43	M	0.6	1.8	1.0	2.3	4.6	5.4	90-110
F. M.	44	M	1.1	2.6	2.4	3.8	10.0	12.5	195-400
G. R.	47	M	1.7	3.6	4.3	7.1	15.0	18.7	66-1,180
J. C.	49	F	1.6	2.7	2.5	5.4	9.4	10.0	247-367
F. W.	50	M	2.8	2.7	3.0	7.0	7.8	9.2	43-494
G. H.	53	M	2.5	2.8	2.7	6.9	9.4	10.1	133-165
B. B.	58	F	1.5	2.2	2.7	3.5	7.6	9.2	165
L. C.	60	M	1.8	3.1	3.0	6.4	12.8	14.7	260-297
H. M.	68	F	2.8	3.8	3.8	9.1	11.8	13.7	431-548
Mean±SD			1.7±0.6	2.6±0.7	2.6±0.9	5.1±2.1	8.6±3.1	10.1±3.7	

La quantification de l'HbA_{1c} dans les GR de sujets sains et de patients atteints d'anémie hémolytique dans l'étude de Bunn et ses collaborateurs. (1975) a révélé que les patients dont la durée de vie des GR est réduite à cause de leur destruction accrue présentent des taux d'HbA_{1c} nettement plus faibles (**Figure 30A**) (Bunn *et al.*, 1976). Le taux d'HbA_{1c} dans les GR des patients est d'environ la moitié du taux d'hémoglobine A_{1c} dans les GR d'individus normaux. Dans les travaux de recherche de Panzer *et al.* (1982), une corrélation significative ($r^2=0,88$) entre l'Hb glyquée (GHb) et la durée de vie des GR mesurée par la méthode du chrome radioactif (⁵¹Cr) a été rapportée indiquant ainsi que l'Hb glyquée est capable de refléter avec précision la sévérité de l'hémolyse *in vivo* (**Figure 30B**). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Cohen et ses collègues. (2008) qui ont utilisé, chez six sujets sains, de la biotine pour mesurer la durée de vie des GR circulants et suivre la formation de l'HbA_{1c} *in vivo*. Les données générées suite à cette expérience ont démontré que la synthèse *in vivo* de l'hémoglobine A_{1c} est effectivement linéaire en fonction du temps suggérant l'utilisation de l'HbA_{1c} comme marqueur de substitution de la mesure de la durée de vie des GR dans les maladies érythrocytaires (**Figure 30C**).

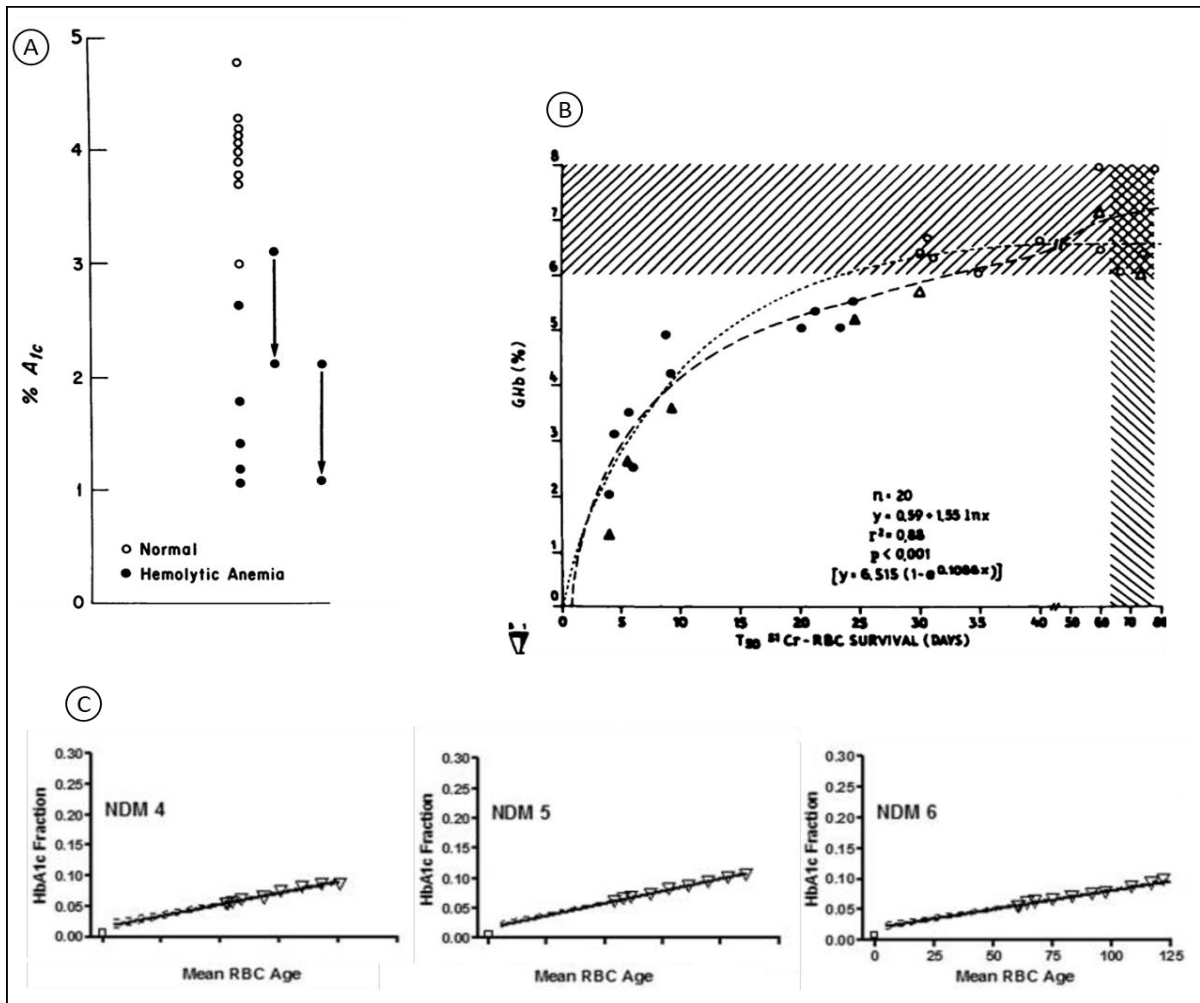


Figure 30. Lien entre la durée de vie des globules rouges et leur contenu en Hb glyquée.

(A) Taux d'HbA1c chez les patients atteints d'anémie hémolytique (●) et chez les individus normaux (○) (Bunn et al., 1976). Deux échantillons ont été corrigés pour la contamination par HbF (flèches). **(B)** Corrélation entre la durée de vie des globules rouges marqués au ^{51}Cr et le taux d'Hb glyquée (GHb) chez les patients atteints d'anémie (Panzer et al., 1982). Les symboles ouverts représentent les patients atteints d'anémie non hémolytique ($n = 10$) ; les symboles fermés représentent les patients souffrant d'anémie hémolytique ($n = 10$) ; les symboles triangulaires correspondent à des taux de GHb stables (dialysés). La ligne brisée montre la régression linéaire avec abscisse logarithmique ; la ligne en pointillé le modèle monoexponentiel (équation entre parenthèses) ; la zone hachurée indique la plage normale **(C)** La mesure de la fraction HbA1c au fil du temps en fonction de l'âge moyen des GR biotinylés (Cohen et al. 2008). La fraction d'HbA1c a été mesurée dans des GR autologues biotinylés, prélevés à différents moments (triangles) après la réinjection chez les sujets humains non diabétiques (NDM). L'âge moyen des GR au moment de l'échantillonnage a été calculé en fonction du moment de l'échantillonnage. La pente de la fraction d'HbA1c du RBC biotinylé en fonction du temps représente le taux de glycation de l'Hb. (—), ligne de régression ; (---), intervalles de confiance à 95%.

Glycation et hémoglobine A_{1c} (HbA_{1c})

9. Termes caractérisant la glycation
10. Bases biochimiques de la glycation
11. Glycation de l'hémoglobine
 - 11.1. Analyse structurale de l'HbA_{1c} et des espèces glyquées
 - 11.2. Formation de l'HbA_{1c} et des espèces glyquées
 - 11.3. Propriétés fonctionnelles de l'HbA_{1c} et des espèces glyquées
12. Glycation des autres hémoglobines
13. Déglycation de l'hémoglobine glyquée
 - 13.1. Fructosamine-3-kinase
 - 13.2. Mécanisme de déglycations par la fructosamine-3-kinase
14. Méthodes d'analyse de l'HbA_{1c}
 - 14.1. Méthodes basées sur la modification de la charge
 - 14.2. Méthodes basées sur la modification de la structure
15. Interférences dans l'analyse et l'interprétation de l'HbA_{1c}
 - 15.1. Facteurs physiologiques influençant l'interprétation de l'HbA_{1c}
 - 15.2. Facteurs influençant la mesure de l'HbA_{1c}
16. Standardisation de la mesure de l'HbA_{1c}
17. Utilisation de l'HbA_{1c} comme marqueur d'équilibre glycémique

Chapitre III : Glycation et hémoglobine A1C (HbA1c)

9. Termes caractérisant la glycation

La glycation (appelée aussi réaction de Maillard et mentionnée à tort dans plusieurs publications scientifiques comme étant la glycosylation) et la glycosylation sont deux réactions de modification post-traductionnelle des protéines intra et extra-cellulaires. Les deux processus permettent à la plupart des composés protéiques (y compris l'hémoglobine) d'interagir et d'établir des liaisons covalentes avec des glucides (Taniguchi et al., 2016). La proximité sémantique et chimique de ces deux phénomènes entraîne souvent une confusion et une utilisation interchangeable des deux termes, pourtant les deux processus sont chimiquement et fonctionnellement différents.

La « glycosylation » et la « glucosylation » étaient les premiers termes introduits vers la fin des années 1970 pour désigner le processus connu actuellement sous le nom de « glycation » (John 1997 ; Weykamp et al., 2009). En 1983, l'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) et l'Union Internationale de la Biochimie et de la Biologie Moléculaire Commission Mixte pour la Nomenclature Biochimique (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature*) ont suggéré de remplacer la « glycosylation » par la « glycation » pour mieux indiquer la réaction spontanée des protéines avec le glucose de manière spécifique. Pour ce qui est de la glycation de l'hémoglobine, la « glycohémoglobine » a été le premier terme recommandé, et il a été remplacé par « HbA1C » ou « glycohémoglobine totale » durant ces dernières années. Le consensus de la Fédération Internationale de la Chimie Clinique (IFCC), l'Association Européenne pour l'Étude du Diabète (EASD), la Fédération Internationale du Diabète (FID) en 2007 et de l'Association Américaine du Diabète ont déclaré que l'« HbA1c » est désormais le terme qui devrait être utilisé pour désigner la glycation de l'hémoglobine normale adulte (Weykamp et al., 2009).

Sur le plan fonctionnel, la glycosylation est un mécanisme contrôlé médié par des enzymes appelées glycosyltransférases et considéré comme une étape normale de la biosynthèse des protéines ayant pour objectif de leur conférer certaines propriétés moléculaires bien définies. En revanche, la glycation est un processus chimique non enzymatique entre des sucres libres dans la circulation sanguine et des protéines cellulaires aboutissant à la formation des produits glyqués responsables de l'altération des propriétés fonctionnelles de plusieurs composants importants de la cellule. La glycation est souvent abordée dans un contexte pathologique. Par exemple, chez les patients diabétiques, l'hémoglobine glyquée est utilisée comme un marqueur pronostique de la maladie. La glycation est aussi impliquée dans le processus normal du vieillissement (Brownlee, 1995; Taniguchi et al., 2016). Dans ce chapitre, seul le processus de glycation sera discuté.

10. Bases biochimiques de la glycation

La glycation est un mécanisme complexe comprenant plusieurs étapes dont les phases tardives génèrent un groupe hétérogène de composés très réactifs appelés « produits terminaux de glycation avancée » ou « *Advanced Glycation End-products, AGE* » (Figure 31) qui participe au processus normal de vieillissement mais aussi aux pathologies diabétiques (Brownlee, 1995 ; Clark 1988). Les phases précoces de la glycation débutent par l'établissement d'une interaction non covalente entre la fonction aldéhyde (RCHO) d'un sucre réducteur (glucose, fructose, galactose, etc.) et le groupement amine libre (-NH₂) d'une protéine sur des sites sélectionnés qui entraîne la formation d'une base Schiff/aldimine instable. Comme cette étape de la réaction est rapide et réversible, la liaison aldimine peut-être facilement hydrolysée et libérer l'ose. Cependant, elle peut également subir un réarrangement et se transformer *via* un processus lent et irréversible en cétosamine ou, si le sucre est un glucose, en fructosamine dits « produits d'Amadori ». S'agissant d'une réaction purement chimique, la glycation protéique peut-être influencée *in vivo* par un certain nombre de paramètres tels que les concentrations du glucose et de la protéine, la demi-vie de la protéine, la réactivité de la protéine en termes de groupements amines libres ainsi que la perméabilité cellulaire des GR au glucose. Au niveau de la cellule, les produits d'Amadori atteignent l'équilibre réactionnel et deviennent stables après environ 15 à 20 jours (Clark, 1988).

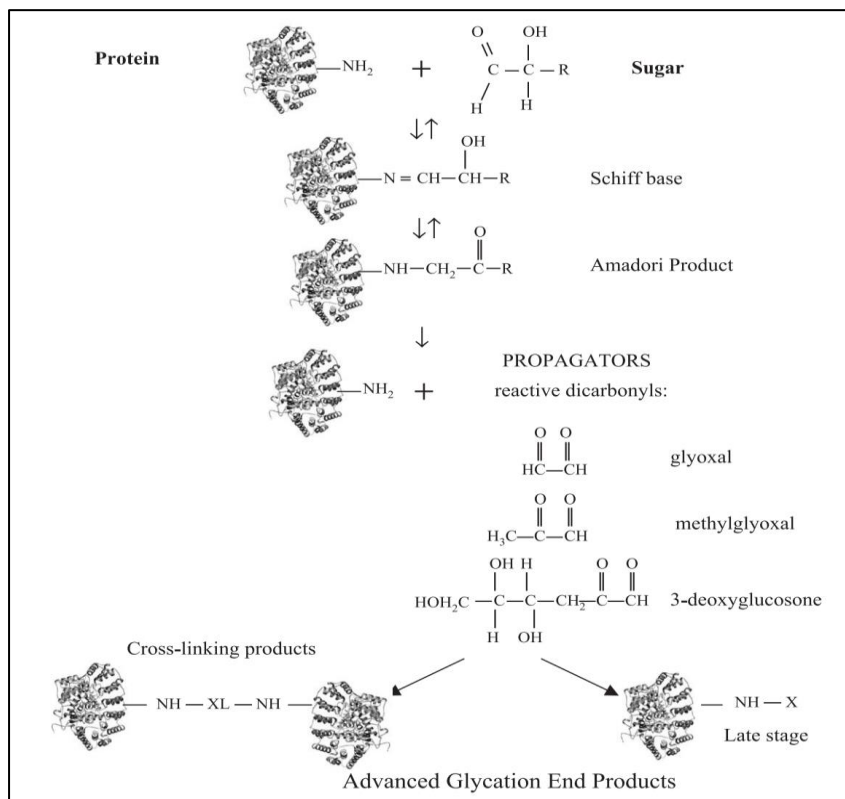


Figure 31. Les étapes du processus de glycation (Lapolla et al., 2005).

Le plus connu des produits d'Amadori est l'hémoglobine humaine glyquée connue par sa fraction majoritaire l'hémoglobine A_{1c} , Hb A_{1c} . En effet, l'hémoglobine a été la première protéine à être découverte pour subir la glycation *in vivo* (Bunn et al. 1975). L'Hb A_{1c} permet le suivi et la gestion du diabète sucré puisque la mesure de l'Hb A_{1c} est augmentée avec l'hyperglycémie persistante et reflète l'hyperglycémie moyenne (Clark et al. 2013).

11. Glycation de l'hémoglobine

L'hémoglobine glyquée est considérée comme un système modèle pour la glycation non enzymatique des protéines. Sa découverte remonte aux années cinquante lors des études menées sur l'hétérogénéité électrophorétique et chromatographique des hémoglobines de sujets sains. En 1958, en utilisant la chromatographie échangeuse de cations, Allen et al. ont révélé la détection, à de faibles doses, de trois formes minoritaires plus acide que l'HbA non modifiée (Hb A_0). Ces fractions désignées comme Hb A_{1a} , Hb A_{1b} et Hb A_{1c} (a, b, c, en référence à leur ordre d'élué de la colonne échangeuse d'ions), collectivement Hb $A_{1(a+b+c)}$ ou Hb A_{1abc} ou Hb A_1 ont été éluées avant l'Hb A_0 (Figure 32) d'où le nom des hémoglobines rapides (*Fast moving hemoglobins*, en anglais) (Allen et al., 1958).

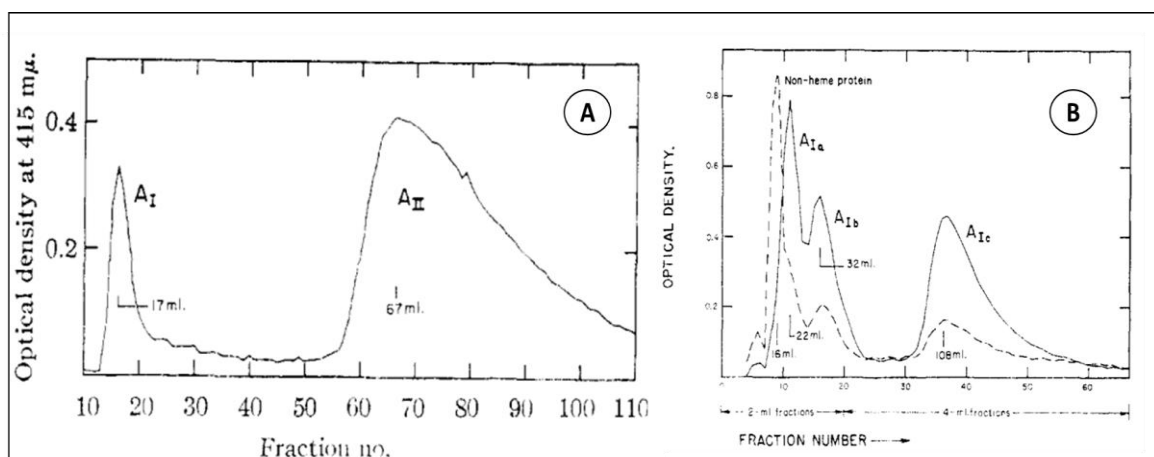


Figure 32. Chromatogramme des espèces glyquées (Allen et al., 1958).

(A) Chromatogramme de l'oxyhémoglobine adulte (1x35 cm).

Colonne d'IRC-50 avec développeur. ($A_I = HbA_1$) et ($A_{II} = A_0$) (B) Rechromatographie de la zone A_I (1x35 cm). Colonne d'IRC-50 avec développeur. (---) densité optique à 280 nm, (—) densité optique à 415 nm (Allen et al., 1958).

En 1960, Huisman et Dozy ont remarqué que l'Hb A_1 et plus précisément l'Hb A_{1c} était augmentée de 2 à 3 fois chez les patients diabétiques. Cette observation a été ensuite confirmée par les travaux de Rahbar et ses collaborateurs en 1968 lors de l'analyse, par des techniques de chromatographie et d'électrophorèse, des échantillons de deux cohortes de 1200 et de 47 patients diabétiques (Huisman and Dozy, 1961; Rahbar et al., 1969). La découverte de l'augmentation de l'Hb A_{1c} chez les patients diabétiques a conduit à des

recherches approfondies sur la structure, la formation et la cinétique de formation de l'HbA_{1c} et des autres composants mineurs.

11.1. Analyse structurale de l'HbA_{1c} et des espèces glyquées

Les espèces glyquées HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c} préalablement identifiées par Allen et al. constituent approximativement 1,6 ; 0,8 et 4-6% du total de l'HbA₀ dans le GR humain, respectivement (Bunn et al., 1976; Fitzgibbons et al., 1976). Les travaux de McDonald et ses collègues ont montré que l'HbA_{1a} est dissociable en deux constituants ; HbA_{1a1}, HbA_{1a2}; formés respectivement de la fixation du fructose 1,6 biphosphate et du glucose-6-phosphate à l'extrémité N-terminale de la chaîne β globine de l'HbA₀ (Figure 33) (McDonald et al., 1978). La fraction HbA_{1b} contient du pyruvate lié au β- N-terminal (Koval et al., 2011)

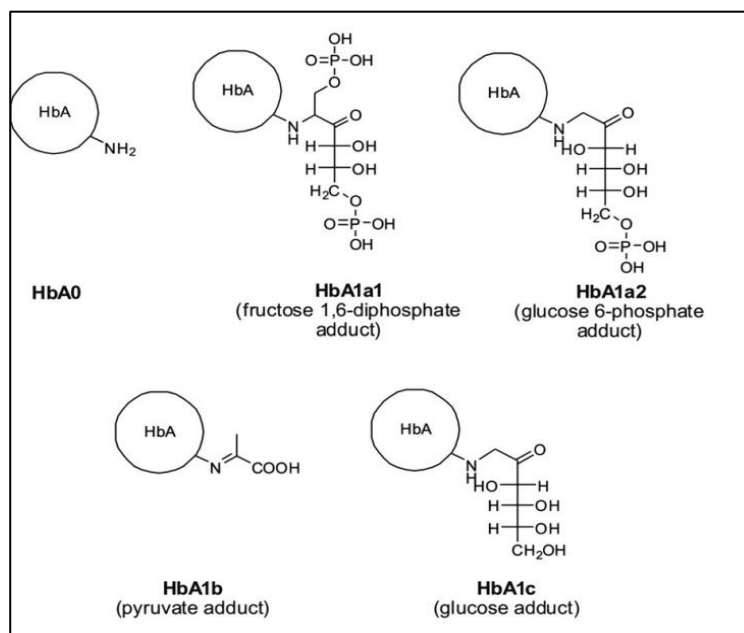


Figure 33. Représentation schématique des espèces glyquées (Koval et al., † 2011).

Hémoglobine A_{1c}. L'hémoglobine A_{1c} est la fraction glyquée la plus abondante dans le GR humain. Elle représente 70% de l'hémoglobine glyquée totale (HbA₁). Sa structure a été déterminée pour la première fois en 1968 par Bookchin et Gallop qui ont démontré que l'HbA_{1c} a une structure identique à celle de l'HbA₀ avec un hexose fixé à la fonction amine de l'extrémité N-terminale non protonée de la chaîne β globine. Les auteurs ont identifié deux molécules d'hexoses par tétramère d'Hb. Cette partie glucidique est à l'origine de la charge négative de l'HbA_{1c} qui permet sa séparation et détection en chromatographie et en électrophorèse (Bookchin and Gallop, 1968). Vers les années 70, Bunn et ses collaborateurs ont révélé que le glucose interagit avec la valine des chaînes β-globine de l'HbA_{1c} (Bunn et al. 1975). D'autres études ont ensuite déterminé le schéma réactionnel de la formation de l'HbA_{1c} qui est constitué de deux étapes montrées dans la Figure 34. Dans la première étape, la

condensation réversible du glucose avec le groupement amine de la valine N-terminal de la chaîne β aboutit à la formation de la base Schiff instable (pré-HbA_{1c}). Cette réaction est suivie par un arrangement d'Amadori irréversible et non enzymatique qui entraîne la formation de l'Hb glyquée (HbA_{1c}) (Hodge, 1955). La nomenclature chimique de la molécule d'HbA_{1c} définie par le système IFCC est la β -N-valine glyquée [β -N-(1-deoxy) - fructosyl-hemoglobin] (Miedema, 2005). Le degré d'accumulation de l'HbA_{1c} dépend de la concentration moyenne de glucose et de la durée de temps d'exposition au glucose (Haney and Bunn, 1976), (Higgins and Bunn, 1981).

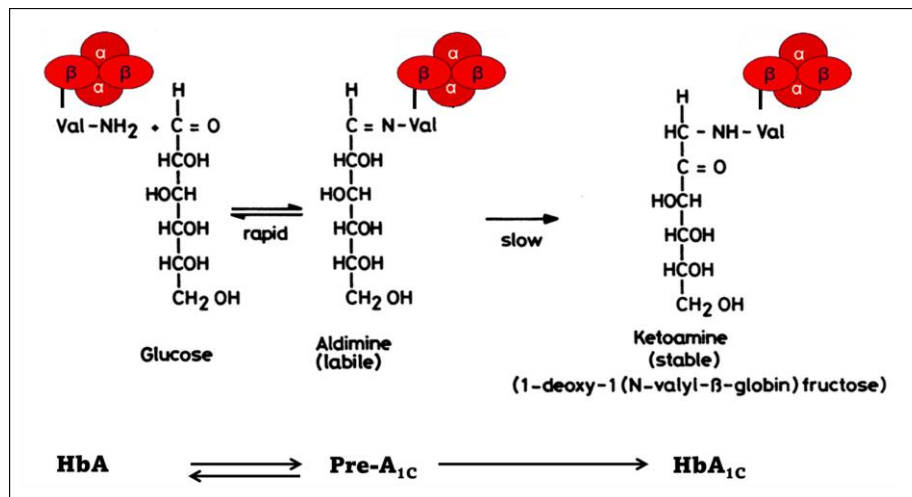


Figure 34. Les étapes de la formation de l'HbA_{1c} (Higgins and Bunn, 1981).
(Val= acide aminé valine, Val-NH₂= fonction amine de valine, HbA= HbA₀).

La formation de l'HbA_{1c} à la fois, *in vitro* et *in vivo*, a montré qu'en plus de la valine de la chaîne β globine, le glucose interagit également de manière non enzymatique avec la valine de l'extrémité N-terminale de la chaîne α -globine ainsi qu'avec le groupement epsilon des acides aminés lysines situées aussi bien sur la chaîne β que la chaîne α globine. (Flückiger and Winterhalter, 1976). L'analyse en spectrométrie de masse de l'HbA₁ récupérée par chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie au boronate a détecté l'existence simultanée de plusieurs espèces de l'HbA_{1c} incluant des espèces avec des chaînes α et β glyquées, des espèces avec seulement la chaîne α glyquée et des espèces avec seulement la chaîne β glyquée (Peterson et al., 1998). La valine N-terminale de la chaîne β constitue le site prédominant de la fixation de glucose dans le tétramère de l'HbA₀ représentant 50 % à 80 % de l'ensemble des sites de glycation chez le sujet sain (Bry et al., 2001) ; (Delpierre and Van Schaffingen, 2003). En revanche, la glycation au niveau des groupements ϵ -amine des lysines constitue 10 % à 50 % de la glycation totale de l'HbA₀ (Shapiro et al., 1980; Delpierre and Van Schaffingen, 2003). Cette différence de glycation qui existe entre les résidus valine et lysine de l'HbA₀ est attribuée à un certain nombre de facteurs tels que le pKa des groupements amines, la charge et les effets stériques des acides aminés voisins. En effet, le pKa du groupement α -

amine de la val-1 N-terminale de la chaîne β est plus faible que celui du groupement ϵ -amine du résidu lysine (pK_a -Val α -N-terminale= 7,8 ; pK_a -Val β -N-terminale = 6,8 ; pK_a groupements ϵ -amines = 10) (Gabbay et al., 1979; Lin and Yi, 2017). Cela signifie qu'au pH physiologique ($pH=7,4$), la valine a une affinité plus importante pour le glucose. En outre, la charge positive de la cavité formée autour de la valine attire et favorise davantage la liaison avec les molécules du glucose (Lin and Yi 2017). Dans le but d'identifier les sites de glycation au niveau de l'HbA₀ humaine, plusieurs études réalisées avec différentes techniques ont été lancées. Dans les travaux de Shapiro et ses collaborateurs. (1980), les auteurs ont effectué une comparaison entre les sites de glycation *in vitro* obtenus après incubation de l'HbA₀ avec du ¹⁴C-glucose et les sites de glycation *in vivo*. En utilisant la chromatographie échangeuse d'ions et la cartographie peptidique bidimensionnelle, les résultats ont montré que les sites de fixation *in vitro* étaient différents de ceux *in vivo*. Les résidus glyqués identifiés par les auteurs sont (dans l'ordre de prévalence) : β -Val-1, α -Lys-16, β -Lys-66, β -Lys-17, α -Val-1, α -Lys-7, α -Lys 61, and β -Lys-120 (*in vitro*) ou β -Val-1, β -Lys-66, α -Lys 61, β -Lys-17, and α -Val-1 (*in vivo*). Dans d'autres études d'évaluation de la proportion et de la distribution de la glycation dans la molécule de l'Hb glyquée, une combinaison de techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse a été utilisée. Les résultats obtenus des travaux de Zhang *et al.* (2001) et de Delpierre *et al.* (2004) comparés à ceux de l'étude de Shapiro *et al.* (1980) sont montrés dans le **tableau 5**.

Tableau 5. Comparaison des sites de glycation de l'hémoglobine humaine identifiés dans les études de Shapiro et al. (1980), Zhang et al. (2001) et de Delpierre et al. (2004) (Delpierre et al. 2004).

Delpierre <i>et al.</i> , 2004	Shapiro <i>et al.</i> , 1980		Zhang <i>et al.</i> , 2001	
The present study	Hemoglobin glycated <i>in vitro</i>	Hemoglobin glycated <i>in vivo</i>	Hemoglobin glycated <i>in vivo</i>	Relative abundance
α -Chain				
	Val-1 (5)	Val-1 (5)	Val-1	0.01
	Lys-7 (6)		Lys-7 or Lys-16	< 0.01
<u>Lys-16</u>	Lys-16 (2)		Lys-7 or Lys-16	< 0.01
			Lys-40	0.02
Lys-61		Lys-61 (3)	Lys-61	0.22
<u>Lys-139</u>			Lys-127 or Lys-139	0.15
β -Chain				
Val-1	Val-1 (1)	Val-1 (1)	Val-1	0.32
<u>Lys-17</u>	Lys-17 (4)	Lys-17 (4)	Lys-8 or Lys-17	0.01
Lys-59				
Lys-66	Lys-66 (3)	Lys-66 (2)	Lys-61 or Lys-65 or Lys-66	0.09
	Lys-120 (7)			
Lys-132			Lys-132 or Lys-144	0.06
<u>Lys-144</u>	Lys-144		Lys-132 or Lys-144	0.06

Dans l'étude de Shapiro et al., l'ordre de prévalence concernant l'étendue de la glycation parmi les résidus pour les deux approches est indiqué entre parenthèses. Zhang et al. ont identifié les sites de glycation *in vivo* par LC-ESI-MS, en utilisant dans ce cas l'hémoglobine glyquée d'un patient diabétique purifiée par chromatographie d'affinité et digérée par des endoprotéases. L'abondance relative des différents sites glyqués, calculée à partir de leurs données, est également indiquée. Les sites de glycation identifiés par Delpierre et al. sont déduits du fait qu'ils soient phosphorylés par l'enzyme de déglycation (FN3K) *in vitro*. Les résidus

soulignés sont ceux pour lesquels la preuve de déglycation dans les GR intacts a été fournie (Delpierre et al., 2004).

La comparaison du nombre de sites de glycation entre la sous unité α et la sous unité β par Xu et al. (2019) en spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS pour *Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) a démontré que les sous-unité β sont plus glyquées que la chaînes α . Cependant, les auteurs ont mis en évidence une forte corrélation du taux de glycation entre la chaîne α et la chaîne β globine.

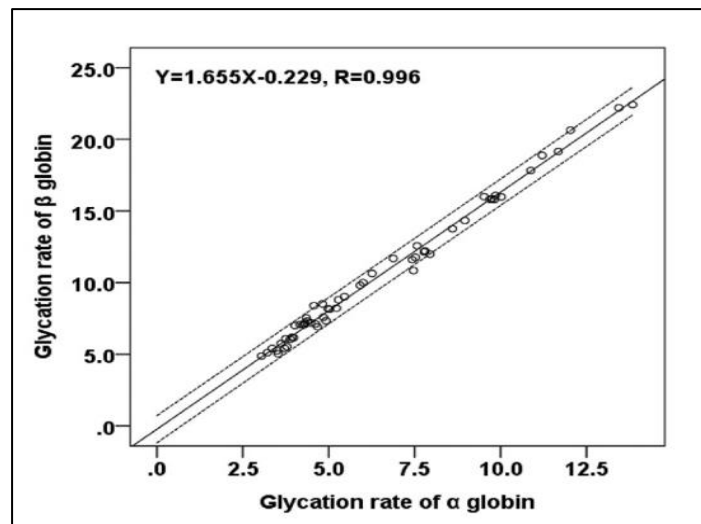


Figure 35. Analyse par régression linéaire de la corrélation des taux de glycation entre la chaîne α globine et la chaîne β globine (Xu et al. 2019).

Méthode de comparaison combine l'analyse de régression linéaire et Bland-Altman plots. La ligne continue montre les estimations de la moyenne des différences $-X$, les lignes discontinues indiquent $-X \pm 2SD$.

Chez les patients diabétiques, les travaux de McDonald *et al.* (1978) ont confirmé les résultats de Rahbar et démontré que seule la quantité de l'HbA_{1c} augmente contrairement aux taux des autres espèces glyquées (HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}) qui restent invariables en comparaison avec celles des donneurs sains (Rahbar et al., 1969; McDonald et al., 1978). Les données obtenues à partir des travaux de Gabbay *et al.* (1979) ont révélé que la glycation de l'HbA₀ sur les sites secondaires, autre que le site N-terminal de la chaîne β , augmente proportionnellement avec l'augmentation de l'HbA_{1c} chez les diabétiques (Gabbay et al., 1979). En analysant le ratio de glycation entre la chaîne α et la chaîne β globine chez 50 sujets non diabétiques et 78 patients diabétiques, Roberts *et al.* (1997) ont indiqué qu'en dépit de l'augmentation de la glycation chez les personnes diabétiques, le ratio entre les deux sous unités de l'HbA_{1c} reste constant (0,64 : 1) (Roberts et al., 1997).

11.2. Formation de l'HbA_{1c} et des espèces glyquées

La synthèse des espèces glyquées et notamment celle de l'HbA_{1c} a été beaucoup étudiée *in vitro* et *in vivo*.

Etudes *in vitro*. Flückiger et Winterhalter. (1976) ont incubé *in vitro* de l'HbA₀ purifiée avec du ¹⁴C-glucose pendant des temps différents et ont mesuré la formation de l'HbA_{1c} (Flückiger and Winterhalter, 1976a). Les résultats de cette étude ont montré que l'HbA_{1c} est synthétisée par un processus lent non enzymatique dépendant du pH et que l'HbA_{1c} obtenue *in vitro* a une structure et des propriétés fonctionnelles identiques à celles de l'hémoglobine A_{1c} naturelle. Dans les travaux de Higgins et Bunn. (1981), portés sur l'analyse cinétique de la glycation de l'Hb humaine, les auteurs ont remarqué que la constante de vitesse globale obtenue pour la synthèse de l'HbA_{1c} *in vitro* est assez proche de celle calculée à partir des données de la cinétique du ⁵⁹Fe *in vivo* (Bunn and Higgins, 1981).

Etudes *in vivo*. Bunn et ses collaborateurs. (1976) ont suivi la formation de l'HbA_{1c} et celle des autres hémoglobines glyquées (HbA_{1a}, HbA_{1b}) ou non glyquées (HbA₀) *in vivo* durant 100 jours chez un individu sain qui a reçu une perfusion contenant du fer radioactif (⁵⁹Fe) lié à la transferrine. La radioactivité spécifique de l'HbA_{1c} a augmenté lentement pour atteindre celle de l'HbA₀ vers le 60ème jour (Figure 36). Les résultats de cette étude ont indiqué que l'HbA_{1c} est formée de manière non enzymatique, lente, continue et linéaire pendant la durée de vie de 120 jours du globule rouge (Haney and Bunn, 1976).

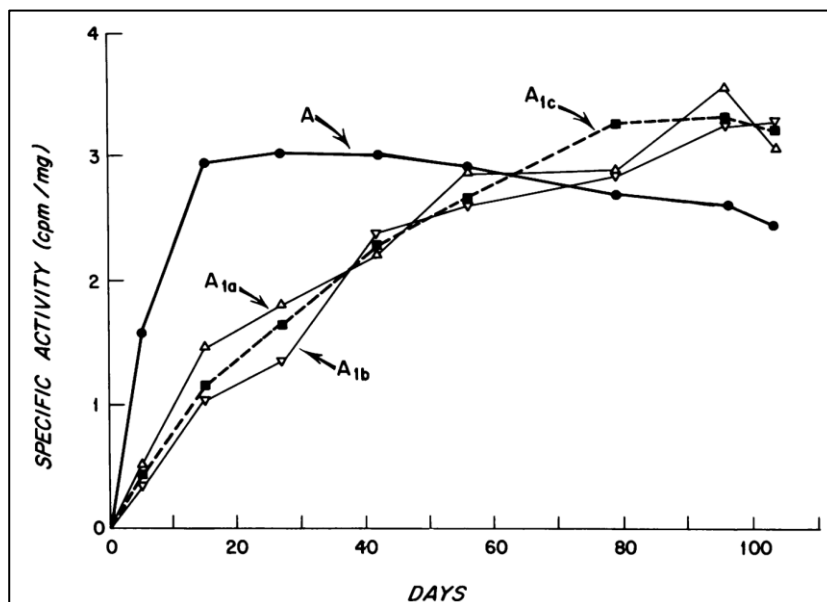


Figure 36. La formation de l'HbA_{1c} *in vivo* (Bunn et al., 1976).

Les hémoglobines ont été séparées sur une colonne de chromatographie. Dans cette étude l'HbA_{1c} n'est pas contaminée par la pré- HbA_{1c}.

11.3. Propriétés fonctionnelles des espèces glyquées

Affinité de l'hémoglobine glyquée pour l'oxygène. Les travaux *in vitro* de McDonald et ses collègues. (1978) ont montré que l'affinité pour l'oxygène des différentes espèces d'Hb glyquées à l'état purifié était drastiquement affectée (McDonald et al., 1978). Ces résultats ne concordent pas avec ceux obtenus de l'étude de Bunn en 1970 menée sur des Hb isolées en chromatographie et qui ont indiqué que l'affinité de l'HbA_{1c} pour l'O₂ était similaire à celle de l'HbA₀. Cependant, il a été constaté dans cette étude que l'HbA_{1c} était moins réactive avec le 2,3-disphosphoglycerate (2,3-DPG), un facteur important qui modifie la fonction intracellulaire de l'Hb, suggérant ainsi que le groupement amine N-terminal de la chaîne β est impliqué dans la liaison de l'HbA₀ avec le 2,3-DPG.

Stress oxydatif et changement de structure. Selon l'étude réalisée par Sen et ses collaborateurs. (2005), la glycation semble induire plusieurs changements fonctionnels incluant : i) l'HbA_{1c} s'auto-oxyde plus rapidement que l'HbA₀, ii) le traitement des Hb avec l'H₂O₂ favorise davantage la libération de l'atome de fer de l'HbA_{1c} que de l'Hb non glyquée indiquant ainsi qu'un stress oxydatif plus élevé pourrait être provoqué par l'augmentation du taux de l'HbA_{1c} (Sen et al., 2005). Les auteurs ont également identifié des modifications de structure au niveau de l'Hb glyquée. Par rapport à l'HbA₀, l'HbA_{1c} est caractérisée par une réduction du contenu en hélices α, un plus grand nombre de résidus tryptophanes hydrophobes accessibles en surface et par une liaison hème-globine plus faible. Les auteurs de cette étude pensent que la modification de structure de l'hémoglobine induite par la glycation peut être associée à sa modification fonctionnelle entraînant un stress oxydatif chez les patients diabétiques.

Polymérisation de l'hémoglobine S. Dans l'étude d'Elseweidy et Abraham. (1984), les résultats de comparaison entre l'HbS non glyquée et glyquée au niveau de l'extrémité N-terminal de la chaîne β^S (HbS_{1c}) ou au niveau des groupements ε-amino des lysines (HbS₀-glyquée) ont montré que les formes glyquées de l'HbS sont plus solubles et moins susceptibles de former le gel de polymères que l'HbS non glyquée. Les auteurs attribuent cet effet positif de la glycation sur la polymérisation de l'HbS à l'éventuelle capacité de la glycation de modifier des sites spécifiques qui seraient impliqués directement ou indirectement dans l'établissement des contacts intermoléculaires.

12. Glycation des autres hémoglobines

Les travaux d'Abraham et ses collaborateurs ont montré que les autres hémoglobines telles que l'HbS (Abraham et al., 1980), l'HbF (Abraham, 1981) et l'HbC (Abraham et al., 1984) subissent également de la glycation et engendrent des espèces glyquées mineures similaires à celles dérivées de l'HbA₀. Dans le cas de l'HbS et l'HbC, la fraction HbS_{1c} ou HbC_{1c} augmentent également de manière significative chez les individus diabétiques porteurs de ces Hb. L'interaction du glucose avec l'HbS et l'HbC s'effectue au niveau des sites spécifiques et

non spécifiques selon le même mécanisme détaillé pour l'Hb A₀. Cependant, la glycation de l'HbF constitue un cas différent par rapport à celle des autres Hb puisque l'HbF subit deux types de modifications post-traductionnelles : acétylation (HbF₁) et glycation (HbF_{1c}). La fraction HbF₁ est acétylée au niveau de la glycine N-terminale de la chaîne γ et représente généralement 15 à 20 % de l'HbF totale (HbF₀). Pour la glycation, elle semble avoir lieu uniquement au niveau de la chaîne γ , puisque les chaînes α de l'HbF₀ et de l'HbF_{1c} ne manifestent aucune différence en termes de mobilité chromatographique et la chaîne α de l'HbF_{1c} ne montre aucune radioactivité lors de l'utilisation du [¹⁴C] – glucose (Abraham, 1981). Par conséquent, selon certaines sources bibliographiques, le taux de glycation de l'hémoglobine F représenterait approximativement 1/3 de celui de l'HbA (Weykamp 2013). Néanmoins, les résultats obtenus dans une autre étude d'Abraham et al. confirment que les taux de glycation des hémoglobines A, F et S sont les mêmes pour le glucose et pour le glucose-6-phosphate (**Figure 37**). Les travaux de Sosenko *et al.* (1980) ont également rapporté des résultats concordants avec l'étude d'Abraham en indiquant que les taux de glycation *in vivo* de l'HbS, l'HbC et de l'HbD sont comparables à celui de l'HbA (Sosenko et al., 1980). Dans l'étude réalisée par Kabytaev et ses collaborateurs. (2016), l'analyse par spectrométrie de masse de la glycation de la chaîne β -globine de l'HbA (β^A) et la chaîne β globine de l'HbS (β^S) pour 41 individus portant un trait drépanocytaire (HbAS) a révélé que la sous-unité β^S subit une glycation plus importante que celle de la β^A . L'augmentation nette de la glycation totale ($\alpha+\beta$) théoriquement estimée pour l'HbS par rapport à l'HbA est approximativement 5%. Autrement dit, il existe une augmentation de glycation d'environ 5 % qui est due à une glycation de la β^S plus élevée que celle de β^A (Kabytaev et al., 2016). Concernant l'HbA₂, les résultats obtenus de l'étude de Tegos and Beutler (1980), première étude qui s'est intéressée à l'éventuelle existence de la forme glyquée de l'HbA₂, ont montré qu'effectivement la glycation de l'HbA₂ se produit dans les GR matures d'individus sains. Le mécanisme de glycation de l'HbA₂ est similaire à celui décrit dans le cas de l'HbA vue que les chaînes β et δ globine ont le même acide aminé au niveau de leur extrémité N-terminale (Tegos and Beutler, 1980).

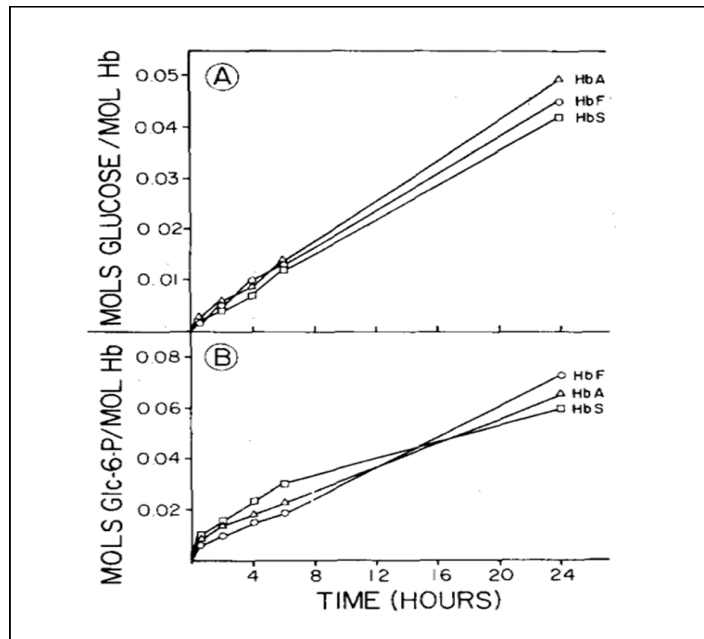


Figure 37. Liaison du (A) glucose et du (B) glucose-6-phosphate (Glc-6-P) aux hémoglobines A, F et S à 37°C (Abraham et al., 1980).

Données sur l'incorporation *in vitro* de glucose et de Glc-6-P dans les Hb A, S, F. Les taux et les proportions d'incorporation des deux hexoses par les trois Hb sont à peu près les mêmes, mais l'incorporation de Glc-6-P était plus élevée que celle du glucose. Le milieu d'incubation contenait un mélange d'hexose marqué au ^{14}C et non marqué. Les cpm/mg Hb ont été convertis en outil hexose/ mol Hb.

13. Déglycation de l'hémoglobine glyquée (A_{1c})

Il existe trois types de mécanismes enzymatiques connus pour détacher les fructosamines (glucose + protéine) et les cétosamines (autre sucre que le glucose + protéine) des protéines ou des acides aminés. Ces mécanismes impliquent des oxydases (ex. amadoriases bactériennes), des isomérases (ex. deglycasses bactériennes) et des kinases (ex. fructosamine-3-kinase). Seule cette dernière est utilisée pour déglyquer les protéines dans des conditions physiologiques (Van Schaffingen et al., 2012).

13.1. Fructosamine-3-kinase

La fructosamine-3-kinase (FN3K) est une enzyme intracellulaire de déglycation qui phosphoryle les fructosamines au niveau du troisième carbone (3C) de leur partie désoxyfructose entraînant ainsi le détachement du sucre de la protéine ou de l'acide aminé. Cette kinase, une nouvelle variété des protéines réparatrices, est détectée chez les mammifères et les oiseaux mais elle est absente chez les poissons, les plantes et les bactéries. Chez l'Homme, la FN3K est très active dans les globules rouges et le cristallin caractérisés par un turnover lent ou inexistant des protéines qui sont donc plus susceptibles à la glycation (Van Schaffingen et al., 2012). La preuve que la fructosamine-3-kinase est responsable de la déglycation a été mise en évidence

à travers des expériences effectuées *in vitro* et *in vivo*. L'expérience *in vitro* menée par Delpierre et ses collaborateurs ont montré que lorsque les globules rouges sont incubés dans un milieu contenant 200 mM de glucose en présence du 1-déoxy-1-morpholino-fructose (DMF), un inhibiteur compétitif (et aussi un substrat) de la FN3K, le taux de glycation de l'hémoglobine est augmenté de deux fois (Delpierre et al., 2004). L'évidence définitive de la déglycation par la FN3K a été fournie *in vivo* chez la souris FN3K^{-/-} qui a montré que le taux de fructosamines liés à l'Hb est environ 2,5 fois plus élevé que celui des souris FN3K^{+/-} ou FN3K^{+/+}. Cette étude a également révélé que les protéines cytosoliques sont 1,5 à 1,8 fois plus glyquées dans le foie, les reins, le cerveau et le muscle squelettique chez la souris FN3K^{-/-} par rapport à la souris FN3K^{+/+}. Ce résultat indique aussi que la distribution de la FN3K est ubiquitaire (da-Cunha et al., 2006).

13.2. Mécanisme de déglycation par la FN3K

Le mécanisme de la déglycation initié par la FN3K est constitué de deux étapes. Brièvement, par la consommation d'une molécule d'ATP, la FN3K catalyse via une réaction irréversible la phosphorylation du 3C de la partie glucidique du groupement fructosamine et permet ainsi la libération de l'acide aminé et la production du fructose-3-phosphate (FL3P), un produit labile instable, convertit durant la deuxième étape spontanée de la déglycation en 3 déoxyglucosone avec une demi-vie de l'ordre de 6 - 8 h, à 37°C à pH neutre (Figure 38) (Van Schaffingen et al. 2012).

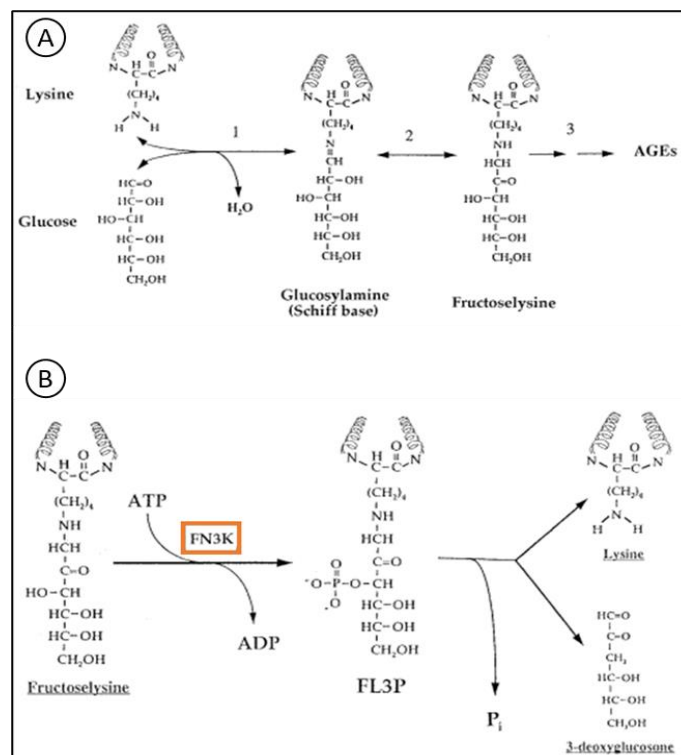


Figure 38. Processus de déglycation initié par la fructosamine 3-Kinase (Van Schaffingen et al., 2012).

(A) Les étapes précoces de la glycation entre la lysine et le glucose. (B) Rôle proposé de FN3K comme catalyseur dans la décomposition de fructoselysine (FL). La phosphorylation de FL en FL3P déstabilise la liaison fructoselysine et conduit à une décomposition spontanée de FL en lysine, phosphate inorganique (Pi), et 3DG.

La nature d'aglycone est un paramètre d'une grande importance pour l'activité de la FN3K. En effet, l'enzyme manifeste une K_M (affinité de l'enzyme pour son substrat) de l'ordre du micromolaire avec le fructose-epsilon-lysine (glucose lié au groupement epsilon des lysines) et le DMF (un substrat non physiologique mais perméable aux cellules) et de l'ordre de 1 millimolaire pour la fructose-valine ou la fructose-glycine. L'étude de Delpierre et al. *in vitro* sur la phosphorylation des fructosamines au niveau de l'Hb a indiqué que les fructosamines liés à des lysines constituent d'excellents substrats pour la FN3K alors que d'autres ne sont que lentement phosphorylés (Figure 39). Les régions peptidiques entourant la lysine glyquée jouent également un rôle essentiel dans la déglycation puisqu'elles doivent être suffisamment flexibles pour permettre le contact avec le site catalytique de la kinase. La fructose-valine libre est un substrat beaucoup plus pauvre que la fructose-lysine libre ce qui pourrait expliquer la non déglycation de la valine glyquée de l'extrémité N-terminale de la chaîne β globine de l'HbA₀ et son accumulation dans les GR pendant que les fructose-lysines disparaissent (Szwergold et al., 2001; Delpierre et al., 2004; Van Schaffingen et al., 2012).

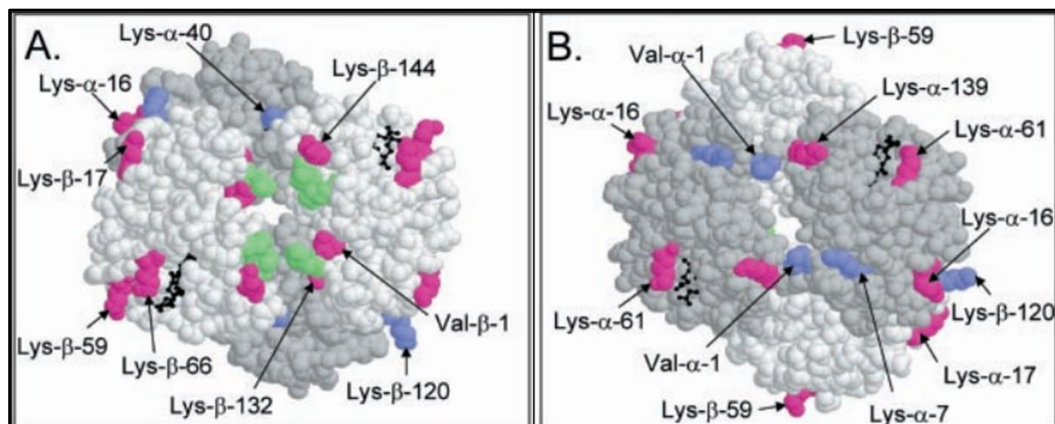


Figure 39. Structure tridimensionnelle de l'oxyhémoglobine humaine montrant les résidus glyqués et les résidus phosphorylés par la FN3K (Delpierre et al. 2004).

(A) Réédition de remplissage de l'espace de la structure déterminé par Paoli et al. (1996) est montrée. (B) Le modèle montré en A a été tourné de 180° le long de l'axe vertical et de 115° dans le sens inverse des aiguilles d'une montre le long de l'axe perpendiculaire au plan de la figure. Les chaînes α et β sont affichées en gris et en blanc respectivement et les groupements d'hème en noir. Les résidus roses correspondent aux sites où les fructosamines phosphorylées par FN3K ont été identifiées, tandis que les résidus violets sont les sites qui ont été trouvés glyqués dans les études précédentes (Shapiro et al., 1980; Zhang et al., 2001; Table I). Les résidus interagissant avec le 2,3 DPG (outre que la Val- β -1 et la Lys- β -144, c'est-à-dire His- β -2, Lys- β -82, et His- β -143) sont soulignés en vert.

14. Méthodes d'analyse de l'HbA_{1c}

Depuis les années 1970, le nombre de méthodes d'analyse et de quantification de l'HbA_{1c} développées ne cesse d'augmenter. Ces différentes méthodes ont toutes des principes basés sur les changements produits par le processus de glycation sur l'HbA₀. En effet, la glycation au niveau de l'extrémité N-terminale de l'HbA₀ génère une HbA_{1c} qui a une structure modifiée, une masse augmentée et une charge moins positive que celle de l'HbA₀. L'ensemble des modifications liées à la glycation ont donné lieu à deux concepts analytiques : le premier repose sur la séparation de l'HbA_{1c} de l'HbA₀ en fonction de leur différence de charge, et le second concept utilise la différence structurale qui existe entre l'Hb glyquée A_{1c} et non glyquée A₀.

14.1. Méthodes basées sur la modification de la charge

Les points isoélectriques (pHi ou pI) de l'Hb glyquée A_{1c} et de l'HbA₀ sont différents. Le pHi de l'HbA_{1c} diffère de celui de l'Hb non glyquée de 0,02 unités. Cette légère différence permet, à des conditions analytiques données, de séparer entre les deux hémoglobines (A_{1c} et A₀) selon la charge électrique (Weykamp 2013). Ce principe est utilisé par des méthodes telles que la chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'ions, l'électrophorèse capillaire et la focalisation isoélectrique.

i) Chromatographie liquide à haute pression échangeuse de cations

La chromatographie liquide à haute pression (HPLC) échangeuse de cations (CEC-HPLC) est une technique basée sur l'utilisation de l'instrument de l'HPLC et un échangeur de cations pour séparer les molécules de l'HbA_{1c} des autres hémoglobines. Le système existe sous forme de mini-colonnes qui sont en voie de disparition ou d'automates de haute performance sophistiqués capables à la fois de séparer et de quantifier plusieurs espèces moléculaires d'Hb.

Le principe de la CEC-HPLC consiste à séparer l'Hb glyquée A_{1c} de l'Hb non glyquée A₀ en saisissant les différences de forces ioniques qui existent entre le groupement fonctionnel échangeur de cations négativement chargé, fixé sur à la surface de la phase stationnaire (colonne de résine) et les Hb contenues dans l'hémolysat de sang ([figure 40](#)).

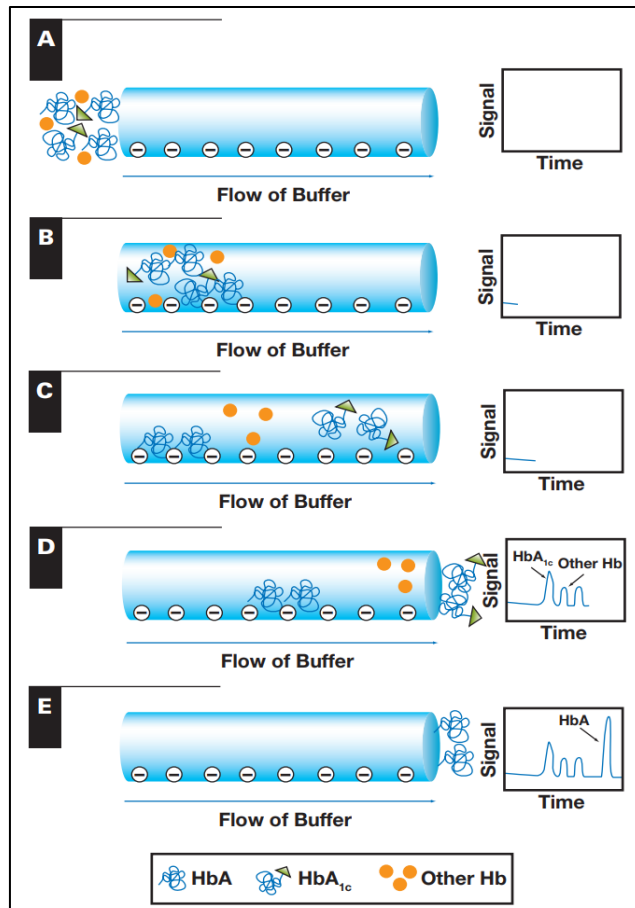


Figure 40. La mesure de l'HbA1c par chromatographie échangeuse de cations (Rhea and Molinaro 2014).

(A) L'injection de l'hémolysât de GR dans la colonne négativement chargée. (B) et (C) l'HbA0 et autres Hb chargées positivement établissent des interactions ioniques avec la résine et migrent plus lentement que l'HbA1c chargée négativement. (D) L'HbA1c est éluée avant l'HbA0. (E) L'éluition d'autres espèces d'Hb qui sont probablement identifiées par la CEC-HPLC sous forme de pics supplémentaires sur le chromatographe (qui n'est pas dessiné à l'échelle).

Les fractions d'Hb sont éluées à différents temps à l'aide d'un tampon de force ionique croissante. Les propriétés physiques telles que la charge et la présence des groupements hydrophiles et hydrophobes déterminent la vitesse de migration des Hb à travers la colonne. Lors de l'éluition, la concentration des fractions d'Hb est mesurée avec un détecteur spectrophotométrique à 415 nm et quantifiée par le calcul de l'aire sous la courbe de chaque pic apparu sur le chromatogramme Les automates utilisent les mêmes principes. Pour déterminer la quantité d'HbA1c dans un échantillon, l'équation suivante est utilisée :

$$\%HbA_{1c} = 100 \times \frac{HbA_{1c}}{HbA + HbA_{1c}}$$

ii) Electroforèse capillaire

L'HbA_{1c} peut être également séparée de l'HbA₀ par la méthode de l'électrophorèse et la seule technique retenue est l'électrophorèse capillaire (CE) en flux liquide. Avec cette méthode, les espèces d'Hb sont séparées en fonction de leur mobilité électrophorétique (définie par la charge et la taille de l'Hb) dans un tampon alcalin à pH spécifique. La séparation des Hb s'effectue au sein d'un tube capillaire en silice (chargé négativement) à faible diamètre interne (inférieur à 25 µm) sous l'effet d'un champ électrique à haute tension qui confère à l'anode une charge positive et à la cathode une charge négative (**Figure 41**). La migration des Hb de l'anode vers la cathode est également fonction du flux électroosmotique. La détection des Hb est réalisée à la fin du tube capillaire, du côté de la cathode à 415 nm par un détecteur optique. Les Hb chargées positivement sont les premières détectées, suivies par les Hb peu chargées et enfin par les Hb chargées négativement. Les résultats sont présentés dans un électrophérogramme et l'aire sous la courbe de chaque pic est calculée.

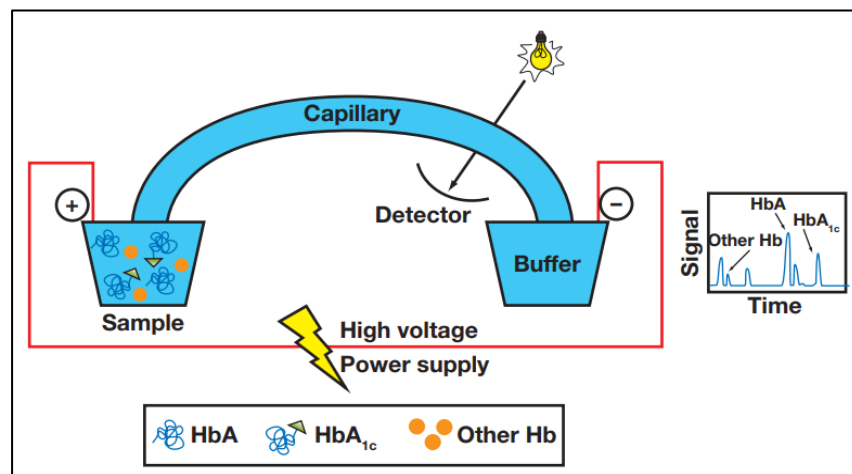


Figure 41. La mesure de l'HbA_{1c} par l'électrophorèse capillaire (EC) (Rhea and Molinaro 2014).

L'EC sépare les espèces d'Hb en fonction de leur mobilité électrophorétique liée à la charge et à la taille. Un champ électrique à haut voltage est appliqué pour faciliter la migration des Hb dans le tube capillaire de l'anode vers la cathode. Les Hb chargées positivement dans l'hémolysât de GR sont détectées en premier lieu, dans l'ordre décroissant à leur ratio charge-masse, suivies par les espèces neutres et en fin par les Hb chargées négativement. L'électrophérogramme (qui n'est pas dessiné à l'échelle) montre la séparation de l'HbA_{1c} de l'HbA₀.

iii) Focalisation isoélectrique capillaire

La méthode de focalisation isoélectrique ou isoélectrofocalisation (CIEF) consiste à séparer l'HbA_{1c} de l'HbA₀ en fonction de leur point isoélectrique dans un gradient de pH. Dans cette méthode, un acide, (généralement l'acide phosphorique) est placé à l'anode comme anolyte et une base (généralement la solution NaOH, la soude) est placée à la cathode comme catholyte (**Figure 42**). Le gradient de pH est créé à l'aide d'un mixte complexe

d'ampholytes (électrolytes de séparation). Une fois le capillaire est rempli d'électrolytes de séparation et d'analyte (le mélange d'Hb à analyser), un champ électrique est appliqué pour permettre aux ions hydroxyde (OH⁻) et hydronium (H⁺) de migrer dans le capillaire et aux ampholytes de s'organiser en fonction de leur pI (les ampholytes acides se placent près de l'anode, et les ampholytes basiques se placent près de la cathode) pour établir ainsi le gradient de pH. Dans ce gradient de pH, les analytes ou les Hb à séparer se focalisent de la manière suivante : si l'Hb se trouve dans le capillaire à un point du gradient où le pH < pI (Hb est chargée positivement), sous l'effet du champ électrique elle migrera vers la cathode jusqu'à atteindre le pH qui égale à son pI (quand le pH = pI, la charge électrique apparente de l'Hb est nulle). A l'inverse, si l'Hb se trouve initialement à un pH supérieur à son pI, elle sera chargée négativement et migrera vers l'anode (Poitevin, 2008 ; Pundir and Chawla, 2014).

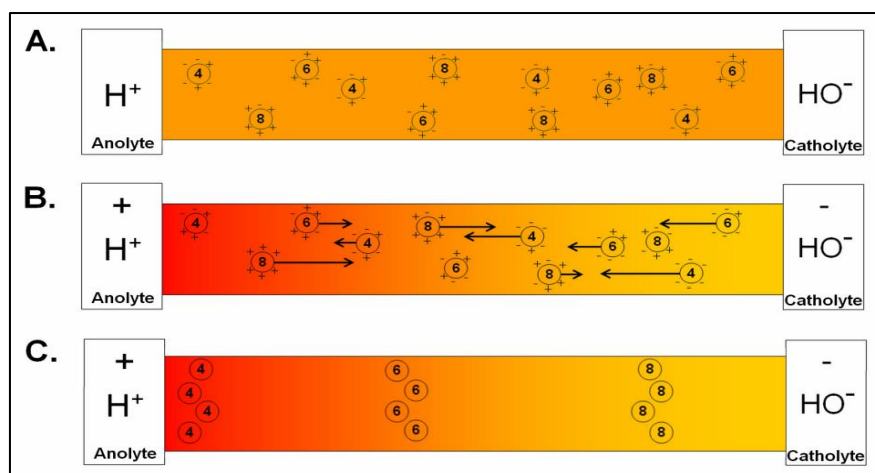


Figure 42. Le principe de la focalisation isoélectrique (Poitevin, 2008).

(A) L'introduction du mélange d'ampholytes dans le capillaire doté à chacune de ses extrémités d'une anode (anolyte) et d'une cathode (catholyte). (B) L'application du champ électrique dans le capillaire entraîne la migration et l'organisation des ampholytes selon leur pI. (C) La formation du gradient de pH.

14.2. Méthodes basées sur la modification de la structure

La différence de structure entre l'HbA1c et l'hémoglobine A0 résulte de la présence du glucose dans l'extrémité N-terminale de l'HbA1c. Le principe des méthodes basées sur la modification de la structure repose sur l'utilisation des techniques contenant des agents capables d'interagir de manière spécifique avec la partie glucidique de l'HbA1c ou de cibler la liaison qui lie le glucose à l'Hb. Ce principe est utilisé dans des méthodes telles que la chromatographie d'affinité au boronate (BAC), les techniques immunologiques, les techniques enzymatiques et l'électrospray-spectrométrie de masse (ESI/MS).

i) Chromatographie d'affinité au boronate

La chromatographie d'affinité (AC) est une méthode de séparation utilisant dans sa phase stationnaire des agents capables d'établir des interactions biologiques ou d'affinité (ligand affinité) avec des analytes bien spécifiques contenues dans un échantillon. Pour l'HbA1c, la chromatographie d'affinité au boronate est une méthode typique à la glycation dont le principe est basé sur l'utilisation de l'acide *m*-aminophénylboranique (appelé aussi acide boronique) capable d'interagir sélectivement avec la configuration *cis*-diol formée entre un glucose stable et une Hb (**Figure 43**).

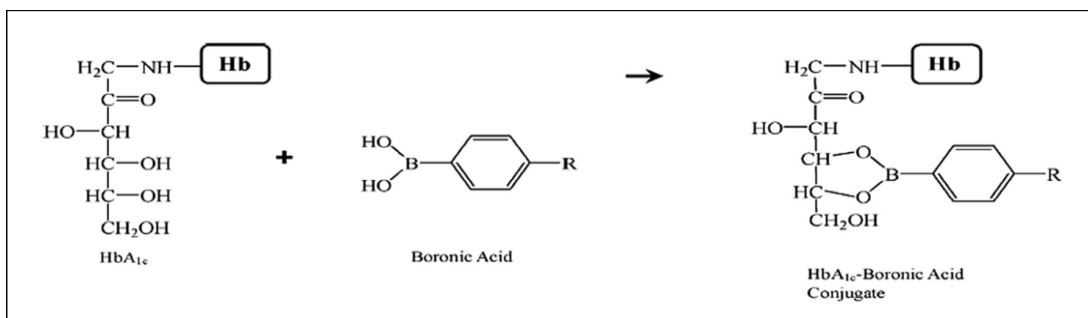


Figure 43. L'interaction entre l'acide boronique et l'Hb1c (Yazdanpanah et al., 2015).

Cette méthode mesure l'ensemble des espèces glyquées, incluant l'HbA1c et les structures cétoamines formées de la glycation des lysines et des résidus valine N-terminale des chaînes α et β globine. La mesure de l'hémoglobine glyquée totale est rapportée dans certains cas sous le nom d'« hémoglobine glyquée totale, *total GHb* » ou de « vraie ou réelle hémoglobine glyquée, *true GHb* » et dans d'autres cas sous l'appellation d'« HbA1c totale, *total HbA1c* » ou « vraie ou réelle HbA1c, *true HbA1c* ». Les deux termes sont considérés valables puisque l'HbA1c corrèle avec l'Hb glyquée totale (GHb). La fraction non glyquée n'ayant pas la liaison *cis*-diol ne se fixe pas à la colonne et est récupérée directement avec le tampon de lavage (**Figure 44**). L'élution de l'Hb glyquée, nécessite l'utilisation du sorbitol qui dissocie l'interaction entre l'acide boronique et le groupement *cis*-diol. La quantification de deux fractions glyquée et non glyquée se fait par la mesure de l'absorbance à 415 nm. Vue l'existence de seulement deux fractions, la proportion de l'Hb glyquée est comparée à celle de l'Hb non glyquée et les résultats sont exprimés en pourcentage (%) d'Hb glyquée (Bry et al., 2001; John 2003; Gupta et al., 2018).

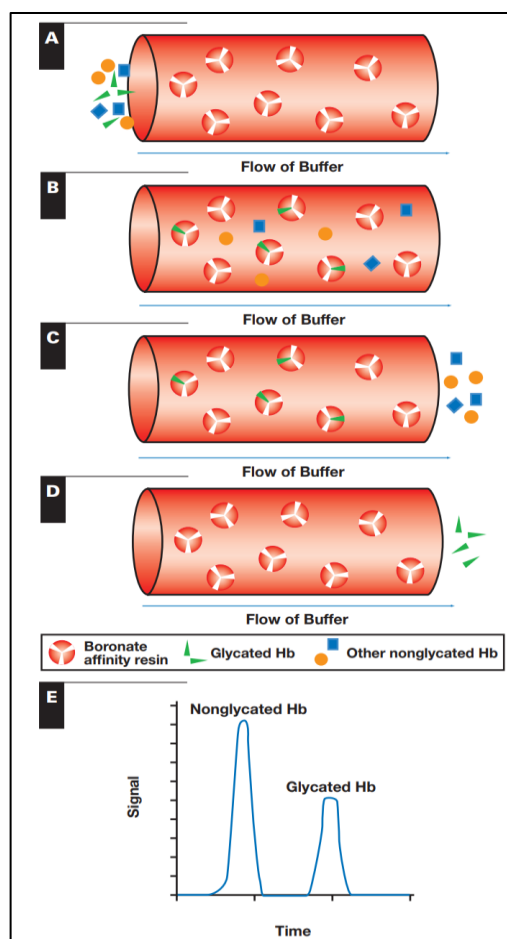


Figure 44. La mesure de l'HbA1c par la chromatographie d'affinité au boronate (Rhea and Molinaro 2014).

(A) L'hémolysat de GR est injecté dans la colonne d'analyse de résine contenant le groupement *m*-aminophenylboranique qui interagit avec la conformation cis-diol des Hb glyquées (B). (C) Contrairement aux Hb glyquées qui restent accrochées à la colonne, les Hb non glyquées sont évacuées avec le tampon de lavage. (D) Un tampon acide est utilisé pour éluer les Hb glyquées. (E) Un chromatogramme simplifié démontrant la séparation des Hb glyquées et non glyquées. La chromatographie d'affinité au boronate mesure l'Hb glyquée totale mais elle rapporte les résultats sous la forme d'un équivalent d'HbA1c corrigée.

ii) Techniques immunochimiques

Une autre stratégie pour exploiter la différence structurale qui existe entre l'HbA_{1c} et l'HbA₀ est de faire appel aux techniques immunologiques qui utilisent des anticorps ciblant des acides aminés proches de l'extrémité N-terminale de la chaîne β glyquée. La première génération de ces techniques avait recours à des anticorps qui reconnaissent les quatre à dix (4 – 10) premiers acides aminés de l'extrémité β N-terminale de l'HbA_{1c}. Le choix de cette « large » séquence en acides aminés a entraîné une interférence analytique en présence des deux variants de l'HbA les plus fréquents (HbS et HbC) ainsi que de plus de 26 autres variants qui peuvent recouvrir cet épitope. Pour remédier à cet inconvénient, d'autres générations de techniques

immunologiques ont été développées dans lesquelles l'épitope des anticorps utilisés cible de plus en plus les tout premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la sous-unité β globine (Rhea and Molinaro 2014).

Le design des techniques immunologiques est variable, cependant le principe est le même. Des anticorps anti-HbA1c en excès sont accrochés sur un support (billes en latex par exemple). En l'absence d'HbA1c, l'agent d'agglutination qui est une molécule synthétique contenant plusieurs copies de la portion immunoréactive de l'HbA1c (épitope HbA1c) bloque les anticorps anti-HbA1c et provoque leur agglutination. Le phénomène d'agglutination a le pouvoir de diffuser de la lumière (Figure 45). La turbidité de l'agglutination mesurée par le turbidimètre ou le néphélomètre entraîne l'augmentation de l'absorbance. Lorsque l'hémolysat de GR est ajouté, l'HbA1c rentre en compétition avec l'agent d'agglutination et inhibe l'agglutination des anticorps anti-HbA1c provoquant ainsi la diminution de l'absorbance. Dans cette méthode, l'Hb totale est mesurée séparément de l'HbA1c, selon un autre principe analytique et le résultat est exprimé en pourcentage d'HbA1c par rapport à l'Hb totale (English et al., 2015).

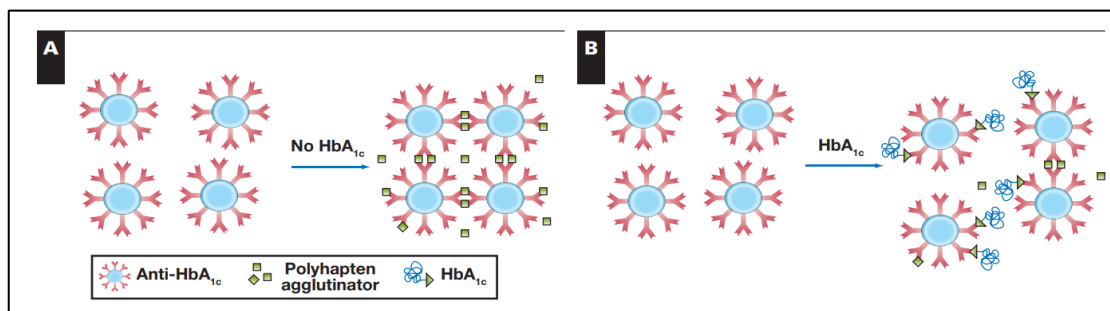


Figure 46. La mesure de l'HbA1c par une technique immuno-chimique de type immuno-inhibition turbidimétrique (Rhea and Molinaro 2014).

(A) En l'absence d'HbA1c, les polyhaptes (molécules synthétiques contenant plusieurs épitope d'HbA1c) interagissent avec les anticorps anti-HbA1c libres formant un complexe immunologique insoluble capable de diffuser de la lumière. (B) L'HbA1c dans l'hémolysat de GR se lie aux anticorps anti-HbA1c formant des complexes antigène-anticorps solubles qui réduisent la diffusion de la lumière. Le taux de la réaction est mesuré en turbidimétrie et est inversement proportionnel à la quantité de l'HbA1c dans l'échantillon.

D'autres techniques immunologiques moins récentes que l'immuno-inhibition turbidimétrique peuvent être également utilisées pour la mesure de l'HbA1C à l'aide d'un anticorps anti-HbA1c spécifique. Parmi ces méthodes, la technique d'immunoabsorption par enzyme liée ou « *Enzyme-linked immunosorbent assay* », ou technique d'ELISA commercialisée en kit et fréquente dans les laboratoires cliniques. Le principe de l'ELISA est basé sur l'utilisation d'une microplaque fixant l'anticorps anti-HbA1c conjugué à la biotine. Lors de l'analyse, l'hémolysat de GR est déposé dans les puits permettant l'interaction anticorps-antigène. Ensuite, une avidine conjuguée à la peroxydase du raifort est ajoutée au mélange dans les puits. La

dernière étape de cette technique consiste à ajouter le substrat de l'enzyme, le 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TBM) et de mesurer en spectrophotomètre le changement de couleur. La plupart des kits disponibles en commerce incluent maintenant des contrôles contenant de faible et de forte quantité d'Hb lyophilisée pour établir la courbe de référence. (Pundir et Chawla, 2014).

iii) Techniques enzymatiques

Les techniques enzymatiques représentent la catégorie de méthodes d'analyse de l'HbA1c la plus récente. Elles ont été développées dans les années 2000. La première étape de ces techniques consiste d'abord à éliminer, à l'aide d'un tampon de lyse contenant des agents oxydants, les molécules de faible et de haut poids moléculaire susceptibles d'interférer avec le signal émis par la molécule d'intérêt. Après la lyse, l'échantillon de sang est soumis à une digestion protéolytique prolongée qui entraînera la libération d'un petit peptide glyqué, la fructosyl valine (FV) constitué de la valine de la N-terminale de la chaîne β liée à la partie glucidique (glucose) (figure 46). La valine glyquée libre sert comme substrat d'oxydation pour l'enzyme recombinante la fructosyl valine oxydase (FVO) qui en déglyquant la valine glyquée N-terminale produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est quantifié en colorimétrie dans une réaction catalysée par la peroxydase du raifort en présence d'un chromogène adéquat. Le signal produit par cette réaction est proportionnel à la quantité de l'HbA1c dans l'échantillon et utilisé pour déduire le % de l'HbA1c en se référant à la droite de calibration linéaire qui exprime l'HbA1c en pourcentage (English et al., 2014 ; Gupta et al., 2018 ; Samanta et al., 2020).

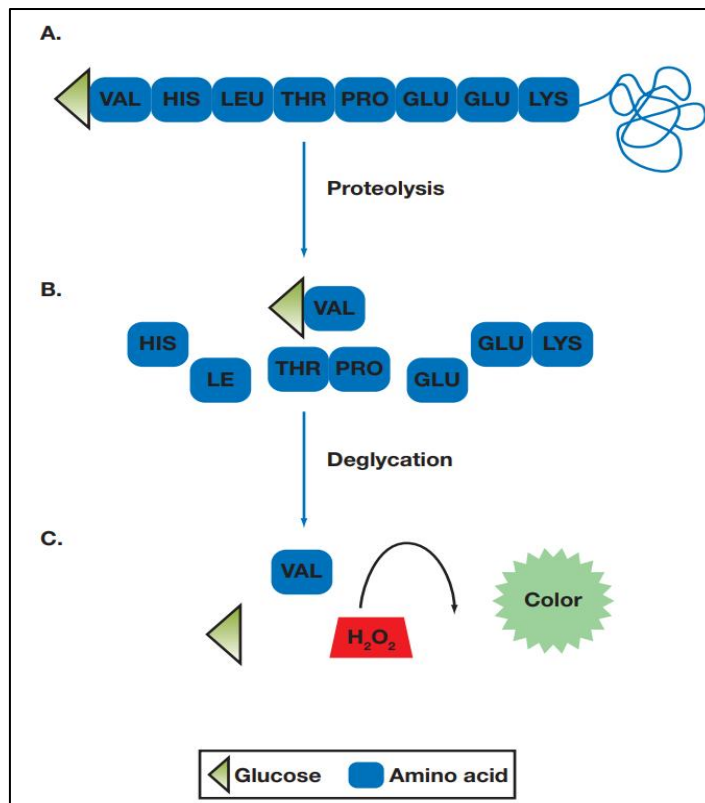


Figure 47. La mesure de l'HbA1c par la technique enzymatique (Rhea and Molinaro 2014).

(A) Les huit acides aminés de la β glyquée de l'HbA sont montrés. En présence d'une protéase et des GR lysés, des acides aminés et de petits peptides (dipeptides) sont libérés incluant les valines glyquées de l'extrémité N-terminale de l'HbA1c. (B) La déglycation enzymatique de la valine glyquée (C) produit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . La formation de l' H_2O_2 peut être mesurée en colorimétrie. Le signal produit est proportionnel à la quantité de l'HbA1c dans l'échantillon.

iv) Électrospray-spectrométrie de masse (ESI/MS)

Une méthode en spectrométrie de masse a été développée pour quantifier spécifiquement l'HbA1c en se basant particulièrement sur le résidu de l'extrémité N-terminale des chaînes β d'Hb. Les Hb préparées à partir des échantillons de sang total sont dénaturées puis injectées dans l'ES-MS. Le clivage enzymatique de la molécule intacte de l'Hb à l'aide de la protéase Glu-C a été optimisé de sorte à obtenir des hexaséptides de l'extrémité N-terminale de la β globine de l'HbA1c ($C_4H_9O_4-CO-CH_2-NH-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-COOH$) et de l'HbA₀ ($NH_2-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-COOH$) (Figure 47).

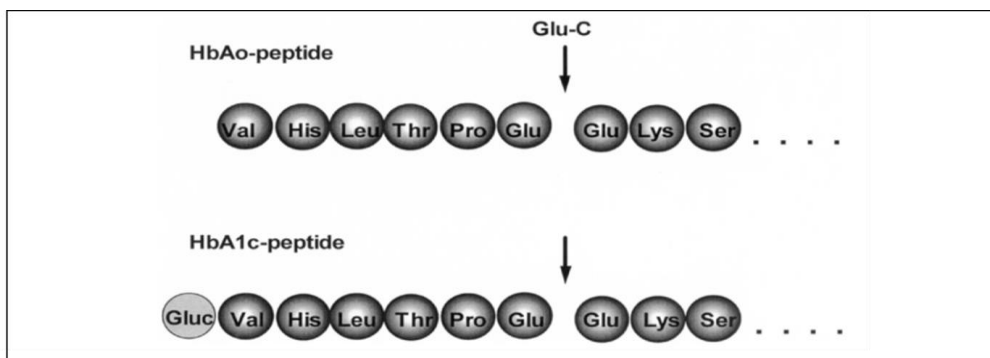


Figure 48. Le principe de la digestion protéolytique des chaînes d'Hb (Jeppsson et al., 2002).

Les peptides générés sont d'abord séparés en chromatographie en phases inverse (en chromatographie de partage à polarité de phases inversée plus précisément) puis quantifiés avec un système de spectrométrie de masse doté d'un mode d'ionisation doux en spray (d'où le nom ESI/MS) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Cette méthode a la capacité de distinguer les petits peptides provenant de l'HbA_{1c} de ceux de la molécule HbA₀ en évitant l'hétérogénéité causée par les différentes modifications dues à la glycation des autres sites de l'Hb (Figure 48). Ce degré de résolution caractéristique à la spectrométrie de masse n'est pas encore atteint par les autres systèmes de séparation de protéines. (Bry et al., 2001 ; Pundir and Chawla, 2014). Ce système est à l'origine de la standardisation internationale de la mesure de l'HbA_{1c}.

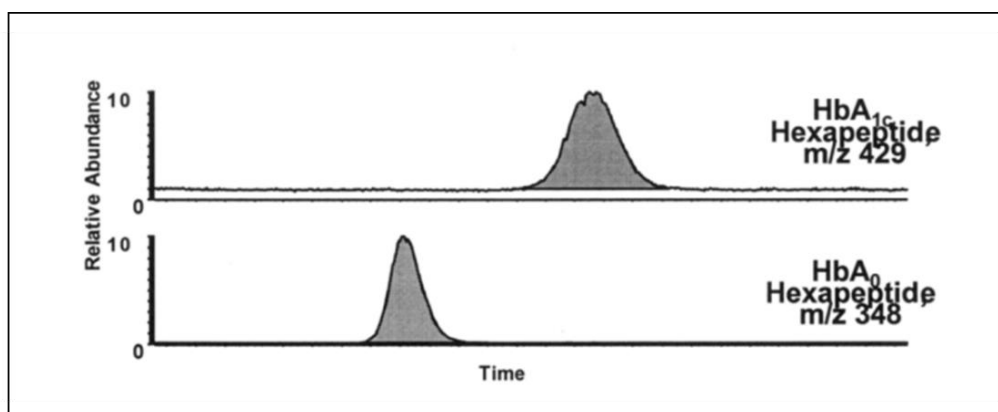


Figure 49. La détection spécifique des hexapeptides de l'extrémité N- Terminale de l'HbA_{1c} et HbA₀ en ESI-MS (Jeppsson et al., 2002).

Le **tableau 6** ci-dessous résume le principe , les avantages et les inconvénients de chaque méthode d'analyse de l'hbA_{1c}.

Tableau 6. Caractéristiques des méthodes d'analyse de l'HbA1c.

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients
HPLC échangeuse de cation	Séparation en fonction de la charge dans une colonne de résine chargée négativement	<ul style="list-style-type: none"> *Rapidité de mesure (2 min). *Reproductibilité (CV <5%) *Bonne résolution *Détection des variants ou des dérivés d'Hb 	<ul style="list-style-type: none"> *Interférence par les variants ou les dérivées d'Hb (HbS, C, D, E, H et HbF) qui co-éluent avec les pics d'intérêt (HbA1c) *Besoin de la thermo-régulation
Electrophorèse capillaire	Séparation en fonction de la charge et de la mobilité électrophorétique sous l'effet d'un flux électroosmotique	<ul style="list-style-type: none"> *Un petit volume d'échantillon. *Précision *Stabilité de 20 jours (1,4%) *CV de la méthode : <5 % *Absence d'interférence par l'HbA1c labile, carbamylée ou acétylée et les variants d'Hb les + fréquents (S, C, D) *Détection de nombreux variants d'Hb 	<ul style="list-style-type: none"> *Interférence par l'HbF et quelques variants d'Hb qui peuvent coéluer avec les pics d'intérêt.
Focalisation isoélectrique capillaire	Séparation en fonction du pI dans un gradient de pH	<ul style="list-style-type: none"> *Rapide, efficace, sensible *Forte résolution *CV de la méthode : 4,3-5,7% mais après utilisation des marqueurs de pI, CV= 0,1-0,3% *Absence d'interférence par l'HbA1c labile ou variants d'Hb *Détection de plusieurs variants d'Hb 	
Chromatographie d'affinité au boronate	Séparation en fonction de la structure et de l'affinité de l'HbA1c pour l'acide boronique	<ul style="list-style-type: none"> *Peu d'interférence analytique par les variants d'Hb *Précision (CV= 1-5%) 	<ul style="list-style-type: none"> *Mesures de toutes les espèces glyquées. Pas seulement l'HbA1c *Incapable de détecter les variants d'Hb

Techniques immunologiques	Séparation en fonction de la structure en utilisant un anticorps visant l'extrémité N-terminale de la β globine	*Absence d'interférence avec la majorité des variants d'Hb surtout avec les nouvelles générations *Absence d'interférence par l'HbA1c labile *Forte corrélation avec l'HPLC échangeuse de cation (ex : Bio-Ras variant) avec $r = 0,986$ à $n = 15$ *CV de la méthode entre les expériences : 2,1-3%	*Incapable de détecter les variants d'Hb à cause de la haute spécificité des nouvelles générations *Calibration non linéaire et stabilité des réactifs limitée nécessitant recalibrations fréquentes à plusieurs niveaux *Hb totale mesurée séparément selon un autre principe analytique
Techniques enzymatiques	Séparation en fonction de la structure en utilisant une enzyme clivant spécifiquement la valine glyquée N-terminale de la β globine	*Absence d'interférence avec la plupart des variants d'Hb	*Comparables à ceux des techniques immunologiques
Electro-spray ionisation-spectrométrie de masse	Séparation après digestion enzymatique et séparation en chromatographie inversée en fonction du ratio masse/charge (m/Z)	*Détection précise de l'HbA1c, des autres Hb glyquées et des variants d'Hb *Stabilité (CV=2%) *Reproductibilité (CV=2,5%) (n= 3 ; avec 250 utilisateurs)	*Equipement onéreux *Résultats difficiles à prédire *Installation complexe

15. Interférences dans l'analyse et l'interprétation de l'HbA_{1c}

Les intérêts qu'offre l'HbA_{1c} dans le domaine médical sont nombreux. Néanmoins, parfois impactée par des interférences de nature physiologique mais également technique, l'HbA_{1c} peut, indépendamment de la concentration du glucose, présenter des limites. Deux catégories d'interférences impactant soit la mesure de l'HbA_{1c} soit son interprétation sont distinguées et développées ci-dessous.

15.1. Facteurs influençant la mesure de l'HbA_{1c}

Les facteurs les plus fréquents qui interfèrent avec les méthodes d'analyse de l'HbA_{1c} sont les variants d'hémoglobine, le taux élevé de l'HbF et les dérivés d'Hb. Leur interférence est

variable en fonction des méthodes utilisées et les connaître aidera à choisir la technique la plus favorable pour chaque situation.

i) La présence des variants d'Hémoglobine.

Plus de 1300 variants d'Hb ont été identifiés dont 70% présentent une mutation au niveau du gène codant la β globine (Xu et al. 2019; Welsh et al., 2016). Bien que la majorité sont rares et cliniquement silencieux, quelques-uns de ces variants d'Hb particulièrement l'HbS, HbC, HbD et l'HbE sont très fréquents dans certaines populations et capables notamment à l'état homozygote de provoquer des maladies sévères. Dans le cas des variants S, C, D et E, la substitution d'acide aminé au niveau de la chaîne β provoque un changement de la charge nette de la molécule de l'Hb. Par conséquent, les méthodes d'analyse d'HbA1c basées sur la modification de charge sont les plus affectées par la présence des variants d'Hb, à condition que le phénomène de glycation ainsi que la durée de vie des GR ne soient pas altérés. Les versions récentes des techniques de chromatographie échangeuse de cations et d'électrophorèse capillaire sont capables dans la majorité des cas de détecter la présence de variants d'Hb même quand ils sont cliniquement silencieux par l'apparition de pics anormaux ou supplémentaires sur le chromatogramme ou l'électrophorégramme (**figure 49**). Les anciennes générations de ces techniques qui peuvent toujours exister dans les laboratoires d'analyse manquent de résolution nécessaire pour différencier entre le pic de l'HbA1c et les pics correspondants aux variants. Pour la chromatographie par échange de cations, le problème se pose lorsque le variant ou sa forme glyquée ne peut être séparé(e) de l'HbA ou de l'HbA1c. En effet, la co-élution du variant ou sa forme glyquée avec l'HbA1c fera augmenter le rapport HbA1c/HbA (**figure 49C**, et **49D**) et induit une surestimation de la valeur de l'HbA1c et, la co-élution du variant avec l'HbA fera chuter le rapport HbA1c/HbA (**figure 49E**) et entraîne la sous-estimation de l'HbA1c. Aujourd'hui, les méthodes citées ci-dessus utilisent l'HPLC et deviennent donc plus précises et capables de séparer la majorité des variants de l'HbA ou de l'HbA1c et même de déterminer leur nature (Bry et al., 2001).

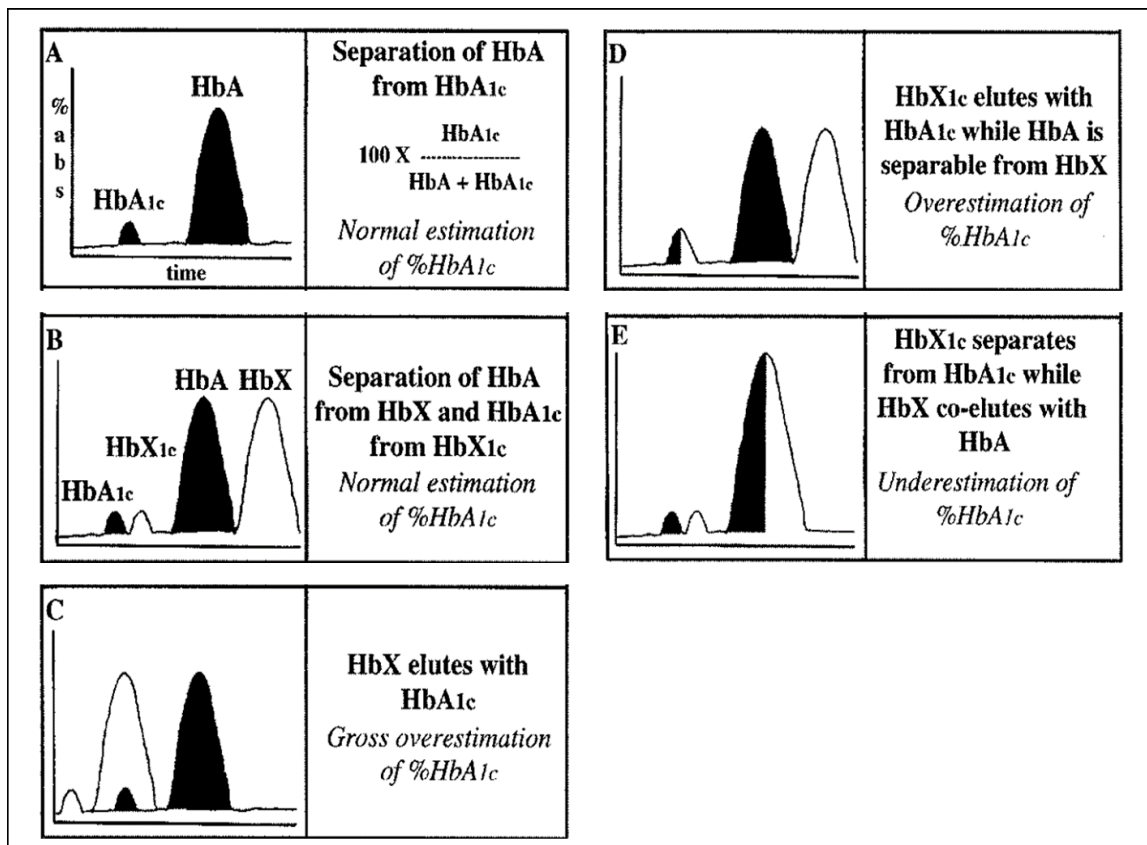


Figure 50. Exemples de chromatogrammes obtenus lors de la détermination du pourcentage d'HbA1c (Bry et al., 2001).

HbA et HbA1c sont indiquées par l'aire sous la courbe des pics noirs et l'HbX et l'HbX1c par l'aire sous la courbe des pics blancs. (A) Le chromatogramme d'un sujet sain. (B) Le variant HbX ainsi que sa forme glyquée (HbX1c) sont entièrement séparés de l'HbA et de l'HbA1c respectivement. La détermination analytique du % d'HbA1c n'est pas affectée. (C) Co-élution de l'HbX et de l'HbA1c entraînant une surestimation importante du % d'HbA1c. (D) Co-élution de l'HbX1c et de l'HbA1c (HbX bien séparé de l'HbA), entraînant une fausse surestimation du % d'HbA1c. (E) Co-élution de l'HbA et de l'HbX (HbX1c bien séparé de l'HbA1c) entraînant une fausse sous-estimation de la valeur calculée du % d'HbA1c.

Les variants d'Hb peuvent également interférer avec les méthodes de mesure de l'HbA1c basées sur la modification de la structure. En effet, la première génération des techniques immunologiques utilise des anticorps qui interagissent avec les 4-10 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale de la sous-unité β de l'HbA1c. L'impact de la présence d'un variant sur la valeur de l'HbA1c varie en fonction de la localisation de la mutation. Les variants présentant une mutation dans la région ciblée par les anticorps seront sources d'erreur de mesure. C'est le cas de l'HbS et de l'HbC. Cependant, l'HbD et l'HbE mutés au niveau des acides aminés distants de cette zone n'altèrent généralement pas les mesures par immunochimie. La mutation au niveau de l'acide aminé constituant le site principal de la glycation altère le taux de glycation et entraîne l'interférence avec certaines méthodes d'analyse. L'exemple qui illustre le mieux ce cas de figure est la présence de l'Hb Raleigh (β 1 Val \rightarrow Ala) ne pouvant pas être glyquée. Les interférences analytiques causées par les variants d'Hb sont d'autant

plus importantes notamment quand l'hémoglobinopathie est asymptomatique et non diagnostiquée.

Un autre type d'interférence, indépendant de la méthode utilisée, peut être causé par la présence des variants d'Hb. Il s'agit de l'interférence avec la durée de vie des GR, un paramètre déterminant du processus de glycation, qui affecte plutôt l'interprétation des résultats de mesure de l'HbA1c. Ce genre d'interférence sera abordé en détail dans la partie qui suit.

ii) Hémoglobine foetale

La présence de l'HbF à des taux élevés dans le GR est considérée comme une autre interférence analytique possible lors de la mesure de l'HbA1c. Pour rappel, les chaînes β n'existent pas dans l'HbF (2 α 2 γ) et la chaîne γ possède une glycine à la place de la valine-1 N-terminale. En l'absence de la chaîne β et de la Val-1 N-terminale, et sachant que la chaîne γ partage seulement 4 acides aminés (de manière dispersée) en commun avec l'extrémité N-terminale de la chaîne β , l'HbF interfère forcément avec les méthodes immunologiques et enzymatiques entraînant ainsi dans les deux cas une sous-estimation de la valeur de l'HbA1c. Le remplacement de la valine-1 par une glycine sujette à l'acétylation réduit le taux de glycation de l'HbF₀, ce qui constituerait une source d'erreur dans l'estimation de la valeur de l'HbA1c analysée par les méthodes basées sur la charge. En effet, en chromatographie d'affinité au boronate, la présence de l'HbF est à l'origine d'une sous-estimation du rapport (Hb glyquée/Hb non glyquée) due à la fois à la diminution du taux de glycation de l'HbF₀ par rapport à celui de l'HbA₀ et à l'élution concomitante de l'HbF dans la fraction d'Hb non glyquée. L'interférence analytique liée à la présence de l'HbF devient significative à partir d'un taux d'HbF situé entre 10 et 15%. Pour chaque augmentation de 1% d'HbF, la valeur de l'HbA1c est diminuée de 1% (10 mmol/mol) avec les méthodes immunologiques et de 0,7% (7 mmol/mol) en chromatographie d'affinité. Pour y remédier à cette interférence, il est important d'isoler l'HbF avant l'analyse de l'HbA1c par ces techniques. Contrairement aux autres méthodes, la chromatographie échangeuse de cations et l'électrophorèse capillaire sont capables de séparer les pics (normal et élevé) d'HbF des pics des autres Hb (A1c, A0) (Bunn and Forget, 1986; Bry et al., 2001).

iii) Hémoglobine carbamylée

En plus des variants génétiques, les Hb modifiées chimiquement peuvent également interférer avec les méthodes de mesure de l'HbA1c, notamment avec celles qui se basent sur la différence de charge. L'hémoglobine carbamylée (Hb carbamoyl, HbCarb) est l'un des dérivés d'Hb les plus fréquents. Sa présence a été détectée chez les patients atteints d'une maladie rénale. La carbamylation est un processus non enzymatique qui se caractérise par l'addition spontanée d'un groupement « carbamoyl » (CONH₂) sur les groupements amines

des acides aminés libres, des peptides et des protéines. La formation du groupement carbamoyl résulte dans la majorité des cas de l'interaction entre l'acide isocyanique, forme réactive du cyanate, et les groupements fonctionnels des protéines. Dans l'organisme, la source principale d'acide isocyanique est l'urée qui est présente normalement dans le plasma à une concentration d'environ 2,5 mM. Néanmoins, chez les patients présentant une insuffisance rénale, cette concentration est augmentée et peut atteindre 40 mM. L'urée se dissocie spontanément en milieu aqueux en cyanate et ammoniac, selon un équilibre défavorable à cette dissociation (moins de 1 % de cyanate formé à l'équilibre). Produit de manière continue, le cyanate établit des liaisons covalentes et irréversibles avec les groupements amines des protéines. Au niveau de l'Hb, cette réaction peut se produire sur les groupements α -NH₂ des acides aminés libres ou en position N-terminale des chaînes α et β globines, mais également sur les groupements ϵ -NH₂ des chaînes latérales des résidus de lysine ou d'arginine, générant alors un produit de carbamylation. L'Hb carbamylée a un point isoélectrique identique à celui de l'HbA_{1c}, ce qui induirait, dans les anciennes chromatographies échangeuses de cations, une co-élution des deux Hb, et par conséquent une surestimation de la valeur d'HbA_{1c}. Avec les automates disponibles actuellement, le pic de l'Hb carbamylée est séparé suffisamment de ceux des autres Hb pour éviter une interférence significative.

iv) Hémoglobine acétylée

Des mutations rares affectant le groupement amine N-terminal de la chaîne β globine peuvent être à l'origine de la formation de l'Hb acétylée *in vivo*. La prise de certaines substances médicamenteuses telles que l'aspirine (acide acétylsalicylique, ASA), de manière chronique et à des concentrations élevées, semble augmenter la concentration de l'Hb acétylée dans l'organisme. De manière générale, l'acétylation est un processus enzymatique catalysé par l'enzyme acétyltransférase qui utilise comme substrat l'acétyl-CoA. L'acétylation se produit avec le groupement NH₂ terminal qui semble dépendre de la structure primaire. En effet, les protéines ayant de l'alanine ou de la sérine au niveau de l'extrémité N-terminale subissent plus rapidement et facilement l'acétylation que les protéines avec une glycine en N-terminal (le cas de l'HbF). Les protéines avec autres résidus d'acides aminés que l'alanine, la sérine et la glycine en NH₂ terminal échappent généralement au processus d'acétylation. L'acétylation peut également avoir lieu au niveau des lysines situées aussi bien sur les chaînes α que les chaînes β globine. Les hémoglobines sont acétylées moins facilement que les autres protéines. Des exemples d'Hb humaines qui interagissent avec le groupement acétyle sont l'HbF (HbF₁) et l'Hb Raleigh. Du point de vue biochimique, l'Hb acétylée se caractérise par l'altération de sa charge nette de protéine et donc de ses propriétés électrophorétiques et chromatographiques. Sa charge négative permet à l'Hb modifiée par l'acétylation d'éluer avant l'HbA₀, comme l'HbA₁. Une éventuelle co-élution de l'Hb acétylée avec l'HbA_{1c} peut

entraîner une surestimation de la valeur de l'HbA1c mesurée notamment avec les méthodes basées sur la modification de charge (Bunn and Forget, 1986).

v) Hémoglobine A1c labile

La forme labile de l'HbA1c, appelée aussi pré-HbA_{1c}, LA_{1c} et produite lors de la phase précoce rapide et réversible du processus de glycation de l'HbA₀, est un autre dérivé d'Hb qui peut interférer avec certaines méthodes de mesure de l'HbA_{1c}. La formation de l'HbA1c labile est estimée à environ 60 fois la formation de l'A1c stable (Bunn, 1981). Cependant, sa concentration est différente d'un patient à un autre mais aussi chez le même patient à des temps différents. Sa variation biologique corrèle fortement avec les fluctuations du taux de glucose dans le plasma (glycémie). Ayant le même point isoélectrique que l'A1c stable, la pré-HbA1c est éluée dans la fraction d'HbA₁ dont la valeur est alors surestimée. Avec la méthode d'HPLC échangeuse de cations, le pic de la forme labile de l'A1c peut être distingué du pic correspondant à l'A1c stable, néanmoins lors d'une augmentation importante et anormale de la pré-HbA1c dans le plasma à cause d'un changement aigu de glycémie, le risque d'erreur de mesure de l'HbA1c devient possible. La forme labile de l'HbA1c peut surestimer la valeur de l'A1c stable de 2 à 3% chez les sujets normaux et jusqu'à 10% chez les patients diabétiques (instables). L'étude de cas effectuée par Singh et al. (2017) démontre de manière très claire l'effet de l'interférence de l'A1c labile sur la mesure de l'HbA1c stable. Dans cette étude, les auteurs ont étonnamment obtenu des interférences sur la mesure de l'HbA1c pour deux patients diabétiques de type 2. La **figure 50** montre les résultats chromatographiques obtenus pour un des patients. Après une analyse profonde et détaillée de tous les pics du chromatogramme du patient en question (**figure 50A**) et en comparaison avec un chromatogramme normal (**figure 50B**), les auteurs ont constaté que la valeur de l'A1c labile anormalement élevée était la source d'erreur de mesure de l'HbA1c. En conclusion, pour minimiser les interférences avec les méthodes de mesure de l'HbA1c, l'HbA1c labile doit être éliminée avant l'analyse (lavage des GR dans une solution saline) ou prendre en considération son pourcentage lors de l'estimation de la valeur de l'HbA1c avec la technique d'HPLC (Singh et al., 2017).

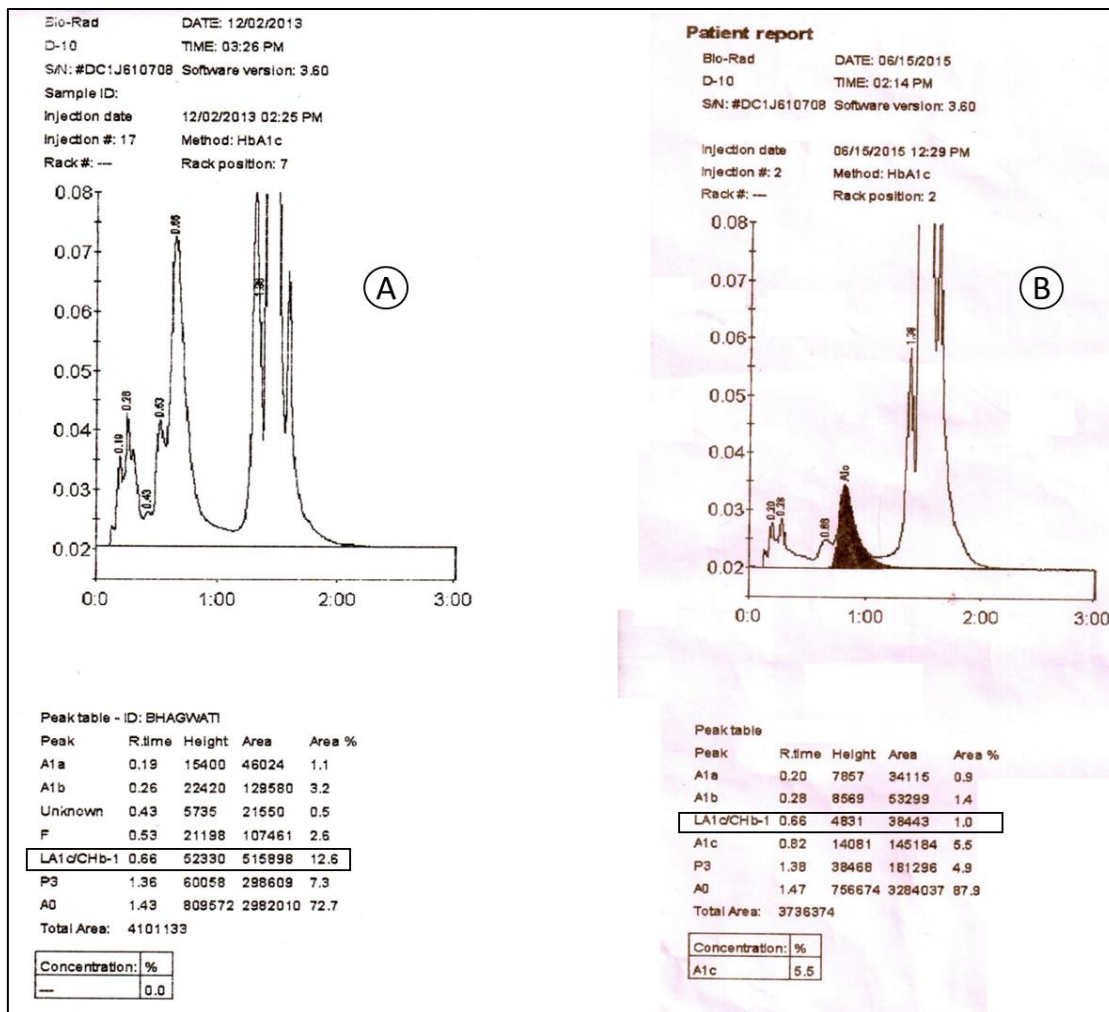


Figure 51. (A) Un chromatogramme avec un pic anormal de la fraction HbA1c labile. (B) Un chromatogramme normal (Singh et al., 2017).

15.2. Facteurs physiologiques influençant l'interprétation de l'HbA_{1c}

i) Durée de vie des globules rouges.

La durée de vie des érythrocytes est un déterminant clé de la valeur de l'HbA_{1c} ; tout ce qui peut réduire la durée de vie ou l'âge moyen des GR réduira la durée d'exposition des GR au glucose, et par conséquent, réduira les valeurs d'HbA_{1c} (Tamimi et al. 2015).

ii) Variabilité inter-individuelle du taux de glycation.

Il est connu que le processus non enzymatique de la glycation est déterminé par les paramètres liés aux deux substrats (glucose et Hb) impliqués dans la réaction chimique, c'est-à-dire la concentration du glucose dans le sang et la durée de vie de l'Hb représentée par la durée de vie du GR. Cependant, un taux de glycation variable d'un individu à un autre a été rapporté. Cette variabilité inter-individuelle a été constatée et expliquée pour la première fois par Yudkin et ses collaborateurs lors de leurs travaux de 1990 qui ont analysé les corrélations

entre le taux de l'HbA1c et la glycémie moyenne de 223 individus sains âgés de plus de 40 ans. Les résultats obtenus ont montré que 42 sujets ont un taux élevé (20 individus) et un taux faible (22 individus) d'HbA1c par rapport à leur glycémie à 2h (**figure 51**) (Yudkin et al., 1990). La découverte de l'existence de tels cas où les valeurs d'HbA1c ne reflètent pas les valeurs de la glycémie moyenne a permis de définir deux phénotypes de glycateurs « glycateurs forts ou rapides » et « glycateurs faibles ou lents » qui ont respectivement les valeurs d'HbA1c supérieures et inférieures à celles de de la glycémie (à jeun ou en post prandiale).

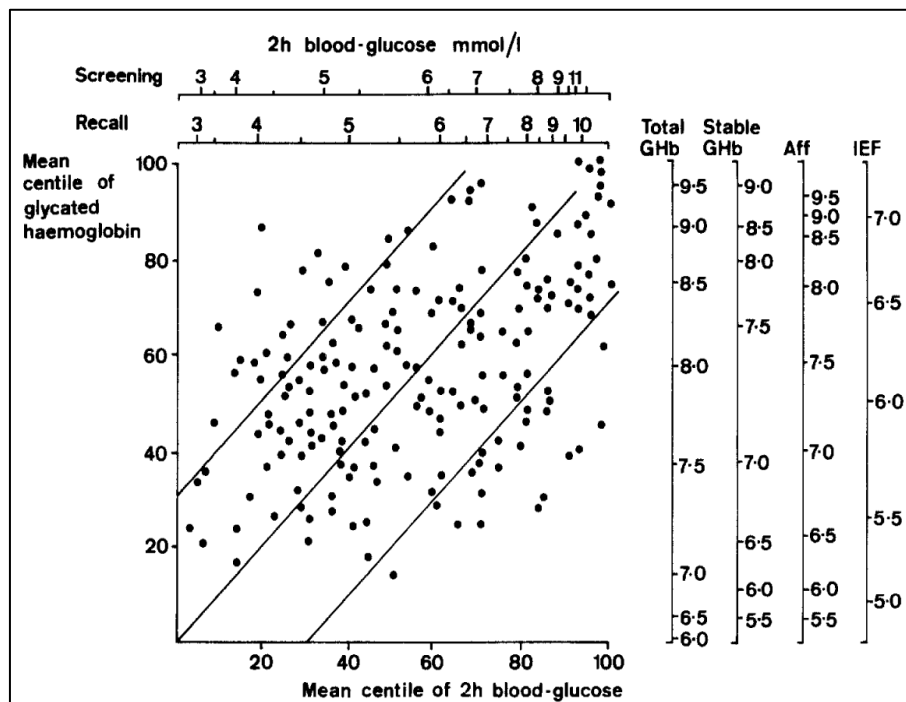


Figure 52. Les étendues et les écarts de percentile moyen de glycémie à 2h et de dosage d'HbA1c à la visite de sélection (screening) et au rappel (recall) (Yudkin et al., 1990).

Les lignes de percentiles de convergence, de +30 et de -30 sont indiquées et définissent les sujets avec un taux élevé et un taux faible d'HbA1c respectivement. Toutes les mesures de la glycémie à 2h et de l'HbA1c à la sélection et au rappel sont indiquées. L'Hb glyquée totale est mesurée par 4 méthodes différentes : sur gel d'électrophorèse sans élimination de l'A1c labile (Total GHb), avec élimination de la labile (Stable GHb), par chromatographie d'affinité (Aff) et par focalisation isoélectrique (IEF).

« *The Islington Diabetes* » connue actuellement sous le nom de « *Diabetes UK* » a suivi ces 42 individus au fil des années. Après 4 ans de suivi, les deux groupes ont gardé leurs profils de glycateurs forts et de glycateurs faibles indiquant ainsi que le phénomène n'est pas transitoire. D'autres travaux de recherche qui avaient pour objectif de vérifier l'existence de ce même phénomène chez d'autres populations d'individus telles que les adultes diabétiques de type 1 (Hudson et al., 1999) et les enfants et les adolescents atteints du diabète de type 1 (Hempe et al., 2002) ont confirmé les résultats de Yudkin et al. Les auteurs de ces études ont alors suspecté l'implication d'autres facteurs physiologiques ou génétiques (autres que la

durée de vie des GR et la concentration en glucose dans le sang) qui ont la capacité d'influencer ou de réguler le processus de glycation d'Hb.

Les facteurs influençant le taux de glycation de l'Hb de manière glucose-indépendante, rapportés par certaines études sont la saturation en oxygène (état oxygéné/ désoxygéné de l'Hb), le niveau de 2,3 diphosphoglycérate au sein du GR, le pH intracellulaire et la perméabilité membranaire au glucose (Higgins and Bunn 1981; Gould et al.,1997; Snieder et al., 2001). Contrairement aux autres paramètres qui varient peu *in vivo*, la perméabilité membranaire du GR au glucose semble être le troisième déterminant clé de la glycation de l'Hb, qui d'ailleurs peut expliquer les discordances détectées entre les valeurs de l'HbA1c et de la glycémie moyenne chez les 42 individus précédemment cités. En effet, dans les travaux de Khera et al. (2008), les données ont montré 1) qu'à l'état d'équilibre, il existe un gradient de concentration de glucose à travers la membrane du GR humain qui varie d'un individu à un autre, 2) ce gradient ne dépend pas, selon les auteurs de cette étude, du métabolisme de glucose, de la concentration de l'Hb, de l'ATP ou du gradient transmembranaire de cations, 3) mais il corrèle avec l'A1c par un mécanisme indépendant du glucose. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse que l'hétérogénéité inter-individuelle du gradient de glucose à travers la membrane du GR serait à l'origine de la variabilité du taux de glycation d'un individu à un autre.

L'étude réalisée par Snieder et al. (2001) chez les jumeaux non diabétiques et diabétique de type 1a révélé que 62% des déterminants inter-individuels des valeurs de l'HbA1c sont d'origine génétique (figure 52). Le pourcentage restant est attribué à l'environnement (23%) et à l'âge (14%).

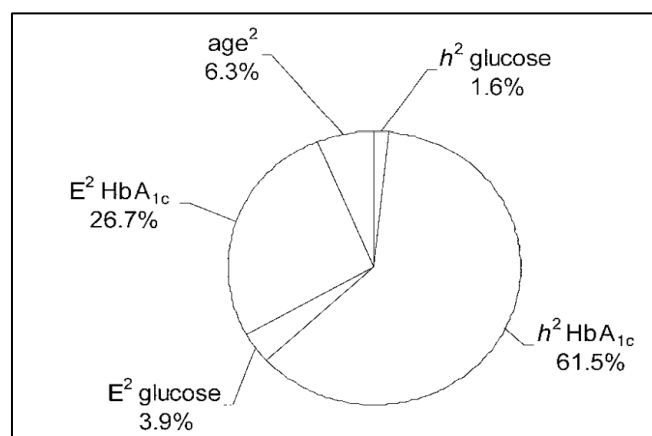


Figure 53. Sources de variabilité de l'HbA1c exprimées en pourcentage selon le meilleur modèle d'ajustement multivariées (Snieder et al. 2001).

h^2 HbA1c, composante de la variance génétique (hérédité) influençant spécifiquement l'HbA1c. **h^2 glucose**, influence génétique liée au glucose sur l'HbA1c. **E^2 HbA1c**, composante de la variance environnementale influençant spécifiquement l'HbA1c. **E^2 glucose**, influence environnementale sur l'HbA1c liée au glucose. **age^2** , composante de la variance due à l'âge (Snieder et al., 2001).

Plusieurs études d'association génétiques pangénomiques (*genome-wide association study*, GWAS) réalisées sur des cohortes de population européenne assez considérables ont révélé des associations entre l'augmentation ou la diminution de l'HbA1c et des polymorphismes au niveau de certains gènes. Un certain nombre de variants de gènes ont été identifiés. Les variants les plus fréquents peuvent affecter la valeur d'HbA1c à travers le taux de glucose ou via la biologie/physiologie du GR. Les résultats des études GWAS ont indiqué qu'il existe 3 gènes candidats qui sont associés à la glycémie à jeun et au risque de diabète de type 2 (GCK, codant pour la glucokinase, G6PC2, glucose-6-phosphatase 2, et MTNR1B, récepteur de la mélatonine), à la concentration de glucose en général. Les variants des autres gènes identifiés affectent l'A1c par un mécanisme indépendant de glucose. Parmi ces variants, *HK1* codant l'héxokinase 1 (enzyme catalysant la première étape de la glycolyse) ; *ANK1*, ankyrine (protéine de la membrane plasmique) ; *SPTA1*, spectrine (protéine de la membrane plasmique) associés avec des anémies héréditaires ainsi qu'avec quelques paramètres hématologiques (la diminution de la quantité d'Hb et la diminution de l'hématocrite) qui entraînent l'augmentation du pourcentage de l'HbA1c en augmentant le rapport molaire glucose/Hb. Les données obtenues de GWAS ont également mis en évidence un variant du gène *FN3K* codant pour la fructosamine 3-Kinase, enzyme de déglycation, qui peut éventuellement induire une variation de la valeur d'HbA1c (Paré et al., 2008; Bonnefond et al., 2009). Cependant les travaux de Delpierre et al. (2006) ont montré que bien qu'une large variabilité inter-individuelle existe entre les activités FN3K les plus basses et les plus élevées, il n'y a pas une différence entre les activités FN3K moyennes mesurées dans les GR de sujets normoglycémiques (n=26) ou de diabétiques de type 1 (n=31).

iii) Age, genre et ethnicité.

L'âge, le genre et l'ethnicité sont des paramètres biologiques non glycémiques qui peuvent interférer avec l'interprétation des résultats de l'HbA1c. Les données obtenues de la méta-analyse de *Framingham Offspring Study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004* menée sur une cohorte ethniquement hétérogène d'individus non diabétique (n= 5743) a montré une association positive entre l'A1c et l'âge ($P<0,0001$). Les auteurs de l'étude ont rapporté une augmentation de 0,010 à 0,014 unités de mesure de l'HbA1c par an, l'équivalent d'environ 0,1 par décennie. Une telle augmentation pourrait être expliquée par un éventuel changement au niveau du taux de glycation associé au vieillissement normal de l'être humain (Pani et al., 2008; Welsh et al., 2016; Campbell et al., 2019).

Une large étude chinoise a confirmé l'effet de l'âge sur l'augmentation de la valeur d'HbA1c qui, selon les auteurs, est due aux changements qui se produisent normalement au fil du processus de vieillissement comme i) la fonction des îlots pancréatiques qui déclinent progressivement, ii) la sensibilité des tissus à l'insuline et à l'activité des récepteurs de l'insuline

qui diminuent lentement, et iii) le tissu musculaire qui se réduit progressivement et qui consomme de moins en moins le glucose. La même étude a aussi rapporté que les taux d'HbA1c sont significativement plus élevés dans le groupe des hommes ($n= 11779$) que dans le groupe des femmes ($n= 6495$), ($P<0,0001$). (Figure 53), dans les groupes de 30 – 59 ans. Les auteurs de cette étude pensent que cette différence est due probablement à la pression artérielle et aux lipides sanguins chez les hommes d'un côté et au cycle de menstruation qui est à l'origine de la diminution de la quantité d'Hb et d'un turnover de GR plus rapide chez les femmes d'un autre côté (Ma et al., 2016).

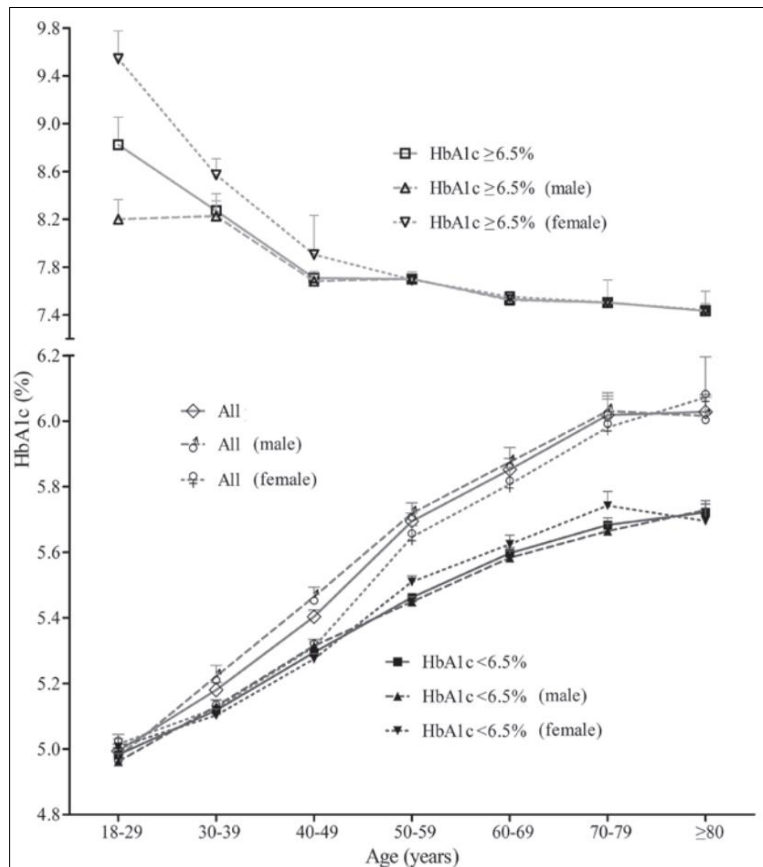


Figure 54. Le taux d'Hb A1c dans sept classes d'âge. Les barres d'erreurs représentent l'IC95% dans chaque classe (Ma et al. 2016).

Des études analysant les taux d'HbA1c chez plusieurs populations ayant des origines différentes ont observé des différences ethnicié-dépendantes dans les valeurs de l'A1c. Le cas le plus étudié est celui des afro-américains qui manifestent des taux d'HbA1c plus élevés que ceux des populations d'origine européenne (revue de Cavagnoli et al., 2017).

D'autres travaux de recherche obtiennent des données qui soit ne confirment pas les différences significatives au niveau des valeurs d'HbA1c en fonction de l'âge, du genre ou de

l'ethnicité soit rapportent des différences significatives mais dans les sens opposés (English et al., 2015; Welsh et al., 2016; Campbell et al., 2019b).

iv) Insuffisance rénale chronique.

Chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique, la durée de vie des GR est réduite, ce qui diminue l'HbA1c. En outre, l'utilisation de l'érythropoïétine pour stimuler l'érythropoïèse entraîne une augmentation consécutive du nombre de jeunes GR, ce qui réduit encore plus la valeur de l'HbA1c (Welsh et al., 2016).

v) Carence en fer (anémie ferriprive) ou augmentation de la charge en fer

Une étude comparant l'HbA1c de patients présentant une anémie ferriprive (IDA) à celle de donneurs sains a montré que la valeur moyenne de l'HbA1c calculée était plus élevée chez les patients anémiques par carence en fer ($7,4\% \pm 0,8$) que chez les individus non malades ($5,9\% \pm 0,5$) ($p < 0,001$). Une diminution de la valeur de l'HbA1c ($6,2\% \pm 0,6$) ($p < 0,001$) a été détectée chez les patients avec l'IDA suite à l'administration d'une supplémentation en fer (Coban et al., 2004). Cette réduction du taux d'HbA1c est expliquée par l'augmentation de la proportion des GR jeunes circulants induite par la régulation positive de l'hématopoïèse exercée par l'apport de fer (Campbell et al., 2019b). Cependant, en clinique, le dépistage de la carence en fer n'est pas recommandé lors de l'utilisation de l'HbA1c pour le diagnostic car il a été rapporté dans d'autres études que la différence moyenne absolue en termes d'HbA1c entre la population riche et la population pauvre en fer était seulement de 1 mmol/mol (0,1 %) (Campbell et al., 2019b).

vi) Prise de certains médicaments.

La prise de certains médicaments est susceptible théoriquement d'entraîner une interférence avec l'interprétation de la valeur de l'HbA1c (et même avec sa mesure). Néanmoins, seulement quelques médicaments sont rapportés dans la littérature pour leur capacité à induire une variabilité de l'HbA1c.

Médicaments augmentant le taux de destruction des globules rouges. Tous les médicaments capables de provoquer une hémolyse ont le pouvoir de baisser la valeur de l'HbA1c par deux mécanismes : la réduction de la durée de vie des GR et l'augmentation de la proportion des GR jeunes dans le sang périphérique. Parmi ces médicaments, il y a la dapsons, la ribavirine ainsi que les antirétroviraux (Unnikrishnan et al., 2012).

Aspirine. L'exposition de l'hémoglobine à de fortes concentrations d'aspirine appelée aussi acide acétylsalicylique favorise son acétylation, ce qui peut conduire à une surestimation des taux d'HbA1c en raison de l'interférence avec certains tests utilisés. Dans l'étude de Camargo, bien qu'elle ne soit pas cliniquement pertinente, une augmentation de 0,17% de l'HbA1c a été

rapportée chez 28 sujets non diabétiques ayant reçu une dose de 200 mg/jour d'aspirine pendant 4 mois (Camargo et al., 2006). Toutefois, dans autre étude menée en 2008 par le même auteur, chez les patients diabétiques, aucune interférence de l'aspirine avec la valeur mesurée d'HbA1c n'a été détectée. Il semble qu'en clinique, l'effet sur l'HbA1c par l'aspirine existe seulement si cette dernière est administrée à des doses importantes pendant une longue période.

Hydroxyurée. Il a été rapporté que l'hydroxyurée, médicament traitant les troubles myéloprolifératifs et la drépanocytose, agit comme un antimétabolite qui favorise le passage de l'HbA à l'HbF. Il en résulte une diminution apparente de la concentration d'HbA1c (Samanta 2020).

Vitamines C et E. L'utilisation d'agents antioxydants tels que les vitamines C et E aurait la capacité de protéger l'Hb contre la glycation et entraînerait donc des taux faibles d'HbA1c. Cependant, leur effet est incertain puisque dans l'étude de Camargo, aucun impact sur les valeurs d'HbA1c n'a été observé après administration de ces vitamines à des doses pharmacologiques chez les patients diabétiques (Camargo et al., 2006).

16. Standardisation de la mesure de l'HbA1c

Rapidement après l'introduction de l'HbA1c dans la pratique clinique pour la surveillance de l'équilibre glycémique, des différences significatives dans les résultats entre les laboratoires et au sein du même laboratoire sont détectées et devenues évidentes. Les différences entre les laboratoires sont liées au large éventail de méthodes analytiques utilisées pour mesurer l'Hb glyqué, chacune ayant son propre principe de dosage (différents principes de séparation), sa propre définition de l'analyte (HbA1c, HbA1c labile, Hb glyquée totale) et sa propre spécificité (HbF, Hb carbamylée, Hb acétylée) (Weykamp et al., 2009). Le manque de normalisation peut entraîner une grande variabilité des résultats allant de 4,0% jusqu'à 8,1% sur le même échantillon, ce qui rend la comparaison des résultats des patients entre les laboratoires difficile voire impossible. Cette disparité a été une source d'anxiété chez les prestataires de soins de santé notamment après la publication des données obtenues de deux grandes études épidémiologiques, l'étude DCCT (*Diabetes Control and Clinical Trial*) et l'étude UKPDS (*United Kingdom Prospective Study of Diabetes*) qui ont montré qu'une diminution de 1 point de l'HbA1c réduisait de 10 à 30% le risque de complications microangiopathiques et de 15% environ le risque d'infarctus du myocarde chez les patients diabétiques (de type 2) (Rohlfing et al., 2008). Pour surmonter le problème de l'absence de standardisation internationale, plusieurs pays ont décidé de développer des programmes nationaux de normalisation dont les plus importants sont les suivants : le programme NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) aux États-Unis, basé sur l'utilisation de l'HPLC comme méthode de comparaison désignée, le programme établi par la suède utilisant la chromatographie par échange d'ions Mono S et le

programme japonais utilisant des calibrateurs communs avec des valeurs d'HbA1c attribuées par la *Japan Diabetes Society* (John, 2003). Les trois programmes nationaux de normalisation permettent d'harmoniser les résultats, mais aucun d'entre eux ne reflète la véritable HbA1c et les différences entravent les comparaisons internationales (Weykamp et al.; 2009). Pour y remédier à cette problématique, et afin de parvenir à une normalisation mondiale et de répondre aux exigences de la directive de l'Union européenne sur les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*, la Fédération internationale de chimie clinique (IFCC) a pris l'initiative de développement d'une normalisation internationale uniforme de l'HbA1c. En 2002, une méthode de référence qui repose sur une HPLC en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse ou à l'électrophorèse capillaire a été décrite (Figure 54).

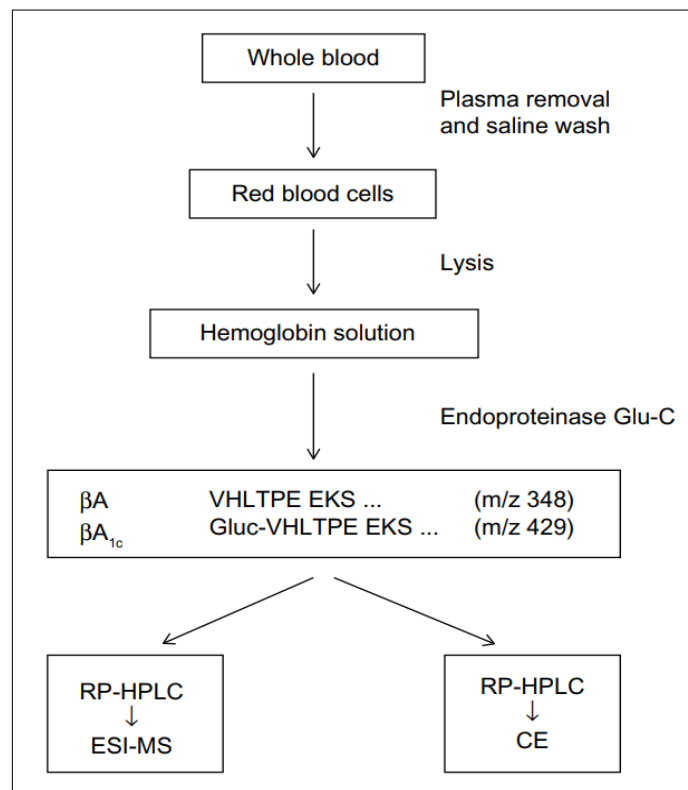


Figure 55. Organigramme de la procédure de mesure de l'HbA1c de la référence IFCC (John 2003).

Abréviations : (CE, Electrophorèse capillaire), (ESI-MS, Électrospray ionisation-spectrométrie de masse), (IFCC, Fédération internationale de chimie clinique et de médecine de laboratoire), (RP-HPLC, HPLC en phases inverse), (m/Z, rapport masse/charge).

Des mélanges composés d'HbA1c et d'HbA0 pures ont été développés pour l'étalonnage de la méthode de référence. La normalisation IFCC a permis de définir l'analyte (HbA1c) comme étant une Hb qui est irréversiblement glyquée au niveau de l'une ou des deux valines N-terminales des chaînes β-globine. Cette définition couvre également l'Hb qui est en plus

glyquée à n'importe quel résidu de lysine dans la chaîne β . Cependant, l'Hb glyquée seulement sur un site lysine n'est pas incluse dans la mesure de l'HbA1c. Vu que la mesure de l'HbA1c à l'aide de la norme de référence de l'IFCC donne des valeurs d'HbA1c inférieures de 1,5 à 2,0% à celles obtenues avec la normalisation du NGSP, une équation directrice a été établie pour convertir les résultats d'un système de référence à l'autre (Lapolla et al., 2005).

17. HbA1c comme marqueur d'équilibre glycémique

L'HbA1c est utilisée pour surveiller le contrôle de la glycémie dans le monde entier. Son taux est plus élevé chez les patients diabétiques qui, par définition, sont hyperglycémiques. L'intérêt du dosage de l'HbA1c dans la prise en charge du diabète a été montré dans de nombreuses études. En effet, dans les études DCCT et UKPDS concernant respectivement les patients diabétiques de type 1 et de types 2, les auteurs ont clairement montré l'existence d'une relation entre le taux d'HbA1c, la glycémie moyenne, et le risque de complications chroniques (complications microvasculaires essentiellement) associée à la maladie. L'HbA1c, contenue dans un GR dont la durée de vie moyenne est de 120, a une demi-vie relativement longue. La raison pour laquelle son dosage permet donc d'évaluer la glycémie moyenne au cours des 2 – 3 derniers mois (Sepulchre et al., 2014). Cependant, il est important d'évoquer une petite nuance. Plusieurs études cinétiques et essais cliniques ont révélé que les valeurs d'HbA1c sont plus influencées par la glycémie dans le passé récent que dans le passé lointain. Ainsi, la contribution du premier, du deuxième et du troisième dernier mois à la valeur finale de l'HbA1c est de 50%, 40% et 10% respectivement. Le même résultat a été obtenu par la modélisation mathématique qui a estimé le $t_{1/2}$ de l'Hb glyquée à 35,2 jours en confirmant que la moitié de la glycation observée pendant l'estimation a eu lieu au cours des 35,2 jours précédents (Chandalia and Krishnaswamy, 2002). Selon les recommandations de l'association américaine pour le diabète (ADA) et l'organisation mondiale de la santé (WHO), un seuil d'HbA1c $\geq 6,5$ est limité pour le diagnostic du diabète. Le stade de prédiabète est défini avec des valeurs d'HbA1c situées entre 5,7% et 6,4% (Samanta 2020).

Durée de vie réduite des globules rouges drépanocytaires et rôle de l'hémoglobine fœtale dans l'allongement de leur durée de vie

18. Drépanocytose

18.1. Epidémiologie, distribution et coût des soins

18.2. Rappels sur la physiopathologie

19. Durée de vie des globules rouges drépanocytaires

20. Variabilité clinique de la drépanocytose

21. Modulation génétique de la sévérité de la drépanocytose par l'hémoglobine fœtale

21.1. Pourcentage et distribution globulaires de l'hémoglobine fœtale

21.2. Effet de l'hémoglobine fœtale sur la polymérisation de l'hémoglobine S

21.3. Effet de l'hémoglobine fœtale sur l'hémolyse

21.4. Effet de l'hémoglobine fœtale sur la durée de vie des globules rouges drépanocytaires

22. Hydroxyurée et son induction de l'hémoglobine fœtale

23. Autres stratégies thérapeutiques impliquées dans l'induction de l'hémoglobine fœtale

Chapitre IV : Durée de vie réduite des globules rouges drépanocytaires et rôle d'hémoglobine foetale dans l'allongement de leur durée de vie

18. Drépanocytose

18.1. Epidémiologie, distribution géographique et coût des soins

La drépanocytose est la première maladie monogénique en France comme dans le monde. Elle a été reconnue comme un problème de santé publique en 2004 en France, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2006 et par l'Organisation des Nations-Unies (ONU) en 2008 (Oudin-Dogliani et al., 2019). Selon l'analyse fournie par l'étude de la charge mondiale de la maladie (*Global Burden of Disease Study*), environ 3,2 millions de personnes vivent avec une drépanocytose, 43 millions de personnes ont un trait drépanocytaire (ou porteuses de la mutation, AS) et 176.000 personnes meurent chaque année de complications liées à la drépanocytose (Sundd et al., 2019). Le nombre des nouveau-nés atteints de la maladie qui naissent chaque année est recensé à 300.000 cas. Ce nombre devrait augmenter de façon exponentielle, pour atteindre, selon les estimations de Piel et al. (2013), 14.242.000 enfants portant la drépanocytose d'ici 2050 (Cisneros and Thein 2020). En France, en 2010, l'incidence de la drépanocytose en métropole était de 1/2.364, les 3/4 des malades étant concentrés dans la région Île-de-France où l'incidence à naissance était de 1/780 (Mattioni et al. 2016; Oudin-Dogliani et al. 2019). La drépanocytose est répandue dans les régions du bassin méditerranéen et du Moyen-Orient mais sa prévalence est élevée en Inde et en Afrique subsaharienne en raison du niveau de protection que le trait drépanocytaire confère contre le paludisme (**Figure 55**). En effet, des études épidémiologique ont démontré un chevauchement entre la distribution géographique de drépanocytose et le paludisme transmis par *Plasmodium falciparum*. La drépanocytose s'est ensuite propagée bien au-delà de ses origines par les mouvements de population (esclavage, guerre, colonisation et émigration) dans d'autres parties du monde (Piel et al., 2017; Piccin et al. 2019). Les complications cliniques associées à la drépanocytose nécessitent souvent une intervention médicale et une hospitalisation avec des frais médicaux élevés. Par exemple, aux Etats-Unis (US), pour l'année 2004, 113.000 patients atteints de la drépanocytose ont été hospitalisés pour un coût de 488 millions de dollars (Tebbi, 2022).

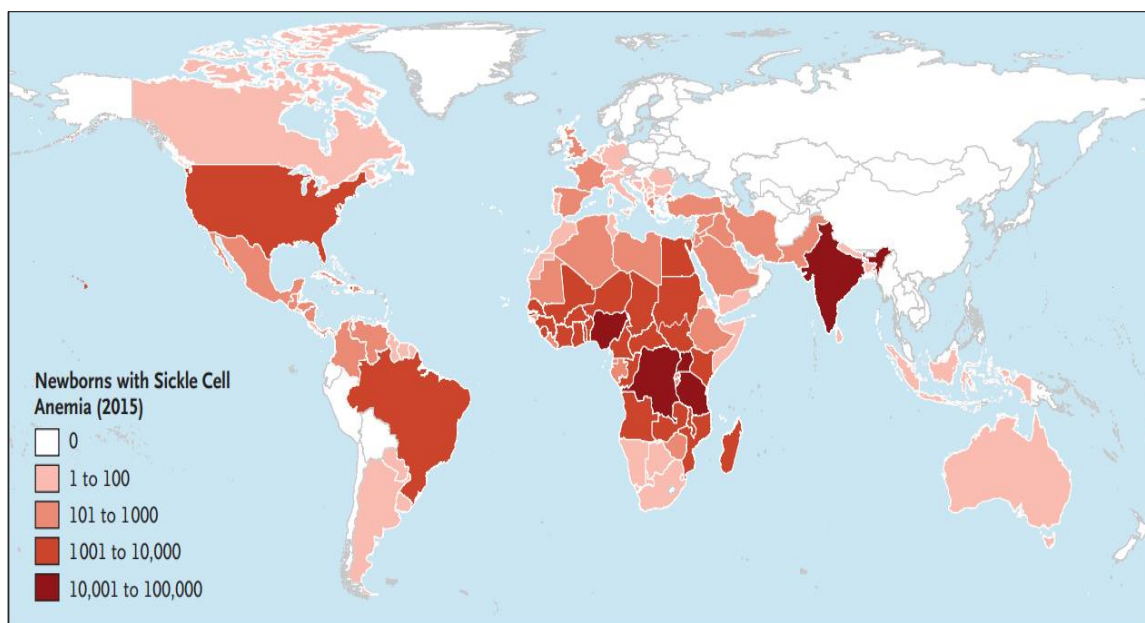


Figure 56. Nombre de nouveau-nés atteints d'anémie drépanocytaire dans chaque pays en 2015 (Piel et al., 2017).

Les données sont basées sur les estimations de Piel et al. L'Alaska est présenté séparément du reste des États-Unis.

18.2. Rappels sur la physiopathologie

La drépanocytose est considérée comme le premier exemple de « maladie moléculaire » causée par la production d'une protéine anormale appelée hémoglobine S (HbS) découverte par Linus Pauling et ses collègues en 1949. L'anomalie de cette protéine qui réside au niveau d'un acide aminé de la chaîne β -globine ($\beta^6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$) a été mise en évidence en 1956 par Vernon Ingram. La connaissance de ces éléments a permis d'élaborer, vers les années 60-70, un premier schéma cohérent expliquant la physiopathologie de la drépanocytose basé sur la polymérisation de l'HbS dans les conditions désoxygénées. Bien qu'il illustre les mécanismes de base des événements caractéristiques de la drépanocytose tels que la vaso-occlusion et l'anémie hémolytique, ce schéma initial ne prend pas en considération les éléments déclenchant la vaso-occlusion. Des données apportées par d'autres travaux de recherche ont indiqué l'implication directe de plusieurs autres facteurs incluant l'endothélium vasculaire, les interactions cellulaires multiples et complexes, et l'activation cellulaire globale médiée par l'inflammation, dans l'initiation et la propagation du processus vaso-occlusif (Figure 56) (Odièvre et al. 2011). Au cours de la dernière décennie, d'autres processus participant à la physiopathologie de la drépanocytose (la vaso-occlusion, l'hémolyse et le dysfonctionnement endothélial ainsi que l'inflammation stérile) ont été caractérisés (Sundd et al., 2019). Le dernier processus ne sera pas discuté dans ce chapitre.

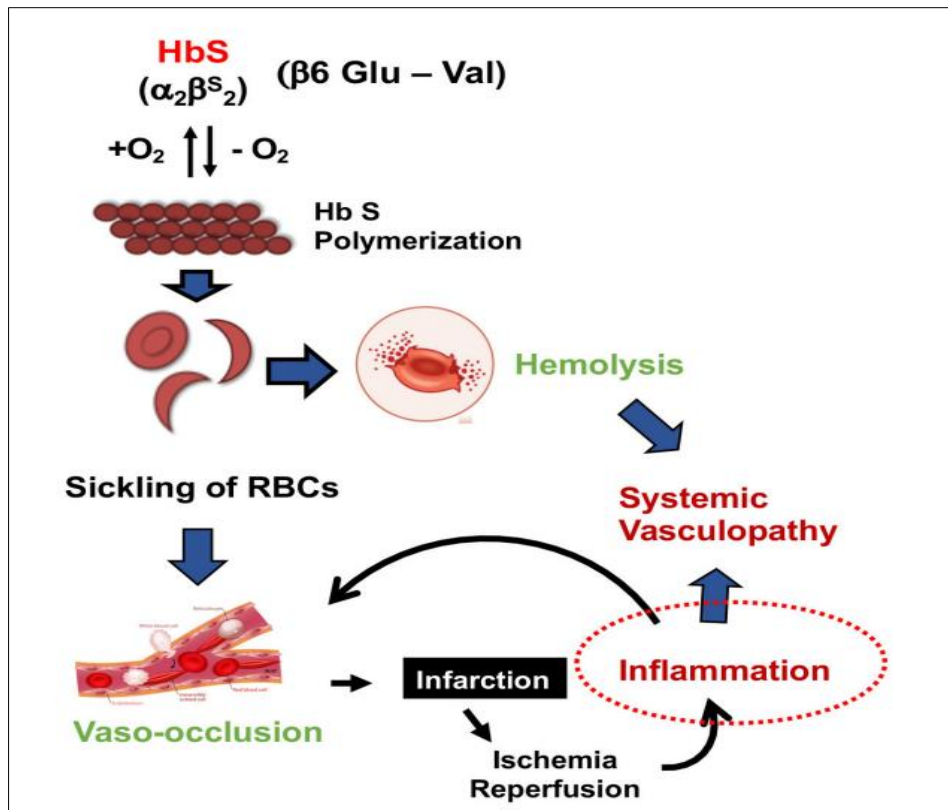


Figure 57. Revue schématique de la physiopathologie de la drépanocytose (Salinas Cisneros and Thein 2020).

Mutation et hémoglobine S. La drépanocytose est causée par la substitution d'une adénine (GAG) en thymine (GIG) au niveau du codon 6 (*rs334*) du gène β-globine (*HBB*) situé sur le chromosome 11p15.5. Cette mutation ponctuelle entraîne la substitution de l'acide glutamique (Glu) hydrophile par une valine (Val) hydrophobe (Glu6Val) en sixième position de la chaîne β-globine de l'Hb humaine adulte (HbA, α₂β₂), responsable du remplacement de l'HbA par l'HbS mutée (HbS, α₂β_S) dans les GR de patients drépanocytaires (Steinberg, 2008; Sundd et al., 2019). Le syndrome drépanocytaire majeur est un terme utilisé pour décrire plusieurs hémoglobinopathies de génotypes différents allant du trait drépanocytaire (HbAS, α₂β^Aβ^S) presque sans symptômes à la forme homozygote (HbSS) la plus sévère (Figure 57). La drépanocytose inclut également des formes hétérozygotes composites constituées d'un allèle β^S avec un allèle β-thalassémie (HbSβ⁰-thal ou HbSβ⁺-thal) ou d'un allèle de β^S avec un allèle d'un autre variant d'Hb tel que l'allèle β^C (Glu6Lys) du variant C (HbSC, maladie de l'hémoglobine SC), β^D du variant D (HbSD), β^{O/Arab} du variant O/Arab (HbSO/Arab) ou l'allèle β^E du variant E (HbSE) (Noguchi et al., 1993; Higgins et al., 2022). Chez les patients d'origine africaine, la drépanocytose homozygote (HbSS) est la plus fréquente (65 - 70%) suivie de l'HbSC (environ 30%), l'HbSβ⁰-thalassémie étant responsable du reste (Steinberg and Rodgers, 2001; Salinas Cisneros and Thein, 2020). La concentration de l'hémoglobine pour l'HbSS et HbSβ⁰-thal est généralement comprise entre 6 et 9 g/dL, alors que celles pour l'HbSC et l'HbSβ⁺-thal sont

de 9 à 14 g/dL (Higgins et al., 2022). La majorité des développements et des interventions thérapeutiques se sont concentrés sur le génotype SS (Salinas Cisneros and Thein 2020), qui fait également la suite de ce chapitre.

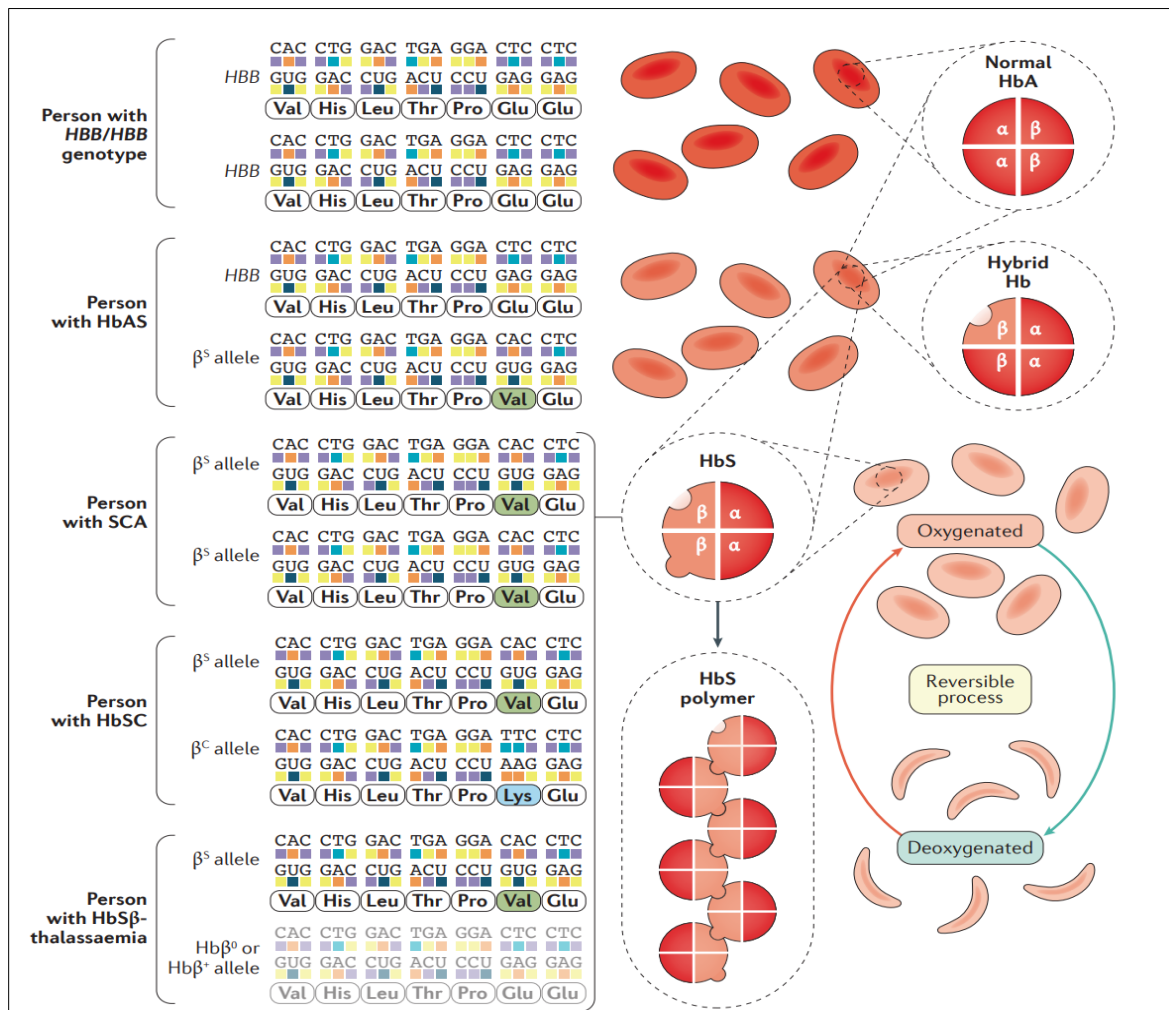


Figure 58. Altérations génétiques dans le gène HBB codant la chaîne β-globine de l'HbA (Kato et al., 2018).

Polymérisation de l'hémoglobine S. L'évènement fondamental déclencheur de la physiopathologie complexe et des conséquences multi-systémiques de la drépanocytose est la polymérisation de l'HbS qui se produit à faible tension d'oxygène (Salinas Cisneros and Thein., 2020). Durant la désoxygénation qui suit le passage des GR dans la microcirculation, l'hydrophobicité de la valine de l'HbS favorise l'interaction avec des régions hydrophobes au niveau de la chaîne β-globine d'une autre molécule d'HbS-désoxygénée facilitant ainsi la formation de polymères (Figure 58) (Odièvre et al., 2011).

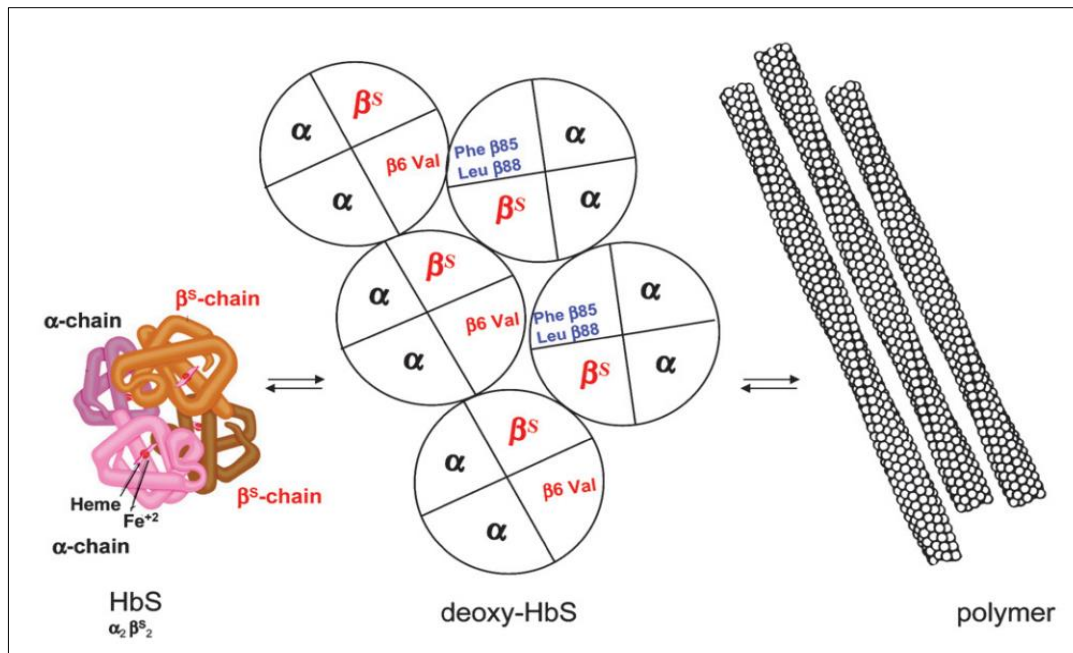


Figure.58. Polymérisation de la desoxy-HbS anormale (Odièvre et al., 2011).

La première étape du processus de polymérisation est une phase thermodynamiquement instable, néanmoins une fois le noyau critique atteint, le complexe de molécules de désoxy-HbS agrégées devient stable. À ce stade de polymérisation, la réaction devient autocatalytique et une nucléation hétérogène se produit à la surface des polymères préexistants générant des polymères à double brin (14 brins qui consistent en 7 paires de brins tordus en hélice) robustes responsables de la déformation ou la falciformation des GR drépanocytaires. La progression de la polymérisation dépend essentiellement de trois principaux déterminants qui sont la saturation en oxygène (Figure 58A), la concentration intracellulaire en Hb (Figure 58B) et la composition en hémoglobine (Figure 58C) (Noguchi and Schechter, 1989). Les mesures de la polymérisation d'HbS *in vivo*, dans des GR drépanocytaires intacts, en fonction de la saturation en O₂ mesurée par la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont révélé que les polymères d'HbS représentent environ 70% des molécules d'Hb anormale à une saturation proche de zéro et qu'ils peuvent être trouvés en faible quantité même à des saturations élevées (Figure 5A). Ces résultats expérimentaux sont expliqués par le comportement non idéal de l'HbS intracellulaire à haute concentration appelée également activité chimique (Noguchi and Schechter, 1981).

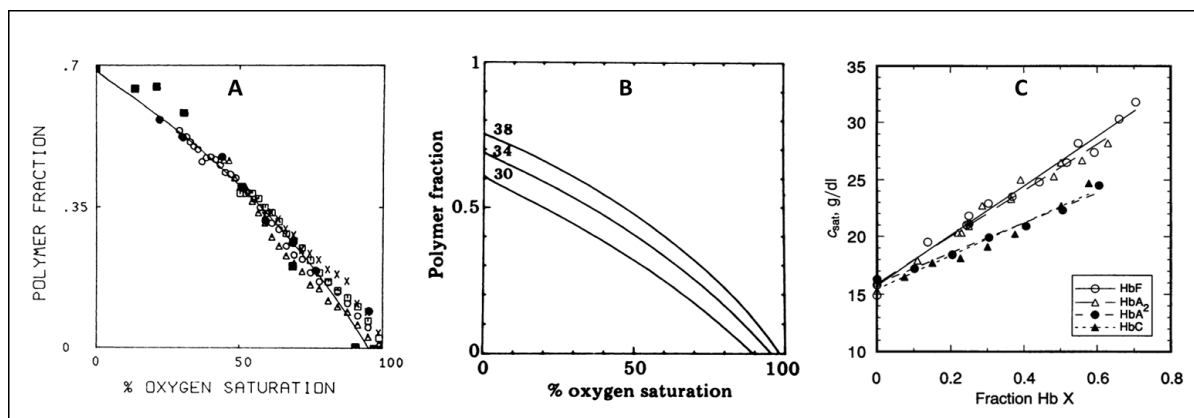


Figure 59. Principaux déterminants de la formation de polymères d'HbS (Noguchi and Schechter 1981; Poillon et al., 1993; Hoban et al., 2016).

(A) Fraction de polymères dans les GR drépanocytaires intacts mesurée par ^{13}C -RMN en fonction de la saturation en oxygène chez plusieurs patients (différents symboles) (Noguchi and Schechter 1981). Les résultats indiquent que le polymère est détecté à des valeurs de saturation en oxygène très élevées et que la quantité de polymère augmente jusqu'à un maximum moyen d'environ 70 % lorsque la saturation en oxygène diminue jusqu'à zéro. Les cellules denses déplacent la courbe vers la droite et provoquent l'apparition de polymère détectable à proximité d'une saturation de 100 %. (B) Les calculs théoriques illustrés dans la figure (A) pour la fraction de la saturation en oxygène, utilisant des concepts de non-idéalité des protéines ont été étendus pour inclure des valeurs de CCMH de 30, 34, et 38 g/dL. Au fur et à mesure que la CCMH augmente, la fraction de polymères se rapproche de 100% (Noguchi and Schechter, 1981). (C) Profils de solubilité pour des mélanges d'HbS désoxygénée avec diverses Hb non-S. La concentration de saturation, C_{sat} (la concentration de toutes les espèces d'Hb à l'état soluble dans le surnageant), appelée aussi solubilité à l'équilibre, a été mesurée à 30°C dans un tampon KPO_4 0,15 M ; pH 6,5 ; $u = 0.38$. Les concentrations totales d'Hb (ct) étaient de 29.9g/dL pour les mélanges d'HbS avec HbF ou HbA₂ et de 26,5g/dL pour ceux avec HbA ou HbC (Poillon et al., 1993).

L'analyse théorique de la polymérisation d'HbS pour différentes valeurs de la CCMH en fonction de la saturation en O_2 a démontré que la formation des polymères dans le GR est maximale à n'importe quelle concentration d'Hb en cas de désoxygénation complète et que la fraction d'HbS polymérisée augmente avec l'augmentation des valeurs de la CCMH quel que soit le pourcentage d' O_2 (Figure 5B) (Noguchi and Schechter, 1981). Le taux de polymérisation d'HbS est aussi influencé par la présence d'autres types d'Hb dans les GR. En effet, il a été montré que la présence des Hb normales telles que l'HbA ($\alpha_2\beta\alpha_2$), l'HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) et l'HbF ($\alpha_2\gamma_2$) et d'une Hb anormale telle que HbC ($\alpha_2\beta^C_2$), qui peuvent coexister avec l'HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) dans les GR humains, augmente la solubilité (C_{sat}) dans des conditions de désoxygénation partielle ou totale (Figure 5C). Plus la proportion des Hb non-S dans les GR est importante, plus la quantité de désoxy-HbS à l'état soluble augmente. Ce phénomène est connu sous l'appellation d'effet inhibiteur (ou *sparing effect* en anglais) des Hb non-S de la polymérisation de l'HbS intracellulaire. En réalité, cet effet de limitation de la polymérisation est

déterminé plus précisément par les hétérotétramères hybrides. Les études sur les mélanges d'HbS avec les autres Hb ont rapporté que les homotétramères ($\alpha_2\beta^A\beta^A$), ($\alpha_2\delta\delta$), ($\alpha_2\gamma\gamma$) ($\alpha_2\beta^C\beta^C$), ayant une solubilité plus élevée que celle d'HbS, ($\alpha_2\beta^S\beta^S$) ne polymérisent pas et ne s'incorporent pas dans les polymères d'HbS. Le comportement des hétérotétramères hybrides vis-à-vis du polymère dépend fortement de la nature des Hb qui les constituent. Les tétramères formés par l'HbS et l'HbA ($\alpha_2\beta^A\beta^S$) ou l'HbS et l'HbC ($\alpha_2\beta^C\beta^S$) copolymérisent et entrent dans les polymères d'HbS, différemment aux formes hybrides mixtes d'HbA₂ et F avec l'HbS qui semblent être complètement exclus du polymère naissant (Noguchi et al., 1993; Poillon et al., 1993). D'autres facteurs tels que la température, le pH, la concentration du di-phosphoglycérate (2,3 -DPG) peuvent aussi faire varier la vitesse de polymérisation. Les travaux de Hofrichter *et al.* ont montré que des petites variations de ces facteurs sont suffisantes pour raccourcir la période de latence (*delay time, td*) et précipiter la formation des GR falciformes dans la microcirculation, un événement qui précède le syndrome vaso-occlusif (Eaton and Bunn, 2017; Piccin et al., 2019).

Falciformation des globules rouges drépanocytaires. Les fibres de désoxy-HbS en forme hélicoïdale regroupées se rigidifient et induisent le changement de forme caractéristique des GR drépanocytaires (GR-SS), classiquement en forme de faucille responsable d'une part de la vaso occlusion. La répétition du cycle polymérisation - dépolymérisation de la désoxy-HbS altère également la fonction des GR-SS en déclenchant une cascade d'anomalies cellulaires qui participent au mécanisme général de la physiopathologie de la maladie (**Figure 59**). Dans les GR-SS, l'homéostasie des cations est dérégulée à cause de dysfonctionnements d'un certain nombre de canaux ioniques notamment le cotransporteur érythroïde K-Cl 1 (KCC1 codé par *SLC12A4*), KCC3 (codé par *SLC12A6*), KCC4 (codé par *SLC12A7*), le canal Gardos (codé par *KCNN4*), le P_{sickle} , et très probablement le canal mécanosensible PIEZO1 (Kato et al. 2018). Ces derniers entraînent la fuite des ions K^+ et la sortie des molécules d' H_2O provoquant une déshydratation qui est une caractéristique des GR drépanocytaires (Odièvre et al., 2011; Brugnara, 2018).

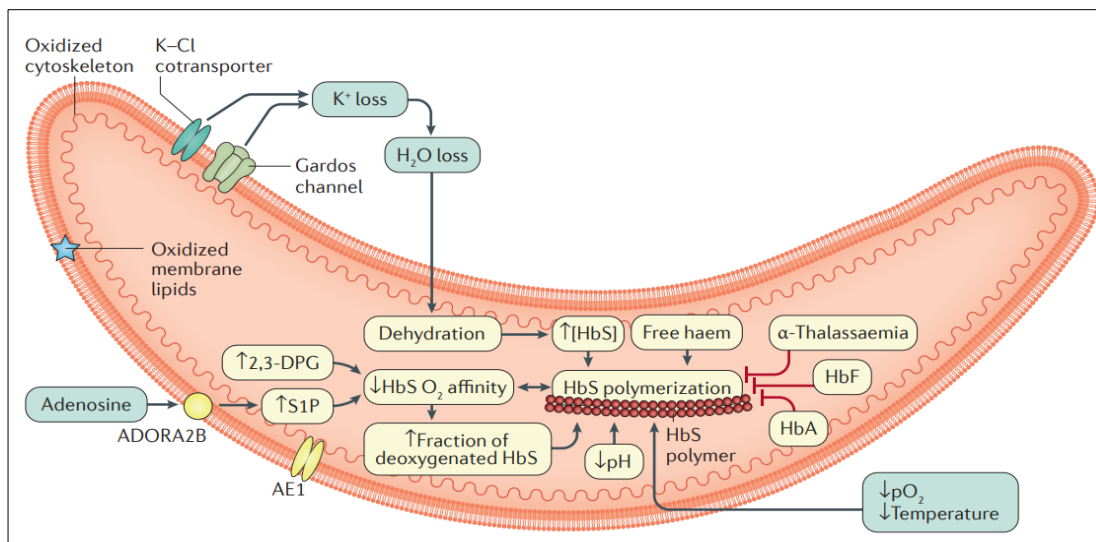


Figure 60. Dommages aux globules rouges drépanocytaires induits par la polymérisation de l'HbS (Kato et al. 2018).

La déshydratation cellulaire induit un cycle vicieux en favorisant davantage la polymérisation de la désoxy-HbS puisqu'elle provoque l'augmentation de sa concentration intraglobulaire (Odièvre et al. 2011). Etant plus susceptible à l'auto-oxydation que l'HbA, l'HbS se dénature plus rapidement et forme des hémichromes qui génèrent un environnement oxydatif lié à la perte d'hème et la libération de Fe^{3+} . La formation d'agrégats de protéine de la bande 3 qui sont reconnus par les IgG anti-bande 3, la perturbation de l'asymétrie membranaire des phospholipides par l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'altération de la déformabilité des GR et la défaillance énergétique globulaire sont tous des signaux reconnus par les macrophages qui procèdent à l'érythrophagocytose et l'élimination prématurée des GR drépanocytaires. En combinaison avec les mécanismes ralentissant le flux sanguin dans la microcirculation, la rigidité et la fragilité des GR-SS expliquent respectivement la vasoocclusion et l'anémie hémolytique qui sont au centre de la physiopathologie de la drépanocytose et à l'origine d'une batterie de complications pathologiques aiguës (Odièvre et al., 2011; Kato et al., 2018; Sundd et al., 2019; Piccin et al., 2019). Enfin le complément pourrait intervenir dans les l'hémolyse par l'activation de la voie alterne du fait, entre autres, de dépôts de C3 sur la PS, et de la diminution des mécanismes de défense.

Vasoocclusion. La vasoocclusion ou l'occlusion des vaisseaux sanguins conduisant à l'ischémie est responsable de la crise vasoocclusive douloureuse. L'exemple type de cette dernière est le syndrome thoracique aigu (STA) qui est une des causes d'hospitalisation et de décès chez les patients. La compréhension actuelle de la pathophysiologie de la vaso occlusion met en évidence l'interaction et la contribution simultanée d'un ensemble de facteurs incluant une rhéologie sanguine altérée (influencée par l'hématocrite, la viscosité

plasmatique et la déformabilité érythrocytaire), une adhérence accrue des GR avec les cellules immunitaires et l'endothélium vasculaire, et l'activation hémostatique (Piel et al., 2017; Sundd et al., 2019). De manière simplifiée, la vaso occlusion peut être subdivisée en deux étapes consécutives. La première implique deux populations de GR, les GR faiblement déformables susceptibles d'être séquestrés dans la microcirculation et les GR jeunes et immatures appelée aussi réticulocytes de stress exprimant anormalement à leur surface des molécules d'adhésion capables d'adhérer à l'endothélium des veinules postcapillaires, qui promeuvent le ralentissement du flux sanguin. Ce dernier, à son tour, induit indirectement la falciformation des GR-SS matures maintenus plus longtemps dans un environnement hypoxique. Cette première étape constituant la phase transitoire de la vaso occlusion pourrait conduire à une seconde étape qui correspondrait à la prise au piège ou *trapping* des drépanocytes irréversibles tels que les cellules denses et à l'occlusion complète des microvaisseaux sanguins (Odièvre et al., 2011; Sundd et al., 2019).

Anémie hémolytique. Les drépanocytes contenant des polymères d'HbS et manifestant d'autres anomalies cellulaires sont hautement instables et par conséquent ces GR sont sujets à l'hémolyse vasculaire, causant une anémie chronique avec des taux d'Hb allant de 6 à 11g/dL. Environ 2/3 de l'hémolyse des GR-SS est extravasculaire médiée par les macrophages du système réticuloendothélial qui reconnaissent notamment la protéine membranaire bande 3 oxydée antigénique se liant aux anticorps naturellement existants et la phosphatidylsérine (PS) externalisée au niveau des drépanocytes endommagés. La destruction mécanique des GR faiblement déformables et inélastiques dans la circulation sanguine constitue quant à elle l'hémolyse intravasculaire qui représente 1/3 de l'hémolyse des GR-SS. Parmi les nombreuses conséquences de l'hémolyse intravasculaire, la consommation d'oxyde nitrique (NO) vasculaire et le stress oxydatif mais aussi une réticulocytose et une élimination prématurée des GR (Steinberg, 2008; Conran, 2015; Telen et al., 2019). En effet, la durée de vie des drépanocytes est réduite d'environ 75% (Kato et al., 2018).

19. Durée de vie des globules rouges drépanocytaires

Peu d'études ont été réalisées pour suivre la durée de vie des globules rouges de patients atteints d'hémoglobinopathies. Parmi les premiers travaux de recherche qui se sont penchés sur cette problématique en utilisant des méthodes de mesure fiables, ceux réalisés par McCurdy en 1969 dans lesquels la durée de vie des GR contenant différents types de chaîne β -globine anormale a été mesurée simultanément à l'aide de deux marqueurs radioactifs, le ^{32}DFP et le ^{51}Cr (McCurdy, 1969). Les résultats de cette étude ont montré que les courbes de survie obtenues pour les patients SS mesurée aussi bien avec le ^{32}DFP qu'avec le ^{51}Cr sont majoritairement exponentielles. La durée de vie moyenne des GR chez les 9 patients SS (dont le taux moyen de l'HbF est de 4,2 %, avec une variation allant de 1,4% à 8,9%), calculée à partir

des données générées avec le ^{32}DFP a été de 17,2 jours (avec une variation allant de 12,0 jours à 24,4 jours) (Tableau 7).

Tableau 7. ^{32}DFP et ^{51}Cr pour la mesure de la durée de vie des globules rouges dans les syndromes d'hémoglobine anormale (McCurdy, 1969).

Case Number	Age	Sex	Mean Hematocrit	RBC Mass ml./Kg.	T ^{51}Cr $\frac{1}{2}$	T ^{32}DFP $\frac{1}{2}$	MCL ^{32}DFP	K.	Mean Reticulocytes	Production Index ^{32}DFP	Diagnosis and Remarks	Type of ^{32}DFP Curve
4588	22	M	27.0	21.4	7.1	9.7	14.0	*	11.1	6.4	SS	R†
7490	20	F	21.0	15.8	6.9		19.4	2.7	11.9	3.4	SS Arithmetic Curve	F†
						8.9	12.7	2.2		5.2	Exponential Curve	
7170	21	M	26.5	22.5	7.6	9.6	13.9	*	13.6	6.7	SS	R†
6812	25	F	17.0	17.2	8.5†	12.3	17.8	2.6	15.2	4.0	SS	R†
6527	28	M	21.0	17.4	13.5	16.8	24.4	1.0	7.7	3.0	SS	R†
196	29	M	22.0	16.6	10.7	14.8	21.4	1.8	7.4	3.2	SS	R†
3445	22	F	25.0	14.0	14.8	15.1	21.7	0.1	2.6	2.7	SS	R†
3643	21	F	20.0	11.6	9.3	11.5	16.5	*	16.4	2.9	SS	R†
64	48	M	19.0	18.5	6.4	7.8	12.0	*	16.9	6.4	SS	R†
1002	21	F	33.5	16.7	26.0		95.7	2.4	1.5	0.7	S- β Thalassemia	F
6457	22	F	35.0	21.5	24.9	37.0	53.5	0.8	1.6	1.7	S- β Thalassemia	R
8080	74	F	39.0	17.5	15.3	16.0	23.6	0.3	2.6	3.1	S-C Disease; Cr 51 study begun 2 weeks prior to start of ^{32}DFP test.	R†
8654	26	M	39.0	23.5	16.5	19.8	28.6	0.7	4.2	3.4	S-C Disease	R†
8506	37	F	32.5	20.4	18.7	26.6	38.5	1.1	2.2	2.2	C-C	R†
1224	39	F	30.5	16.5	18.7	24.3	35.1	0.9	2.4	2.0	C-C	R
7673	16	F	15.5	10.3	5.9	6.2	8.9	0.5	5.8	4.8	C-C, acute leukemia, bleeding	R
3717	38	F	33.0	19.5	32.3		164	1.5	0.7	0.5	AS, ? α Thalassemia	F
3789	23	F	37.0	16.6	30.1		92.4	1.0	0.9	0.7	AS, elliptocytosis	F
3902	12	M	41.0	26.8	24.3		91.2	1.4	0.8	1.2	AS, elliptocytosis	F†
8929	46	F	37.0	18.5	26.1		94.2	1.4	1.3	0.8	AS, elliptocytosis (Mother of 3789 and 3902)	F†
7101	43	M	29.5	13.0	27.7		57.1	0.6	0.9	0.9	AC, Tuberculosis	F

† Significatif à un niveau de 5 % ou moins pour la courbe arithmétique (F) ou exponentielle (R).

Les paires de frères et sœurs sont entre parenthèses.

Ke taux d'élution du ^{51}Cr .

La durée de vie des GR chez les patients SS mesurée avec le ^{51}Cr a abouti, en fonction de son taux d'élution (K_e), à deux catégories de courbes de survie (figure 60). Cinq de ces patients avaient des courbes à composante unique (une seule courbe d'élution, comme celle montrée dans la figure 60A) avec une demi-vie moyenne du ^{51}Cr égale à 11,2 jours.

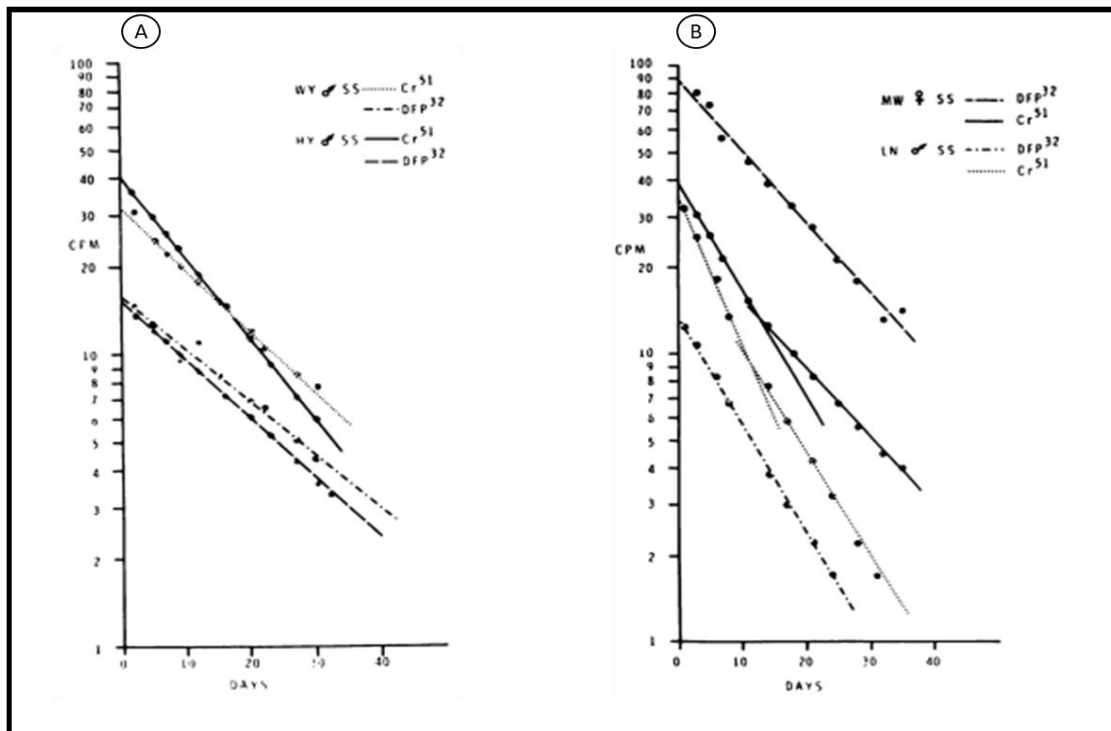


Figure 61. Durée de vie des GR chez les patients SS mesurée avec le ^{51}Cr en fonction de son taux d'éluion (K_e) (McCurdy, 1969).

(A) Courbes de survie des globules rouges obtenues avec ^{32}DFP et ^{51}Cr pour deux frères atteints de drépanocytose homozygote (WY = #6527, HY #196). Axe vertical : ^{32}DFP -cpm/ml de GR, ^{51}Cr -cpm/mL du sang total. (B) Courbes de survie des globules rouges obtenues avec ^{32}DFP et ^{51}Cr pour deux patients atteints de drépanocytose homozygote (MW = A #3643; LN = #64). Remarque : La cassure de la courbe ^{51}Cr indiquant 2 taux d'éluion du ^{51}Cr des globules rouges. La ligne ^{32}DFP est ininterrompue. Axe vertical : ^{32}DFP -cpm/mL GR, ^{51}Cr -cpm/mL du sang total.

Le taux d'éluion dans le cas des courbes à une seule composante est en moyenne de 1,4 % par jour, la variation étant entre 0,1 et 2,7 % par jour. Les durées de vie moyennes des GR calculées lorsque le K_e est de 1,5 et 2,7 % par jour ont été évaluées à 21,2 et 28,6 jours respectivement. Pour l'auteur, ces erreurs sont certainement appréciables mais peut-être pas cliniquement significatives (McCurdy, 1969). Chacun des 4 autres patients SS ont présenté des courbes d'éluion à deux composantes (Figure 60B). La première courbe d'éluion qui dure 9 à 11 jours est rapide et caractérisée par un K_e qui est de 4,1 à 19,5 % par jour. Ce taux d'éluion assez élevé pourrait conduire à une erreur significative dans l'estimation de la durée de vie des GR par la méthode du ^{51}Cr . La deuxième composante est si faible qu'elle est négligeable. En comparant entre les figures 60A et 60B, il semble que les différences d'âge des GR entre les frères (Figure 60A), bien qu'ils aient vraisemblablement les mêmes allèles HbS, ne soient pas moindre qu'entre les patients non apparentés atteints de la même maladie (Figure 60B). Dans une autre étude un peu plus récente qui date de 1998, franco et ses collaborateurs ont mesuré la durée de vie des GR matures chez des sujets normaux (N) et des patients atteints de la drépanocytose homozygote (S) (Tableau 8) et ils ont également suivi la survie des réticulocytes

de ces derniers dans la circulation périphérique en marquant simultanément ou séparément les GR avec le ^{51}Cr et la biotine (Franco et al. 1998).

Tableau 8. Expériences de marquage avec le ^{51}Cr et la biotine effectuées sur les mêmes globules rouges (N1, N2) et sur des globules rouges différents (N3, N4, S1, S2, S3) (Franco et al., 1998).

	$\mu\text{g/ml}^*$	Label type [‡]	Blood volume		24-h survival		(Long-term survival)		
			^{51}Cr	Biotin	^{51}Cr	Biotin	^{51}Cr	Biotin	
			<i>ml</i>		<i>%</i>		<i>d</i>		
N1	5	S			102	97	68	67	Lifespan
N2	1	S			94	101	140	105	Lifespan
N3	1	D	3892	4443	96	98	108	120	Lifespan
N4	3	D	4917	5427	96	99	85	90	Lifespan
S1	1	D	6578	6259	101	92	13.5	13.5	50% [§]
S2	3	D	6880	6228	85	79	11	9.5	50%
S3	3	D	6760	5800	68	75	8.5	7.5	50%
Average			5805	5631	89.2	88.6			
<i>P</i> , paired <i>t</i> test			0.60		0.85				

*Concentration de NHS-biotine pendant la biotinylation des globules rouges. ‡Les deux marqueurs ont été utilisés soit sur les mêmes GR (S) ou sur des GR différents (D). §Les courbes de survie des GR de patients drépanocytaires ne sont pas linéaires, et le temps qui correspond à l'élimination de 50% des GR de la circulation est indiqué. Il ne comprend que les expériences de marquage ^{51}Cr et biotine sur des GR différents.

Les données de cette étude ont indiqué que contrairement aux GR de tous les sujets normaux (exemple N3, [Figure 61](#)), la survie à long terme des GR drépanocytaires (S1-S3) est plus variable et leur disparition forme une courbe non linéaire ([Figure 61](#)).

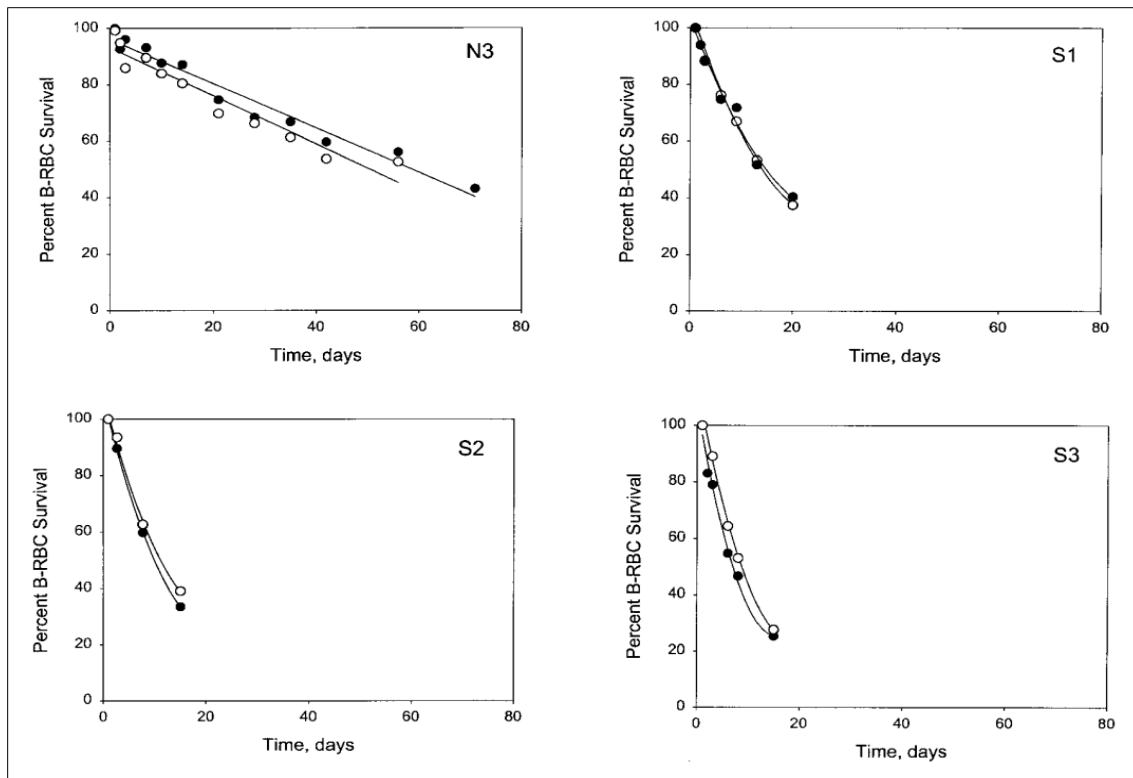


Figure 62. Durée de vie des globules rouges normaux et drépanocytaires mesurée par le ^{51}Cr ou la biotine (Franco et al., 1998).

Des aliquots séparés de globules rouges autologues normaux (N3) ou drépanocytaires (S1-S3) ont été marqués à la biotine ou au ^{51}Cr et réinjectés. La survie à long terme a été déterminée en comparant la quantité de marquage, soit le pourcentage de GR biotinylés (•) soit le coup par minute (cpm) par millilitre (o), avec une référence à 100% mesurée le premier jour après la réinjections.

Après les premières 24h suivant la réinjection, les GR-SS marqués à la fois au ^{51}Cr et à la biotine disparaissent beaucoup plus rapidement que les GR normaux. En effet, chez le patient S3 par exemple, environ 30 % des GR ne sont pas détectables après 6h (Figure 62).

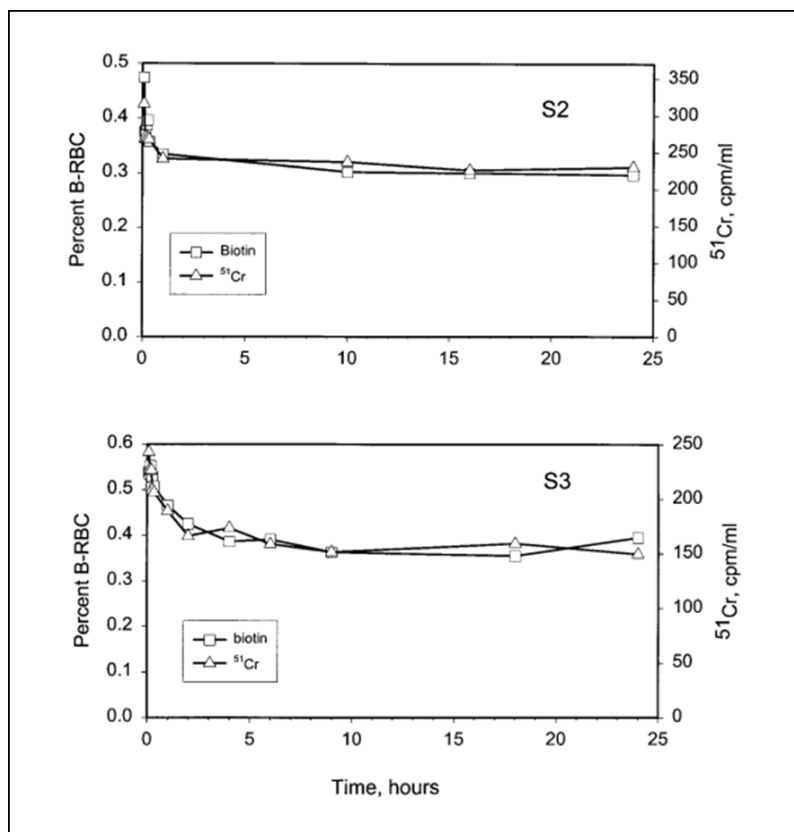


Figure 63. Elimination des drépanocytes marqués de la circulation durant les premières 24h après la réinjection (Franco et al., 1998).

Elimination initiale des GR falciformes marqués à la biotine et au ⁵¹Cr (marquages séparés) chez deux patients. Chez les sujets normaux, il y a peu ou pas de perte des deux marquages pendant les premières 24h (Tableau 8).

Puisque cette perte rapide est identique pour les deux marqueurs, les auteurs pensent qu'elle n'est pas liée aux processus de marquage bien que certains GR-SS mais pas les normaux puissent être endommagés pendant la manipulation *in vitro*. Le phénomène de disparition initiale rapide des GR-SS marqués de la circulation semble être différent de la première phase d'éluion du ⁵¹Cr décrite dans l'étude de McCurdy chez les patients drépanocytaires ayant une courbe de survie à deux composantes puisque cette dernière dure plusieurs jours. Une des hypothèses qui pourrait expliquer la disparition à court terme des GR-SS marqués après leur réinjection est le phénomène de séquestration (*trapping* ou *entrapment* en anglais). En effet, des études chez l'animal ont montré qu'une population mineure de GR-SS falciformes caractérisée principalement par une densité élevée (CCMH élevée) est retirée de la circulation (retenus dans un compartiment au niveau d'un ou plusieurs organes tels que le foie, la rate, les microvaisseaux pulmonaires) pendant l'hypoxie et circule à nouveau lors de la réoxygénation des animaux (Castro et al., 1976; Aldrich et al., 1996).

Dans cette même étude, la disparition des réticulocytes de six patients drépanocytaires SS de la circulation sanguine a été également suivie. Les résultats obtenus sont illustrés dans la [figure 63](#).

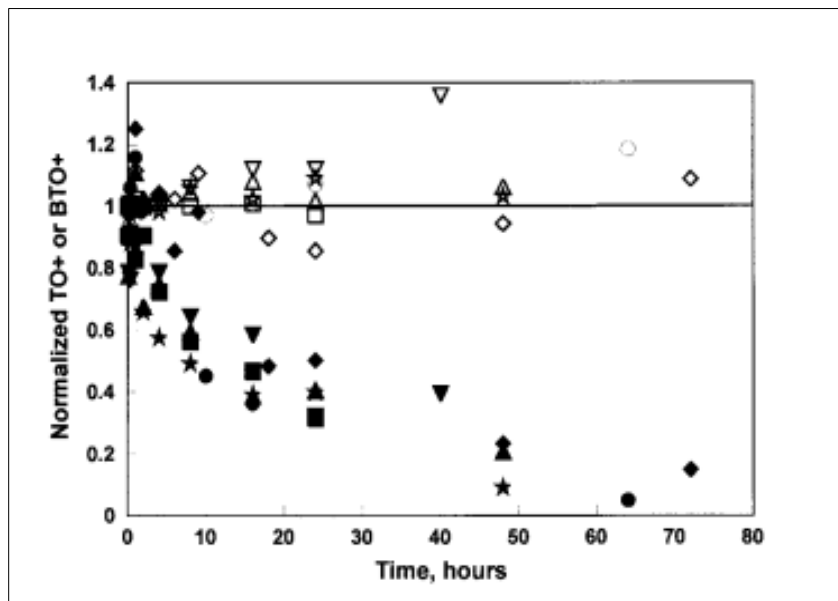


Figure 64. Disparition in vivo des réticulocytes drépanocytaires marqués à la biotine (Franco et al. 1998).

Les réticulocytes biotinylés de six patients (S2 - S7) drépanocytaires ont été énumérés et leur vitesse de disparition de la circulation a été déterminée. Symboles ouverts représentent le nombre de réticulocytes non marqués qui reste constant comme prévu. Symboles pleins correspondent aux réticulocytes biotinylés. Tous les pourcentages ont été normalisés en considérant le nombre de réticulocytes non marqués au moment de la réinjection comme 100%. (TO, thiazole orange).

Les données ont indiqué que le nombre de réticulocytes non marqués représentant le nombre de réticulocytes à l'état d'équilibre du patient reste constant contrairement au nombre de réticulocytes biotinylés qui diminue reflétant soit la maturation des réticulocytes vers des GR matures, un processus qui dure 2 à 3 jours, soit l'élimination de cellules très jeunes de la circulation. Chez les six patients SS, environ 50% des réticulocytes ont disparu en 24h et 75% en 48h (Franco et al., 1998).

20. Variabilité clinique de la drépanocytose

Bien que tous les patients atteints de la drépanocytose partagent la même mutation monogénique, l'expression clinique et la gravité des manifestations de cette maladie sont largement imprévisibles et variables d'un patient à un autre, allant d'une évolution modérée et peu symptomatique à une évolution très sévère avec des dommages multi-organes ([Figure 64](#)) et une mortalité précoce (Conran, 2015; Sommet et al., 2021). Les génotypes hétérozygotes composites de la drépanocytose sont généralement moins sévères sur le plan clinique que la forme homozygote (SS). Cependant, au sein de chaque génotype, la variabilité clinique est

toujours substantielle. Pour identifier les facteurs qui expliquent l'hétérogénéité phénotypique de la drépanocytose et prédire son évolution clinique chez les patients, des études s'intéressant à la relation entre le génotype et le phénotype de la pathologie ont été lancées. Des études ont abouti à l'identification génétique de plusieurs haplotypes du gène HbS (génotypes bantou, béninois, camerounais, sénégalais et Arabo-indien) associés aux différentes origines de la mutation HbS dans les zones à forte prévalence et pouvant être indirectement associées à des différences phénotypiques (Piel et al., 2017; Sommet et al., 2021).

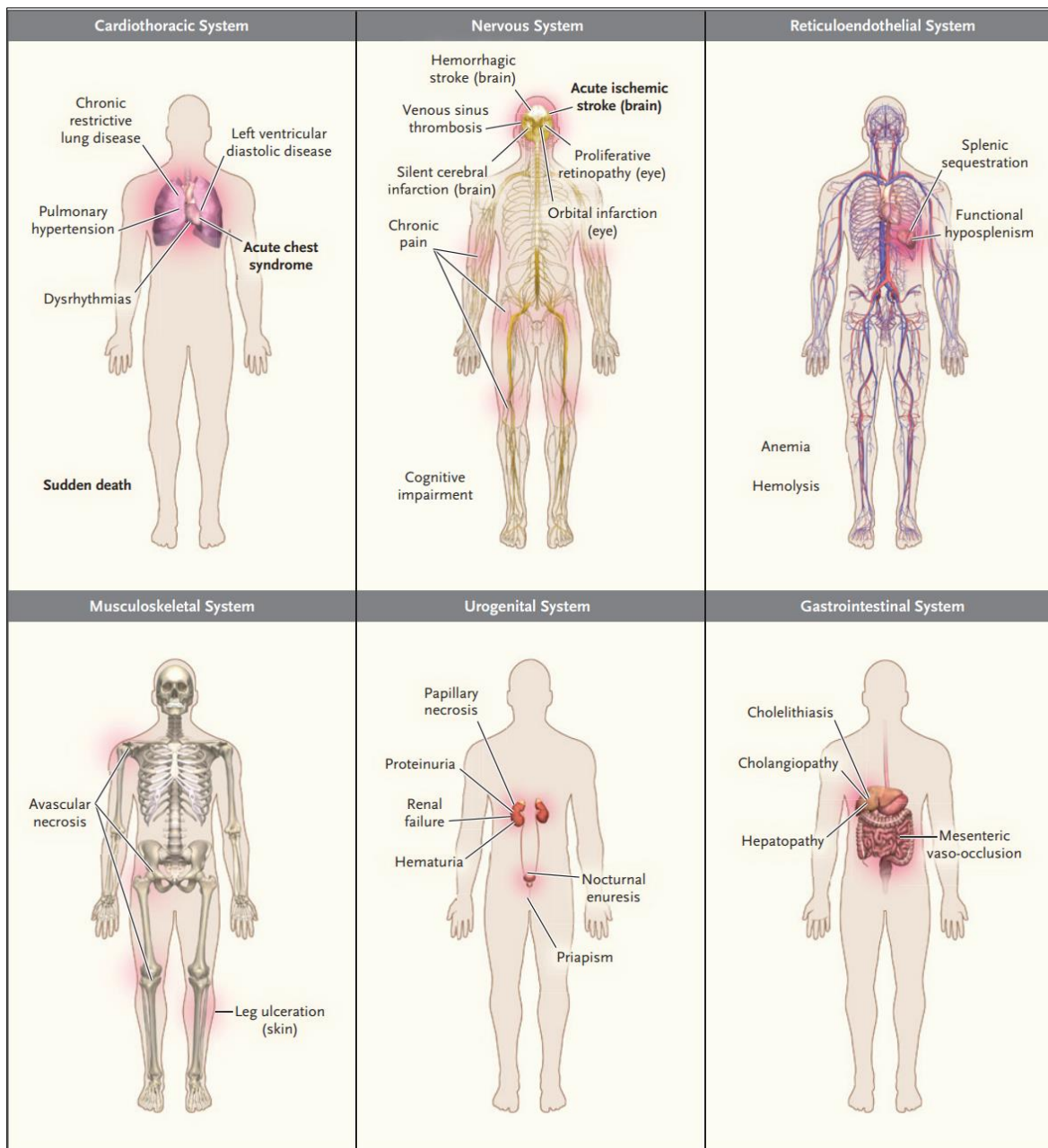


Figure 65. Complications cliniques courantes de la drépanocytose (Piel et al., 2017).
Les complications aiguës sont indiquées en caractères gras.

Les connaissances actuelles sur l'expression de l'hétérogénéité phénotypique de la drépanocytose associée à des interactions complexes avec différents facteurs génétiques et environnementaux sont résumées dans la **figure 65**. Les modificateurs génétiques de l'expressivité clinique de la drépanocytose sont de trois types : génotype et haplotype, coexistence d'une α -thalassémie, et hémoglobine foetale. Dans ce qui suit, seulement l'influence de l'HbF sera abordée et détaillée.

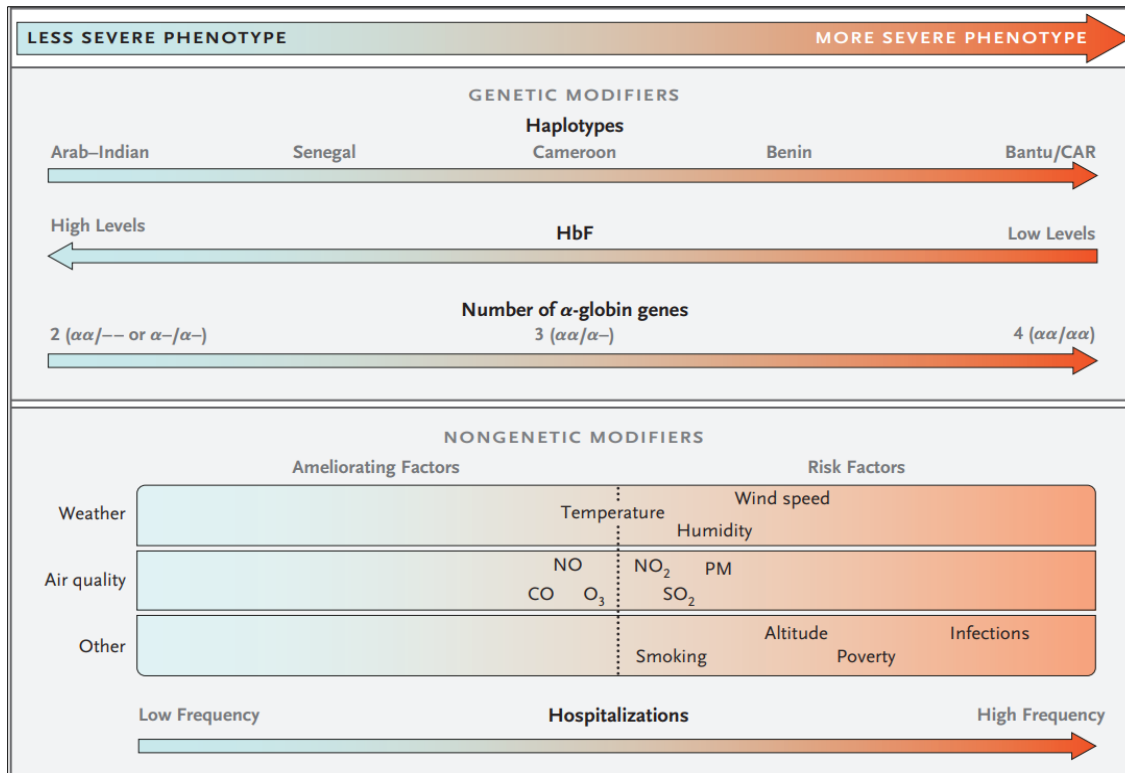


Figure 66. Modificateurs génétiques et non génétiques de la sévérité clinique de la drépanocytose (Piel et al., 2017).

Les flèches indiquent si le facteur est généralement associé à un phénotype léger ou sévère. L'échelle des biomarqueurs non génétiques n'est qu'à titre indicatif. (CAR : République de l'Afrique centrale, CO : monoxyde de carbone, HbF : hémoglobine foetale, NO : monoxyde d'azote, NO₂ : dioxyde d'azote, O₃ : ozone, PM : matière particulaire (particules), et SO₂ : dioxyde de soufre.

21. Modulation génétique de la sévérité de la drépanocytose par l'hémoglobine foetale

Comme décrit dans le premier chapitre, l'hémoglobine foetale (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) est codée par deux gènes *HGB2* [γ^G] et *HGB1* [γ^A] contenus dans le locus β -like globine porté sur le chromosome 11. L'HbF est la forme dominante de l'hémoglobine présente chez le foetus pendant la gestation. Elle est produite par les précurseurs érythroïdes de 10 à 12 semaines de grossesse jusqu'aux six mois de la vie postnatale. La chaîne gamma de l'HbF diffère de son homologue beta de l'HbA par la présence en position $\gamma 136$ d'une alanine ou d'une glycine (des acides

aminés neutres et non polaires) responsables des changements conformationnels conférant des différences physiologiques importantes d'affinité à l'oxygène (Paikari and Sheehan, 2018; Steinberg, 2020; Kaufman et al., 2023). Chez le sujet normal, le taux de l'HbF à la naissance est d'environ 85% de l'Hb totale. Cependant, ce taux normalement chute à 1% à un an puisque la commutation, le « switch » ou le passage de la γ -globine à la β -globine se produit peu de temps après la naissance favorisant l'augmentation de la concentration de l'HbA dans les précurseurs érythroïdes produits au niveau de la moelle osseuse (Figure 66).

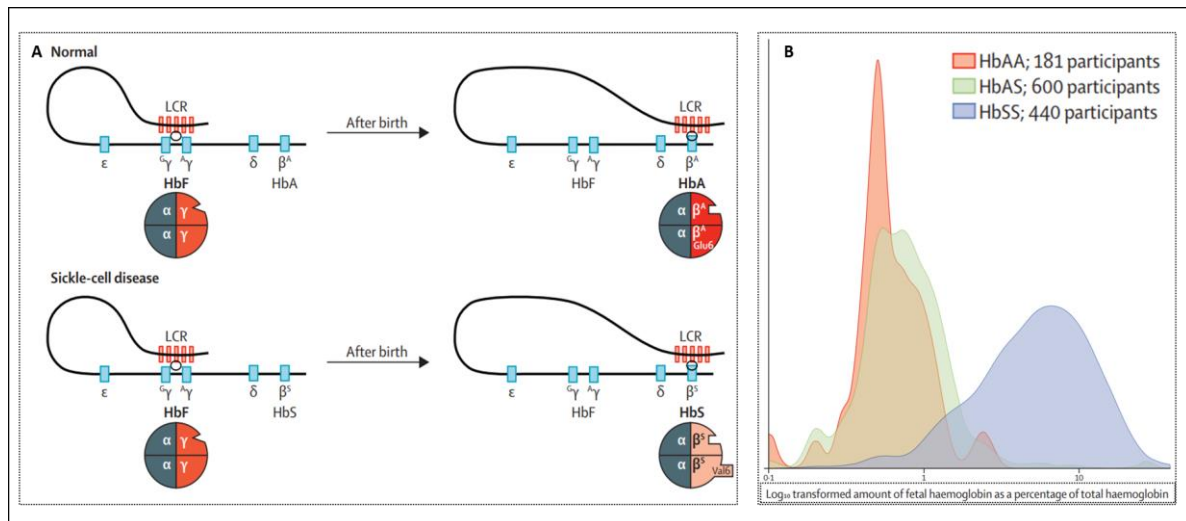


Figure 67. Hémoglobine fœtale en drépanocytose (Lettre and Bauer, 2016).

(A) Commutations (switches) HbF>HbA et HbF>HbS chez les sujets sains et les patients drépanocytaires, respectivement. L'Hb dominante avant la naissance est l'Hb fœtale (HbF; $\alpha_2\gamma_2$) avec une petite contribution de l'HbA (HbA; $\alpha_2\beta_2$). Quelques mois après la naissance, seulement une petite quantité résiduelle de γ -globine est détectée, de sorte que l'HbF apporte une petite contribution et l'HbA prédomine dans la quantité totale d'Hb. La drépanocytose, due à son β^S (mutation de la β -globine), ne se manifeste après la naissance qu'une fois la contribution de l'HbF diminue. (B) Distribution de la concentration de l'hémoglobine fœtale chez les patients drépanocytaires (Lettre and Bauer, 2016). 181 participants de l'étude GENMOD ne portaient pas d'allèle β^S , 600 participants avaient un seul allèle β^S (AS, trait drépanocytaire), et 440 participants avaient deux allèles β^S (HbSS, drépanocytose homozygote). La concentration moyenne d'HbF est de 0,8% (écart-type 2,0) chez les participants avec HbAA, 0,9% (0,8) chez les participants avec HbAS et 6,8% (5,2) chez les patients avec HbSS.

La diminution du taux d'HbF est accompagnée par un déclin progressif du nombre de GR contenant une quantité d'HbF mesurable appelés les cellules F (F-cells). Chez les enfants drépanocytaires, notamment homozygote, le passage de l'HbF à l'HbS à la naissance est retardé et des taux stables d'HbF ne sont pas atteints avant l'âge de 5 à 10 ans (Figure 67).

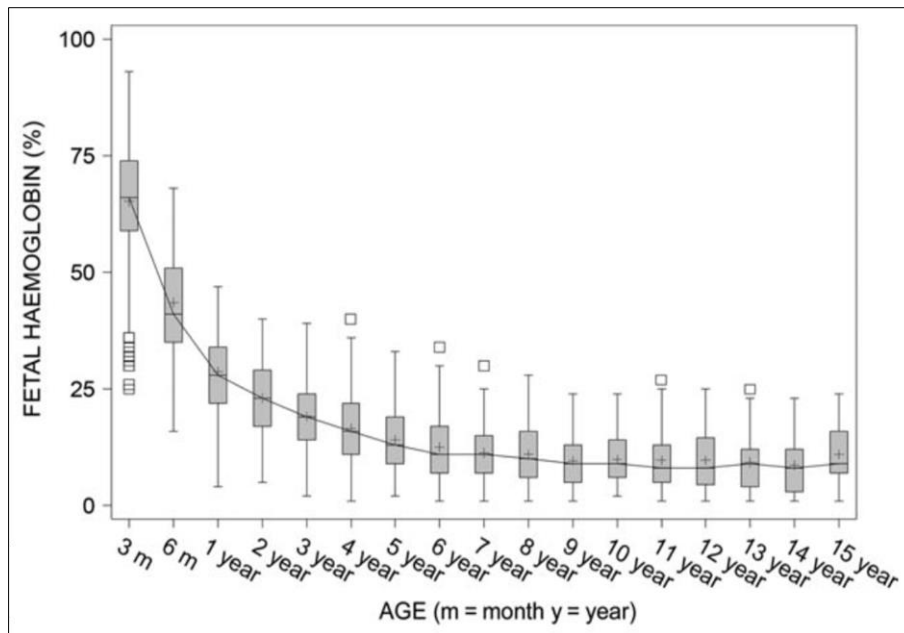


Figure 68. Suivi longitudinal du taux d'hémoglobine fœtale chez les patients drépanocytaires (Sommet et al., 2016).

Moyenne (+), médiane (-), valeurs aberrantes (□), (n=375). Les valeurs d'HbF ont été enregistrées à 3 semaines minimum de tout évènement clinique ou de toute intensification (hydroxycarbamide ou hydroxyurée, programme transfusionnel ou greffe de cellules souches hématopoïétiques) et au moins 3 mois après la transfusion.

A l'âge adulte, les globules rouges de la plupart des patients drépanocytaires contiennent des taux élevés d'HbF (Figure 66B). Néanmoins, l'ampleur de cette augmentation est très variable (Akinsheye et al., 2011; Steinberg et al., 2014; Lettre and Bauer, 2016). La plupart des patients d'ascendance africaine (avec les haplotypes bantou, béninois, camerounais ou sénégalais) ont une HbF d'environ 4 à 10% stable à l'âge de 5 ans. Cependant, des taux d'HbF plus élevés compris entre 15 et 30% sont observés chez certains adultes naïfs de traitement qui manifestent une maladie bénigne. Chez les patients d'origine indienne ou arabe (Moyen-Orient) avec l'haplotype arabo-indien, le taux d'HbF est d'environ 17%, stable à l'âge de 10 ans. Ce taux peut être supérieur à 20% mais aucune étude génétique informative sur le phénotype HbF très élevé n'a été réalisée dans cette population (Steinberg, 2020). La concentration d'HbF est héréditaire, 60 % à 90 % des variations du taux d'HbF sont expliquées par des variables génétiques (Lettre and Bauer, 2016). La persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale, PHFH (*Hereditary Persistence of fetal hemoglobin, HPPFH*), définie comme le résultat de polymorphismes nucléotidiques (*single nucleotide polymorphisms, SNPs*) dans la région promotrice des gènes *HBG* ou de délétions plus ou moins étendues du locus β -globine, englobant le gène *HBB* lui-même, a été identifiée en 1958 comme le premier mécanisme de régulation en *cis* qui contrôle les variations d'expression de l'HbF (Lobie and Elion, 2010). La distribution pancellulaire vs. hétérocellulaire de l'HbF a été utilisée comme un aspect

déterminant de la PHHF. La pancellularité de l'HbF associée à des taux élevés qui varient entre 10 et 40% inhibe la polymérisation de l'HbS dans la plupart des GR drépanocytaires de sorte que ces patients présentent peu ou pas de complications (Steinberg, 2020). L'expression de l'HbF peut être également régulée par des mutations au niveau des QTL (*quantitative trait locus*), *loci* régulateurs des gènes de l'HbF en *trans*. Trois *loci* sont mis en évidence : BCL11A sur le chromosome 2p, HMIP-2 sur le chromosome 6q, et Xmn1-HBG2 sur chromosome 11P (Lobie and Elion, 2010; Akinsheye et al., 2011). En clinique, l'HbF est considéré comme le principal modulateur génétique des caractéristiques hématologiques et cliniques de la drépanocytose. L'effet bénéfique de l'HbF dans la drépanocytose a été découvert en 1948 lorsque Janet Watson, un médecin pédiatre, a noté que les complications cliniques liées à la maladie étaient rares avant l'âge d'un an. Les nourrissons drépanocytaires auscultés par le pédiatre présentaient peu de symptômes et leurs GR désoxygénés falciformaient peu et beaucoup plus lentement que les GR de leurs mères porteuses d'un trait drépanocytairre. Ces observations ont alors été attribuées aux taux élevés d'HbF dans le sang de ces nourrissons (Akinsheye et al., 2011; Paikari and Sheehan, 2018). Plus tard, d'autres investigations épidémiologiques étudiant l'influence des taux d'HbF sur les différentes manifestations cliniques liée à la drépanocytose ont été menées chez l'enfant et l'adulte. Dans les travaux de Bailey et al. (1992), les auteurs ont examiné la relation entre la concentration d'HbF et les premières apparitions des complications cliniques (Bailey et al., 1992). La cohorte de patients drépanocytaires homozygotes (SS) étudiée a été divisée en trois groupes de taille égale en fonction du taux d'HbF à l'âge de 5 ans : groupe I (*low*), HbF < 5,4 %, groupe II (*medium*), HbF 5,4 - 9,7 %, groupe III (*high*), HbF ≥ 9,8 %. La distribution d'HbF a été dérivée séparément pour les deux sexes. Les résultats obtenus, présentés dans la **figure 68**, ont montré un risque significativement plus faible pour la dactylite, la crise douloureuse, le syndrome thoracique aigu et la séquestration splénique aiguë dans les groupes à HbF élevée.

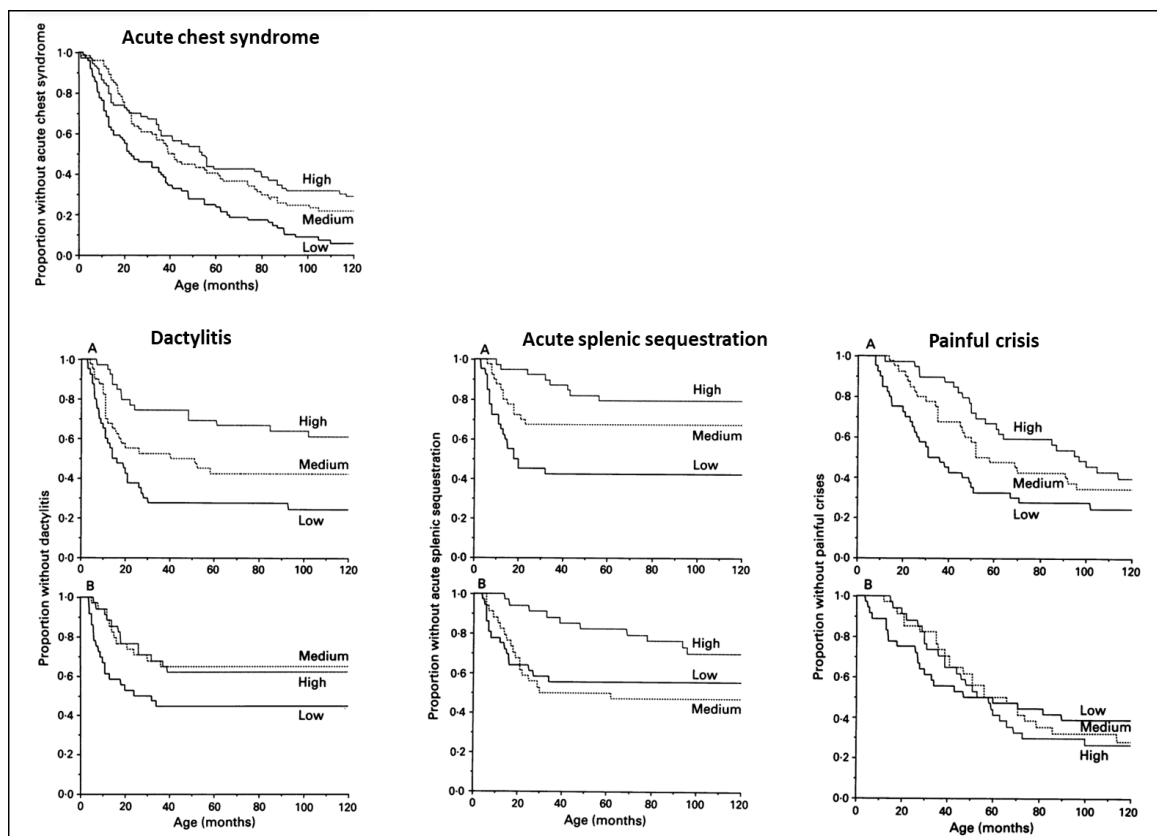


Figure 69. Analyse de la courbe de survie de la première apparition du syndrome thoracique aigu, la dactylite, la séquestration splénique aiguë et de la crise douloureuse [chez les mâles (A) et les femelles (B)] (Bailey et al. 1992).

($n_{\text{cohorte}} = 223$), ($n_{\text{mâles}} = 119$ et $n_{\text{femelles}} = 104$). L'âge des participants à l'inclusion : 4,7-17,4 ans. La durée moyenne de suivi : 12 ans.

La relation entre la concentration d'HbF et la séquestration splénique est significative seulement chez les mâles. L'incapacité de l'HbF à moduler de manière uniforme toutes les complications cliniques de la drépanocytose a été en partie interprétée, par certaines études, par l'existence d'une éventuelle valeur ou concentration seuil d'HbF au-dessus de laquelle un patient serait protégé de la morbidité de la maladie. En effet, cette problématique a été l'objet des travaux de recherche réalisés par Powars et ses collaborateurs en 1984 qui ont eu pour but de comparer des manifestations cliniques de 272 patients atteints de drépanocytose homozygote à leurs taux d'HbF (Powars et al., 1984). L'HbF a été déterminée quantitativement par des procédures de microchromatographie ; la moyenne de l'HbF dans la cohorte a été de $10\% \pm 6\%$ avec une fourchette de 2% à 32%. Les groupes HbF choisis ont donné lieu à la distribution suivante : 0-4% d'HbF (48 patients), 5-9% d'HbF (105 patients), 10-14% d'HbF (61 patients), 15-19% d'HbF (31 patients) et $\geq 20\%$ d'HbF (27 patients). La **figure 69** présente les résultats de l'étude qui ont montré que les patients dont le taux d'HbF était supérieur à 20% présentaient des taux systématiquement plus faibles d'événements cliniques récurrents tels que les crises vaso-occlusives, le syndrome thoracique aigu et les hospitalisations. Pour les

défaillances d'organes, tels que les accidents vasculaires cérébraux ou les nécroses aseptiques, le seuil semblait être de 10 %. Concernant la méningite/septicémie, les patients présentant un taux d'HbF de 20 % avaient le deuxième taux d'incidence le plus faible (le groupe présentant un taux de 0 à 4 % était légèrement inférieur). Ce résultat ne constitue pas un contre-exemple car l'écart est lié à l'exclusion des enfants âgés de moins de 5 ans en raison de leur incapacité à atteindre un taux stable d'HbF, ce qui a entraîné une réduction significative du nombre de cas analysables de méningite/septicémie. Le risque de cette complication clinique est plus élevé chez les jeunes enfants, et le nombre plus faible de cas d'infections de type adulte pourrait avoir causé la variabilité des taux d'incidence.

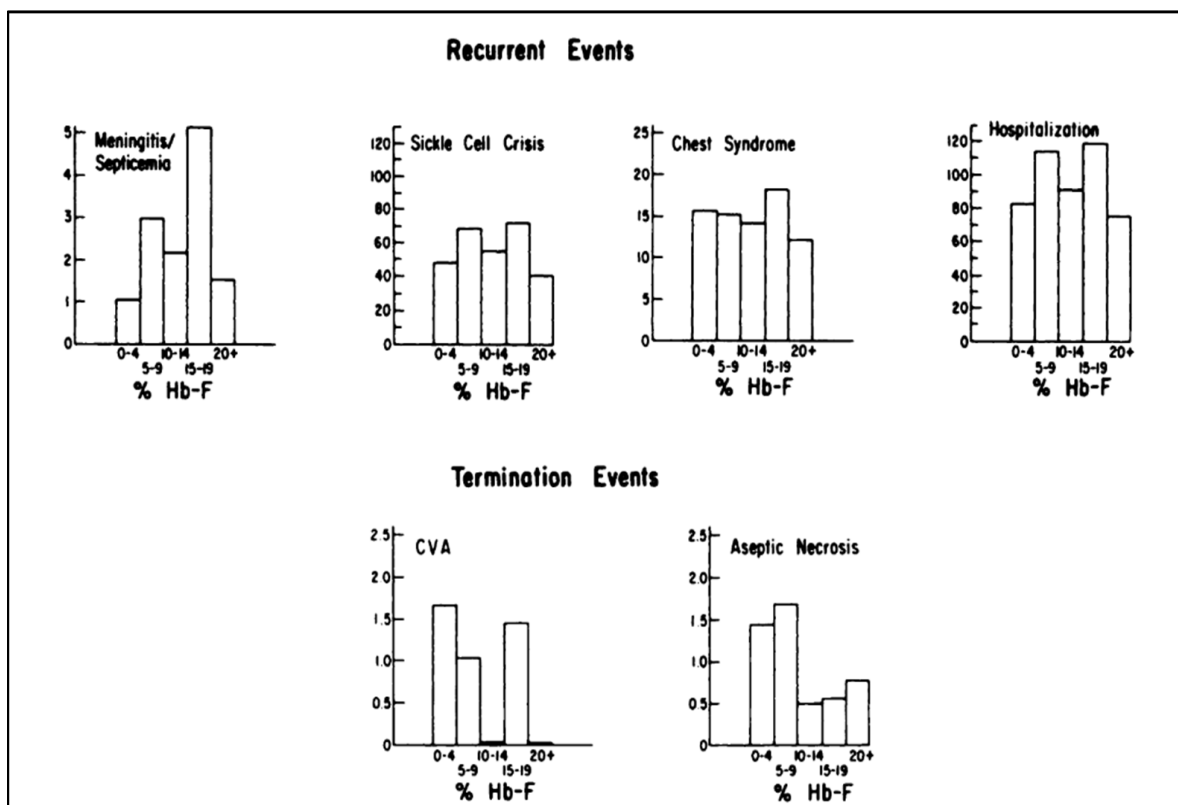


Figure 70. Taux d'incidence ajustés selon l'âge et l'hémoglobine fœtale pour la méningite-septicémie, la crise drépanocytaire, le syndrome thoracique, les hospitalisations, les accidents vasculaires cérébraux (CVA) et la nécrose aseptique (Powars et al. 1984).

L'âge des participants à l'inclusion est entre la naissance et 56 ans. La durée moyenne de suivi : 11 ans.

L'atténuation de la sévérité des complications cliniques de la drépanocytose par les taux élevés d'HbF impacte positivement en permettant la prolongation de l'espérance de vie des patients. En effet, dans l'étude coopérative sur la drépanocytose (*Cooperative Study of Sickle Cell Disease, CSSCD*) menée par Platt et ses collaborateurs. (1994) sur l'espérance de vie et les facteurs de risques de décès précoce chez les patients atteints de drépanocytose, les résultats obtenus ont montré que le risque de décès précoce est inversement associé au taux d'HbF.

Cette association est illustrée par une survie accrue des patients présentant un taux d'HbF supérieur à 8,6% (**Figure 70**). Cette étude a également révélé que les adultes qui avaient un faible taux d'HbF pendant leur enfance sont susceptibles de décéder plus tôt que ceux qui avaient un taux élevé.

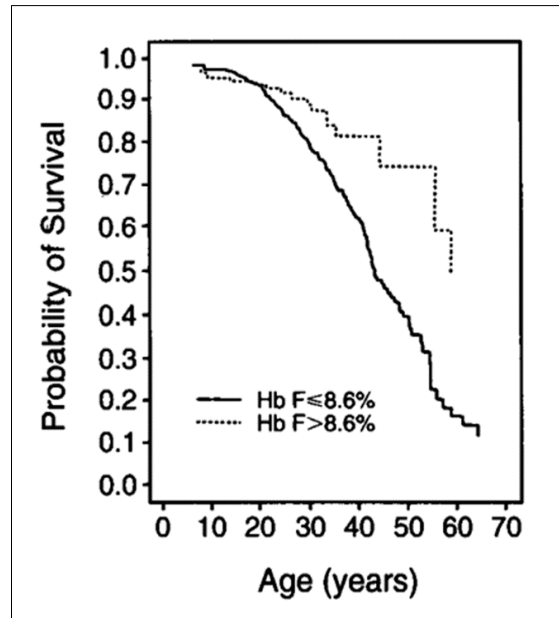


Figure 71. Courbes de survie de Kaplan-Meier des enfants et adultes atteints de drépanocytose homozygote inclus dans l'étude CSSCD (Platt et al. 1994).

Patients atteints de drépanocytose âgés de plus de cinq ans et dont le taux d'hémoglobine foétale (HbF) était égal ou inférieur au 75^e percentile (>8,6%). L'âge des participants à l'inclusion est entre la naissance et 66 ans. ($n_{\text{mâles}}=1229$ et $n_{\text{femelles}}=1313$).

21.1. Concentration et distribution globulaires de l'hémoglobine foétale

Concentration de l'hémoglobine foétale et pourcentage de cellules F. Comme rapporté et démontré dans les études citées précédemment, la concentration d'HbF est l'un des facteurs importants contribuant à l'histoire naturelle très variable de la drépanocytose homozygote. Des concentrations élevées d'HbF sont généralement associées à une évolution clinique relativement bénigne de la drépanocytose observée chez des patients de différentes origines (Afrique, province orientale de l'Arabie Saoudite et centre d'Inde) (Bailey et al., 1992). Cependant, certaines études ont mis en doute la pertinence clinique de la concentration totale d'HbF mesurée à partir d'un hémolysat de GR (Seltzer et al., 1992; Steinberg et al., 2014). Parmi ces études, celle réalisée par Seltzer et al. (1992) qui a consisté à analyser des paramètres cliniques, hématologiques et génétiques de cinq familles de patients de génotype SS présentant des taux d'HbF anormalement élevés (moyenne 28,3% ; étendue 19 - 42%). Ces familles, identifiées à partir d'un total de 76 familles et de 90 patients SS suivis dans la clinique du Colorado entre 1974 et 1988, contiennent chacune au moins un membre SS âgé de plus

de 5 ans et ayant un taux d'HbF supérieur à 25% (28-42%). Les données obtenues dans cette étude (**Tableau 9**) ont démontré que i) certains patients sont symptomatiques malgré un taux d'HbF très élevé, ii) certains patients sont asymptomatiques ou légèrement affectés pourtant leur taux d'HbF est plus faible de celui des patients symptomatiques (cas des patients I-C, III-D et V-C), iii) pour le même pourcentage d'HbF (cas des patients I-B[symptômes légers] et IV-D [symptômes sévères] avec un taux d'HbF de 19%), la gravité de la maladie est variable.

Tableau.9. Diagnostic, symptômes, fluorescence de l'HbF et des cellules F (Seltzer et al. 1992).

Family	Age (years)	Genotype	Symptoms	Hb F %	%Total	F Cell Fluorescence			
						1+	2+	3+	4+
I-A (daughter)	32	AS		1.4	15	0	2	7	6
I-B (son)	27	SS	Mild	19.0	17	0	0	4	13
I-C (son)	33	SS	None	28.0	70	39	26	3	2
II-A (father)	38	AS		<1.0	10	0	0	3	7
II-B (mother)	28	AS		1.7	13	0	0	4	9
II-C (son)	9	AS		1.6	16	0	0	6	10
II-D (son)	5.5	SS	None	42.0	81	37	21	21	5
III-A (father)	25	AS		<1.0	14	0	2	1	11
III-B (mother)	25	AS		<1.0	21	0	4	7	10
III-C (daughter)	4	AS		<1.0	10	0	0	3	7
III-D (son)	5.5	SS	Mild	32.0	72	46	15	10	1
IV-A (father)	66	AS		<1.0	15	0	2	8	5
IV-B (mother)	60	AS		<1.0	11	0	0	6	5
IV-C (daughter)	33	AS		<1.0	6	0	0	3	3
IV-D (daughter)	30	SS	Severe	19.0	34	19	6	5	4
IV-E (son)	32	SS	Moderate	25.0	79	23	18	19	19
IV-F (daughter)	35	SS	None	30.0	75	15	20	22	18
V-A (father)	28	AS		<1.0	8	0	0	2	6
V-B (mother)	27	AS		<1.0	10	0	0	5	5
V-C (son)	7	SS	Moderate	31.0	50	0	0	26	24

Clinique. **Mild symptoms (ou symptômes légers)** : patients définis comme n'ayant que des épisodes douloureux occasionnels ou une hospitalisation rare. **Moderate symptoms (ou symptômes modérés)** : patients caractérisés par des antécédents de 2 à 4 hospitalisations par an pour des complications liées à la drépanocytose ou des épisodes fréquents de douleur invalidante. **Severe symptoms (symptômes sévères)** : patients qui présentent des problèmes fréquents nécessitant de multiples hospitalisations (plus de 4 par an). **Hémoglobines.** L'HbS a été quantifiée par micro-colonne. L'HbF a été mesurée par immunodiffusion radiale (RID). **Immunofluorescence de l'HbF.** deux mille globules rouges par lame d'immunofluorescence ont été comptés et l'intensité de fluorescence a été enregistrée pour chaque cellule sur un **score de 1+ à 4+**.

Dans cette étude, les auteurs ont également analysé l'évolution clinique de la drépanocytose en fonction du pourcentage des cellules F (GR qui contiennent une quantité d'HbF mesurable/détectable). Les résultats ont montré que les patients qui ont tendance à être légèrement symptomatiques ou asymptomatiques ont généralement entre 70 et 81% de cellules F. Cependant le patient I-B présentant seulement 17% de GR-F manifeste des symptômes plus légers que ceux qui contiennent un pourcentage plus élevé de cellules F. En

conclusion, ni le taux d'HbF ni le pourcentage de cellules F ne semblent pouvoir expliquer entièrement la variabilité de la sévérité clinique de la drépanocytose.

Distribution de l'hémoglobine fœtale dans chaque globule rouge. Les conclusions tirées à partir des travaux de recherche de Seltzer et ses collègues ont été confortées par Steinberg *et al.* (2014) qui suggèrent que le taux d'HbF ou le pourcentage des cellules F sont de mauvais indicateurs ou prédicteurs de la sévérité de la pathologie chez un patient drépanocytaire car aucun ne tient en compte de la distribution des taux d'HbF parmi les cellules F ; c'est-à-dire ; le nombre de cellules F qui ont des niveaux d'HbF suffisants pour protéger contre les dommages induits par les polymères d'HbS. Cette proposition a été présentée après constatation des différences observées au niveau des caractéristiques cliniques et hématologiques de deux groupes de patients drépanocytaires de génotypes différents manifestant des taux d'HbF totale similaires (revue dans Steinberg, 2020). Les deux groupes de patients en question sont les suivants : groupe 1 inclut des patients drépanocytaires hétérozygotes pour l'HbS et les délétions génétiques communes P₁H₁F1 et P₁H₁F2 responsables de la persistance héréditaires de l'HbF qui présentent un taux total d'HbF de 30% avec une HbF distribuée de manière homogène ou pancellulaire dans les GR HbS-P₁H₁F. Ces derniers qui sont dotés de 10 pg d'HbF, une quantité jugée totalement inhibitrice de la polymérisation d'HbS même à des niveaux bas de saturation en oxygène, ne contiennent pas de polymères d'HbS. Par conséquent, les patients porteurs de ce génotype ne souffrent pas d'anémie hémolytique et sont généralement asymptomatiques. Le groupe 2 regroupe des patients drépanocytaires homozygotes non traités ou traités avec de l'hydroxyurée (la polymérisation est possible à 70% de saturation en O₂) pouvant avoir des pourcentages d'HbF similaires à ceux trouvés dans l'HbS-P₁H₁F, mais qui sont généralement symptomatiques et souffrent tous d'une anémie hémolytique. À la suite de ce contraste, Steinberg et ses collaborateurs ont adhéré à l'idée, déjà discutée dans des travaux de recherche antérieurs (Noguchi *et al.*, 1989, Seltzer *et al.*, 1992), que la distribution des concentrations d'HbF au sein de chaque GR et le nombre de cellules F contenant des concentrations d'HbF suffisantes pour l'inhibition de la formation de polymères de l'HbS sont les déterminants les plus critiques dans la physiopathologie de la drépanocytose homozygote. Pour le démontrer, les auteurs ont modélisé mathématiquement les distributions possibles de l'HbF/cellules-F générées pour des patients SS présentant des taux d'HbF de 5% , 10% , 20% et 30% (Figure 71), représentatifs des haplotypes bantou, béninois et arabo-indien respectivement, caractérisés par une distribution hétérogène d'HbF parmi les GR. Comme le montrent les simulations, le nombre de GR entièrement protégés des dommages induits par les polymères d'HbS est faible lorsque le taux d'HbF est inférieur ou égal à 20%. En effet, à des concentrations d'HbF totale de 10% et de 20%, le nombre de cellule F protégées est de seulement 15% et 25% respectivement reflétant l'état symptomatique de la majorité des patients manifestant ces taux d'HbF. La modélisation de la concentration d'HbF

à 30%, un taux qui n'est pas fréquent chez les patients adultes même lorsqu'ils ont sous hydroxycarbamide, a montré qu'à ce niveau d'HbF, la maladie est bénigne puisque 70% des GR des patients peuvent être protégés. Ces résultats concordent avec les observations cliniques chez les patients drépanocytaires d'origine saoudienne qui manifestent généralement une maladie peu symptomatique chez les enfants présentant des concentrations d'HbF avoisinantes les 30% mais qui deviennent symptomatiques à l'âge adulte lorsque les taux d'HbF chutent à 15% ou 20%.

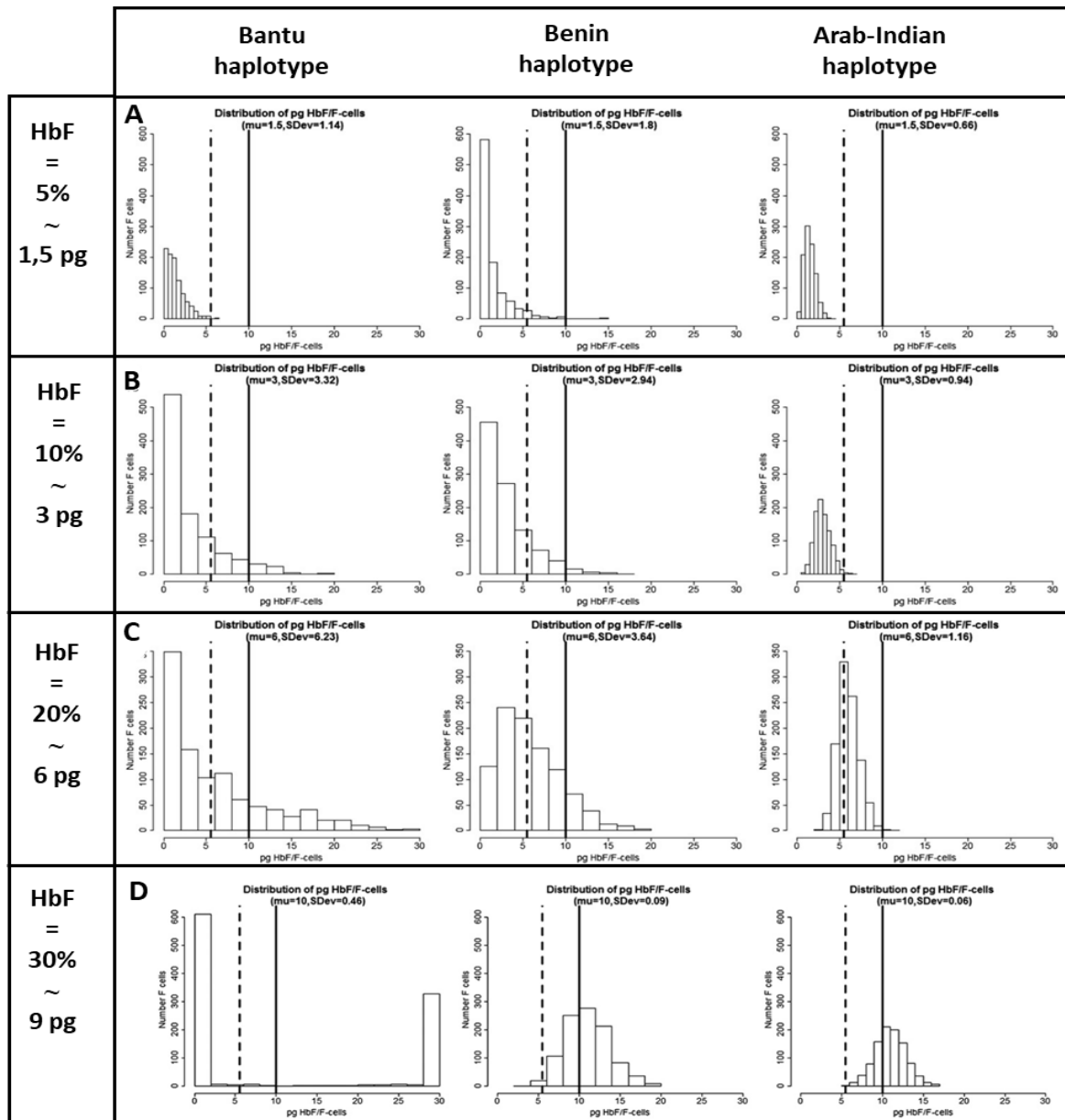


Figure 72. Distribution hypothétique de l'HbF/cellule-F et du pourcentage de cellules F chez 4 patients présentant des taux d'HbF de 5% (A), 10% (B), 20% (C) et 30% (D) (Steinberg et al., 2014).

Les tracés, dans les figures (A, B et C) ont été générés en simulant un échantillon de 1000 cellules par tracé à l'aide d'une distribution β définie dans la plage 0 à 30, avec une teneur moyenne par cellule de 5% ($\mu = 1.5$ pg), 10% ($\mu = 3$ pg), 20% ($\mu = 6$ pg) et 30% ($\mu = 9$ pg). Avec

une moyenne fixe, l'écart-type (SDev) a été modifié pour montrer comment la distribution d'HbF par cellule peut varier considérablement même si la moyenne est la même. Les simulations ont été réalisées avec le logiciel R. Les lignes verticales en pointillés représentent la limite inférieure d'HbF détectable par cytométrie de flux (FACS), soit 6 pg. Les lignes verticales pleines indiquent le niveau d'HbF qui inhibe la polymérisation de la désoxyHbS à des saturations physiologiques en O₂, soit 10 pg. Les tracés dans la figure (D) ont été générés comme dans les figures (A, B et C), en utilisant une distribution β avec une moyenne fixe de ($\mu = 10$ pg) et un écart-type décroissant. Le panneau de gauche montre un exemple extrême de distribution en forme de U avec une moyenne de 10 pg mais une très grande variance. Dans cette situation, les cellules F sont soit totalement protégées (100% HbF), soit totalement non protégées (0% HbF), avec très peu de cellules présentant des concentrations intermédiaires d'HbF/cellule F.

Le pourcentage des GR protégés, cellules F contenant des concentrations protectrices d'HbF, et la quantification de l'ampleur de leur distributions sont illustrés dans le [tableau 10](#) pour les 4 taux d'HbF totale modélisés dans la figure 17. Le calcul du rapport entre les cellules protégées et toutes les cellules F a montré qu'avec le même niveau d'HbF dans l'hémolysat, le nombre de cellules F n'est pas égal au nombre de cellules protégées.

Tableau.10. Pourcentage et ratio de cellules F protégées (Steinberg et al. 2014).

HbF level	SDev	SDev	SDev
	Percent protected cells		
5%	0	0.8	0.0
10%	5.2	3.7	0.0
20%	21.8	15.1	0.0
30%	38.8	63.7	68.0
	Ratio protected/unprotected cells		
5%	0.00	0.02	0.0
10%	0.06	0.04	0.0
20%	0.28	0.18	0.0
30%	0.63	1.75	2.13

Pourcentage de cellules F protégées, cellules F contenant des concentrations protectrices d'HbF pour différents taux d'HbF et distribution d'HbF/cellule-F. Rapport cellules protégées/non protégées, rapport entre les cellules F contenant des concentrations protectrices d'HbF et les cellules F sans concentration protectrice d'HbF pour différents taux d'HbF dans l'hémolysat et distribution de l'HbF/cellule-F. Les colonnes représentent les écarts types décroissants des distributions présentées dans la figure 17.

Dans leur étude de 2014, Steinberg et ses collègues ont eu recours à la modélisation mathématique car, à l'époque, il n'existait pas de méthodes capables de nous fournir des données sur la distribution de l'HbF/cellules-F. Cependant, nous disposons actuellement au sein de notre équipe de recherche d'une méthode de quantification précise de l'HbF individuellement dans chaque GR (Hebert et al., 2020). Le principe de cette méthode est basé sur une corrélation entre la teneur moyenne en HbF (*Mean Concentration of HbF, MCHbF*) et la fluorescence moyenne des globules rouges mesurée par cytométrie de flux en utilisant un anticorps anti-HbF. Cette association linéaire permet de calculer les pourcentages de globules rouges qui contiennent une quantité donnée d'HbF (seuil HbF/GR). Les étapes de cette méthode sont brièvement présentées dans la [figure 72](#).

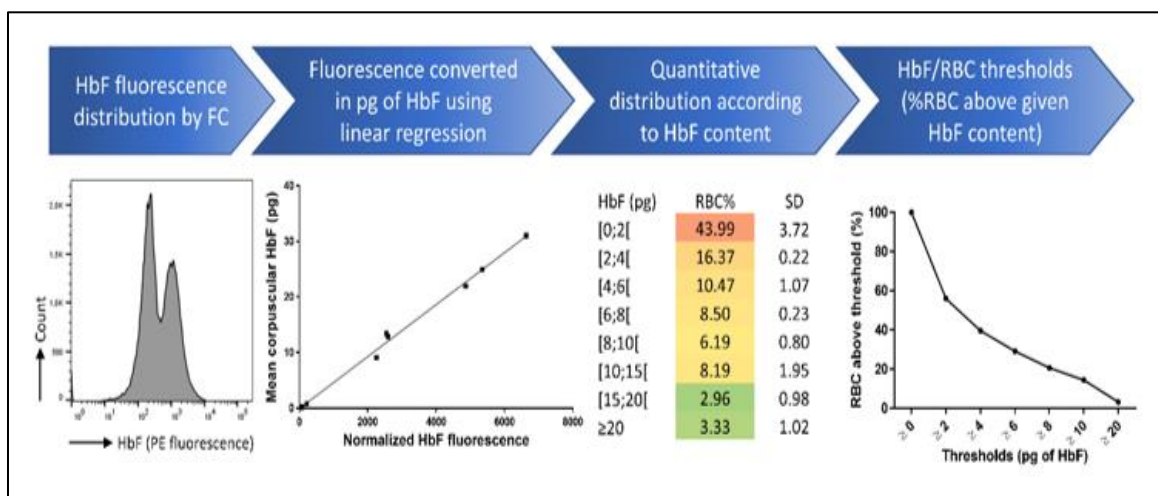


Figure 73. Quantification de l'HbF par globule rouge évaluée par cytométrie de flux (Hebert et al., 2020).

Comment l'hémoglobine F atténue-t-elle la sévérité de la drépanocytose ? L'HbF a la capacité d'inhiber la polymérisation d'HbS (Noguchi et al., 1993; Poillon et al., 1993; Lettre and Bauer 2016; Eaton and Bunn, 2017), de réduire la survenue des événements physiopathologiques sous-jacents à la drépanocytose notamment l'hémolyse (Moreira et al., 2015), et de prolonger la durée de vie des GR drépanocytaires (Franco et al., 1998; Franco et al., 2006).

21.2. Effet de l'hémoglobine fœtale sur la polymérisation

La formation de polymères d'HbS favorisée par la diminution de la solubilité de la désoxy-HbS intracellulaire dans les GR de patients est à l'origine de l'initiation des changements pathologiques caractérisant la drépanocytose (Noguchi et al., 1993; Piel et al., 2017). Comme mentionné précédemment, le taux de polymérisation d'HbS est extrêmement sensible à la pression d'O₂, à la CCMH mais aussi à la composition en Hb dans le GR drépanocytaire. Des études biophysiques ont démontré que l'augmentation de la proportion des Hb-non-S, celle

de l'HbF en particulier, dans le GR est bénéfique (Noguchi et al., 1993). La fraction de polymère prédite et calculée en fonction de la saturation en O₂ pour un mélange d'HbS avec l'HbF dont le taux varie de 0% à 40% diminue avec l'augmentation du pourcentage d'HbF (**Figure 73A**).

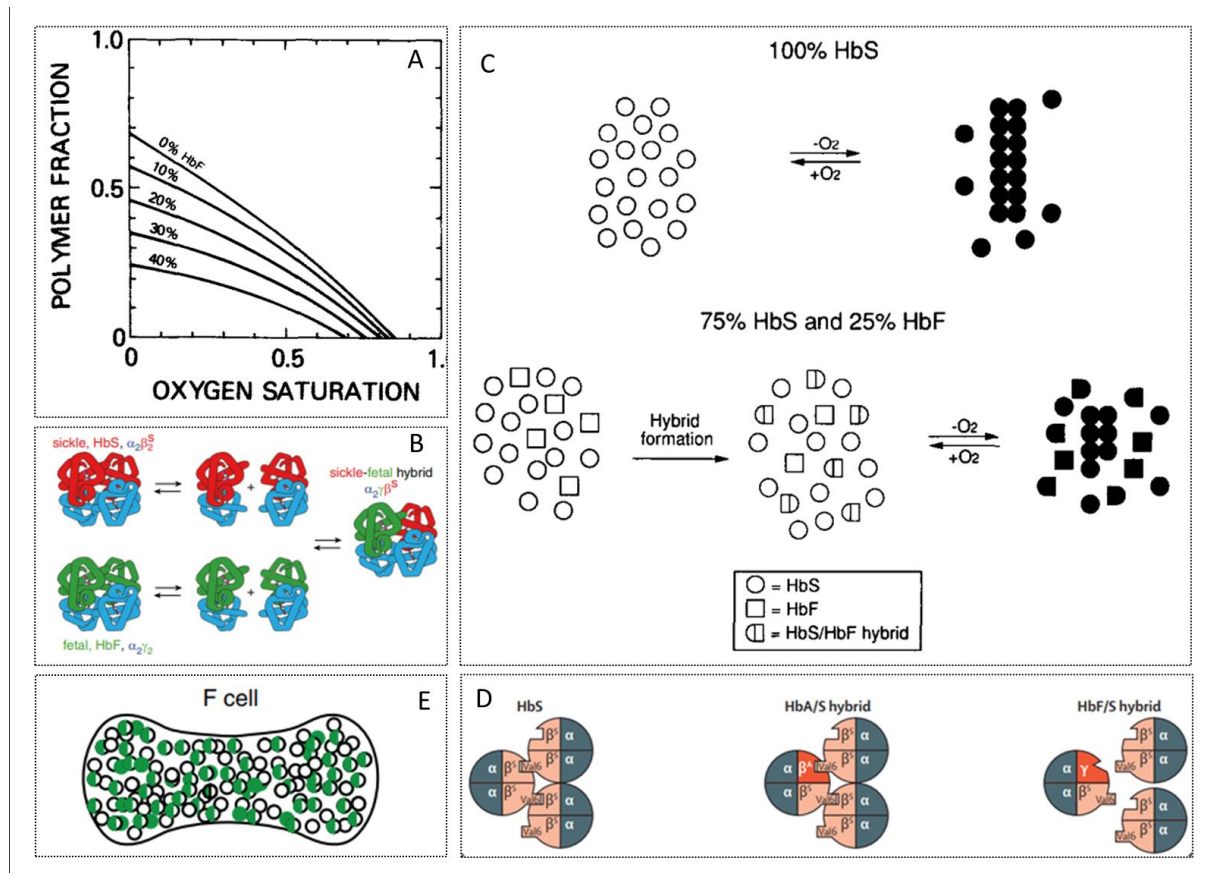


Figure 74. Inhibition de la polymérisation de l'HbS par l'hémoglobine foetale (Noguchi et al., 1993; Lettner and Bauer, 2016; Eaton and Bunn, 2017).

(A) Fraction de polymère prédite pour une concentration d'hémoglobine de 34 g/dL pour les mélanges HbS et F et des quantités croissantes d'HbF de 0 à 40% (Noguchi et al., 1993). (B) La dissociation des tétramères en dimères et la réassociation dans les mélanges d'HbS et d'HbF donnent des tétramères dans une distribution binomiale, ce qui diminue encore la fraction de l'homo-tétramères d'HbS ($\alpha_2\beta^S_2$) (Eaton and Bunn, 2017). (C) Schéma de la cellule-F avec 30% d'HbF et 70% d'HbS. L'effet de volume exclu du tétramère non copolymérisant $\alpha_2\gamma_2$ (cercles remplis de vert) et du tétramère partiellement copolymérisant $\alpha_2\beta^S\gamma$ (cercles mi-verts, mi-vides) augmente l'activité du homotétramère polymérisant $\alpha_2\beta^S_2$ (cercles vides) (Noguchi et al., 1993). (D) Effet inhibiteur (*sparing effect*) de l'hémoglobine F (HbF). Désoxygénation d'une solution pure d'HbS proche des conditions physiologiques ou de GR à teneur moyenne en Hb et peu d'HbF donne une fraction de polymère d'environ 0,7. Les mélanges d'HbS et d'HbF contiennent des tétramères d'HbS ($\alpha_2\beta^S_2$), d'HbF ($\alpha_2\gamma_2$) et d'hybride ($\alpha_2\beta^S\gamma$). L'effet inhibiteur de la polymérisation de l'HbF résulte du fait que ni l'HbF ni l'Hb hybride n'entrent dans la phase polymère. Par conséquent, pour un mélange de 75% d'HbS et 25% d'HbF proches des conditions physiologiques, la désoxygénation entraîne une fraction de polymère de seulement 0,4 (Noguchi et al., 1993). (E) Les tétramères de l'HbS ont tendance à se polymériser dans les conditions désoxygénées. L'effet inhibiteur de la polymérisation de l'HbF est supérieur à celui de l'HbA car la chaîne γ -globine a le glutamine (Gln) plutôt que la thréonine (Thr) en position 87 et donc une zone moins hydrophobe pour les interactions latérales avec la Val 6 de la β^S .

Dans les GR co-exprimant la γ et la β^s globines, la plupart de la γ -globine est incorporée dans les hétérotétramères hybrides ($\alpha_2\beta^s\gamma$) qui ont un effet inhibiteur de la polymérisation (Lettre and Bauer 2016).

En comparant l'effet de l'HbF sur la polymérisation aux effets de la concentration totale d'Hb intracellulaire et de la solubilité de la désoxyHbS, il a été montré qu'une solution S à 34 g/dL complètement désoxygénée contenant 10% d'HbF présente, par rapport à la solution de désoxyHbS pure, une fraction de polymère réduite. Cette réduction est comparable à celle obtenue par une diminution de 10% de la CCMH ou une augmentation de la solubilité de la désoxyHbS par un facteur de 1,2. Cependant, lorsque la saturation en O_2 augmente, l'effet inhibiteur de l'hémoglobine F sur la polymérisation diminue en raison du comportement non idéal de la solution concentrée d'hémoglobine (Noguchi et al., 1989). L'effet inhibiteur de l'HbF sur la polymérisation se fait par deux mécanismes. Le premier résulte de la diminution de la concentration intracellulaire de l'homotétramère $\alpha_2\beta^s_2$. La dissociation des tétramères ($\alpha_2\beta^s_2$ et $\alpha_2\gamma_2$) en dimères ($\alpha\beta^s$ et $\alpha\gamma$) et la réassociation aléatoire donnent lieu à une distribution binomiale des tétramères ($\alpha\beta^s\alpha\beta^s$, $\alpha\beta^s\alpha\gamma$ ou $\alpha\gamma\alpha\gamma$), ce qui réduit encore la concentration de l'HbS (**Figure 73B**). Par exemple, Un mélange de 70% d'HbS et 30% d'HbF contient 3 tétramères avec une distribution binomiale (49% $\alpha_2\beta^s_2$, 9% $\alpha_2\gamma_2$ et 42% $\alpha_2\beta^s\gamma$). Un autre processus qui participe à la diminution de la concentration d'HbS, en plus de celui de la dissociation et réassociation du tétramère, est la non-idéalité de la solution concentrée d'HbS dans le GR (**Figure 73B**). Comme déjà décrite dans les parties précédentes, la concentration nécessaire thermodynamiquement à la formation de polymères d'HbS est appelée « activité ». Cette dernière est définie comme le produit de multiplication de la concentration de l'HbS par le coefficient d'activité (γ), un facteur de correction qui prend en compte l'espace occupé par les tétramères non-copolymérisants, ce qui entraîne la diminution du volume accessible aux tétramères polymérisants. Ce phénomène est connu sous le nom « d'effet du volume exclu », qui n'est généralement pas pris en considération dans les études thermodynamique et cinétique. Un exemple qui illustre bien cet effet est l'activité d'une solution d'HbS à 35 g/dL (une CCMH typique) estimée à presque 100 fois supérieure à la concentration mesurée (Eaton and Bunn, 2017). Le deuxième mécanisme d'inhibition de la polymérisation d'HbS par l'HbF réside dans le fait que ni l'homotétramère ni l'hétérotétramère hybride d'HbF n'entrent dans la phase de polymère (**Figure 73D**). L'étude de la structure de la forme désoxygénée d'HbS déterminée par cristallographie aux rayons-X a montré que la fibre d'HbS constituée de sept paires de brins de tétramères d'Hb enroulés les uns sur les autres est stabilisée grâce à une interaction latérale établie entre la β^s_6 valine hydrophobe sur un brin et une zone hydrophobe en $\beta^s_85 - 88$ sur le brin adjacent. Cette interaction est rendue plus faible par la sous-unité γ qui possède une glutamine en position 87 à la place de la thréonine (une zone moins hydrophobe). Par conséquent, la probabilité pour que les tétramères contenant des chaînes

γ se copolymérisent avec des tétramères d'HbS contenant des sous-unités β^s devient plus faible (Lettre and Bauer, 2016). Cette analyse structurale est en concordance totale avec les résultats obtenus à partir des études thermodynamiques et cinétiques qui ont montré que la formation de polymères se fait beaucoup moins facilement dans les mélanges d'HbS avec l'HbF que dans des mélanges d'HbS avec l'HbS (Figure 73E) (Lettre and Bauer, 2016).

21.3. Effet de l'hémoglobine fœtale sur l'hémolyse

Dans le cas de la drépanocytose, l'analyse de la tendance à la polymérisation a montré que bien qu'une légère diminution dans la formation des polymères d'HbS ne conduise pas forcément à un bénéfice clinique clair, néanmoins, elle peut être liée à une réduction de l'anémie hémolytique et un allongement de la durée de vie des GR (Noguchi et al., 1989). La réduction du taux d'hémolyse chez les patients drépanocytaires est d'une importance majeure pour leur pronostic (Colella and Traina, 2015). Selon les résultats obtenus d'un essai clinique observationnel multicentrique incluant 415 patients SS suivis pour une durée de 2,4 années, la composante hémolytique est associée à un risque accru de décès qui est multiplié par un facteur de 3 (le rapport de risque est de 3,44, $P=0,02$) (Nouraie et al., 2013). Dans cette étude, la composante hémolytique a été calculé à partir de ce qui est considéré comme un marqueur indirect de l'hémolyse intravasculaire et utilisé généralement pour évaluer le taux d'hémolyse : la numération des réticulocytes, la lactate déshydrogénase sérique, l'aspartate aminotransférase et la concentration de bilirubine totale. La figure 74 montre la relation entre la composante hémolytique et les variables dont elle est issue, ainsi que les relations entre ces variables.

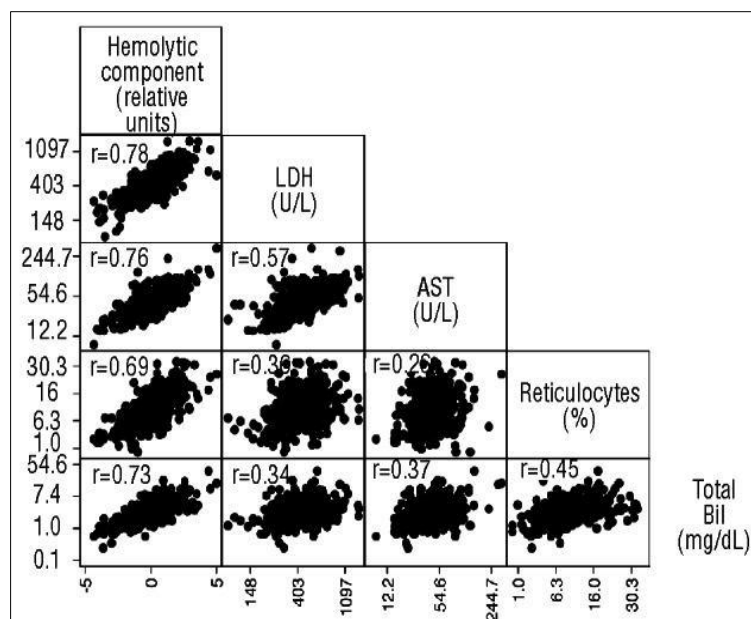


Figure 75. Relations entre la composante hémolytique et les marqueurs dont elle est issue chez les patients SS (n=415) (Nouraie et al., 2013). Le coefficient de corrélation de Pearson est fourni pour chaque relation. Tous les $P < 0,0001$.

Parmi les 415 patients SS, 199 (48%) étaient sous traitement par l'hydroxyurée. Les résultats ont révélé que la composante hémolytique était plus faible dans le groupe de patients SS recevant l'HU ($P= 0,0002$) (Figure 75A) et qu'elle diminue avec l'augmentation du pourcentage de l'HbF ($p<0,0001$) (Figure 75B).

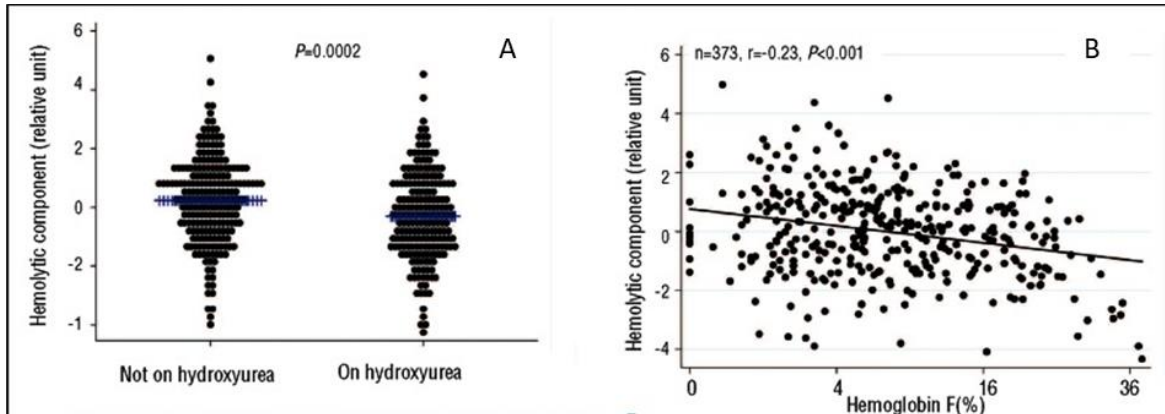


Figure 76. Distribution de la composante hémolytique chez les patients atteints SS ($n= 415$) en fonction des variables connues pour influencer ou refléter l'hémolyse comme (A) le traitement par l'hydroxyurée et (B) le pourcentage d'HbF (Nouria et al., 2013).

Dans l'étude brésilienne de Moreira parue en 2015 dans le journal de Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia, les auteurs ont évalué l'influence de l'HbF sur les biomarqueurs de l'hémolyse (le % de réticulocytes, la lactate déshydrogénase sérique, l'acide urique et l'arginase I) chez 50 patients drépanocytaires homozygotes recevant de l'hydroxyurée pendant au moins 6 mois. Les résultats obtenus, présentés dans la figure 76, ont révélé que malgré l'absence d'une corrélation confirmée entre le taux d'HbF et les paramètres d'hémolyse étudiés, une diminution statistiquement significative du pourcentage de réticulocytes (Figure 76A) et des niveaux d'LDH (Figure 76C) et d'arginase I (Figure 76D) a été détectée chez les patients ayant une concentration en HbF supérieure à 10%. Les niveaux d'arginase I sont significativement plus faibles chez les patients SS recevant de l'HU à une concentration supérieure à 20mg/Kg/jour.

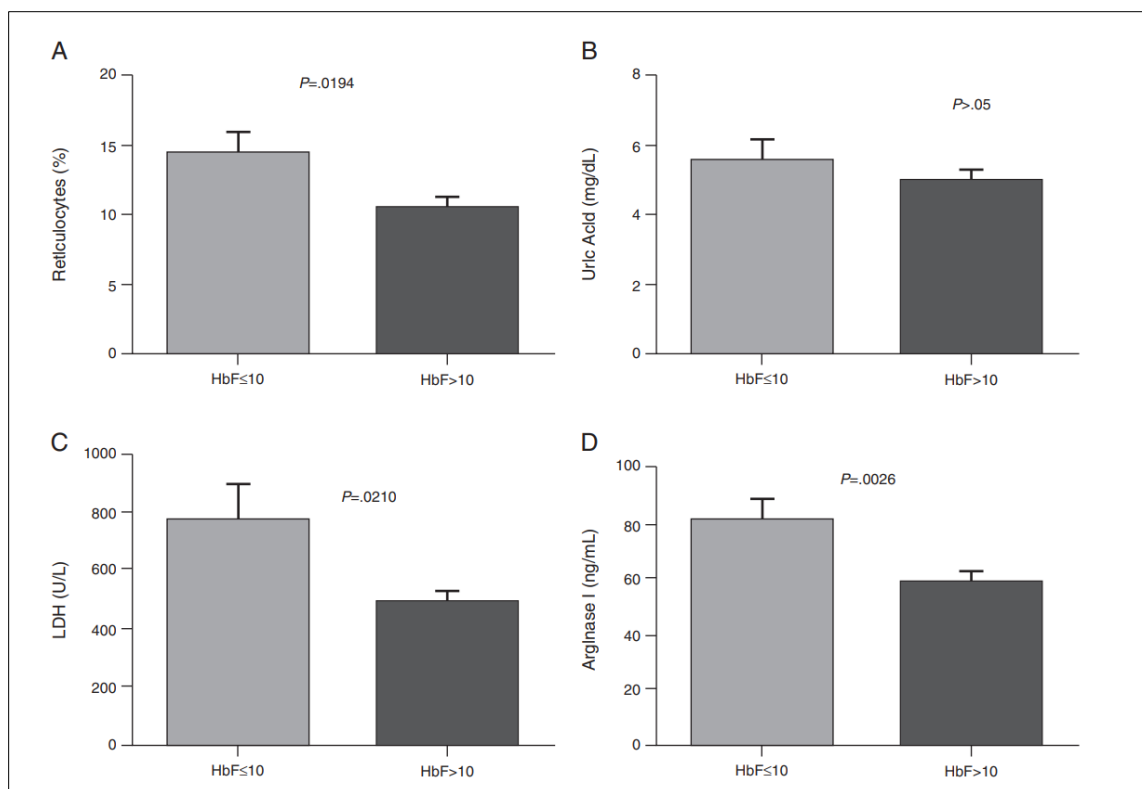


Figure 77. Comparaison des niveaux de biomarqueurs d'hémolyse en fonction de la concentration en HbF (Moreira et al., 2015).

(A) Réticulocytes. (B) Acide urique. (C) Lactate déshydrogénase (LDH). (D) Arginase I. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes ± erreur standard de la moyenne (SEM) et analysés à l'aide du test t non apparié et du test de Mann-Whitney.

L'effet protecteur de l'HbF dans la lyse des GR drépanocytaires a été également étudié par l'équipe d'EL Nemer qui, à travers la conception d'une biopuce microfluidique reproduisant la dimension des capillaires humains, ont mesuré à l'échelle de la cellule unique l'impact de l'expression de l'HbF sur la résistance des GR soumis à une contrainte mécanique répétée (Figure 77). La mesure du pourcentage de GR-F⁺ (GR dans lesquels l'HbF est détectable par cytométrie de flux) et de GR-F⁻ (GR dans lesquels l'HbF n'est pas détectable par cytométrie de flux) dans le dispositif microfluidique a montré que le % des GR-F⁺ était plus élevée dans les suspensions de sortie (output) que dans les suspensions d'entrée (input) pour tous les échantillons, indiquant que la sous-population de GR avec une faible teneur en HbF était plus susceptible d'hémolyser (Figure 77A). L'augmentation significative de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des GR-F⁺ dans la suspension de sortie de la biopuce microfluidique, suggérant la perte de GR avec de faibles niveaux d'HbF (Figure 77B), laisse supposer l'existence d'une quantité minimale d'HbF nécessaire pour protéger les GR de la lyse sous stress mécanique répété. Pour vérifier cette hypothèse *in vivo*, les auteurs ont mesuré le pourcentage d'HbF dans l'Hb libre dans le plasma de patients drépanocytaires en utilisant l'HPLC. Le rapport HbF/HbS dans le plasma était beaucoup plus faible que dans les lysats totaux de GR chez les

7 patients analysés (Figure 77C). Cela indique que les GR-F⁺ sont protégés contre l'hémolyse intravasculaire *in vivo*. Néanmoins, la présence de faibles quantités d'HbF dans le plasma suggère que certains GR ayant une faible quantité d'HbF détectable sont encore sujets à la lyse *in vivo* (Lizarralde Irigorri et al., 2018).

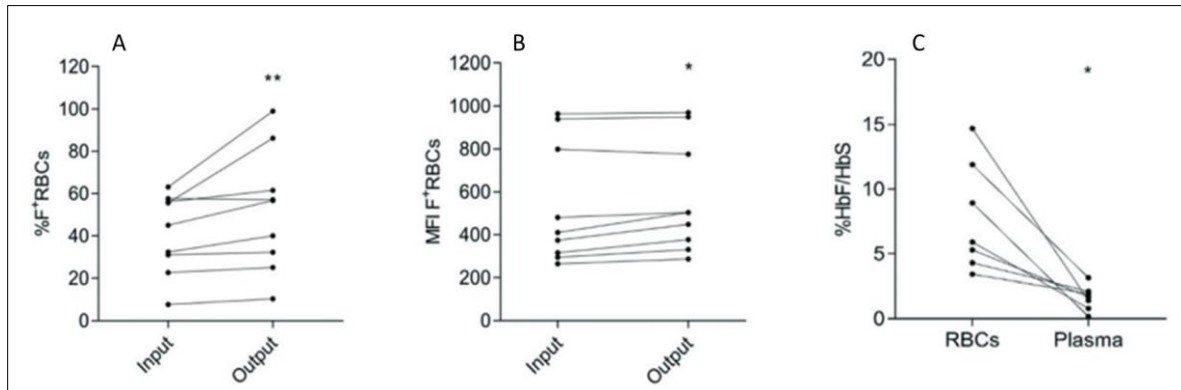


Figure 78. Rôle de l'HbF dans la résistance des GR à la lyse. (A) Pourcentage et (B) MFI des GR-F⁺ (F+RBC) avant et après un stress mécanique (Lizarralde Irigorri et al., 2018).

(C) Pourcentage de HbF/HbS dans les lysats de GR et le plasma de 7 patients atteints de drépanocytose, mesuré par HPLC. Test Wilcoxon pour des échantillons appariés (A et C). *P<0,05, **P<0,01.

21.4. Effet de l'hémoglobine foetale sur la durée de vie des globules rouges drépanocytaires

Dans leur étude de 2006, Franco et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'HbF sur les caractéristiques de survie des GR chez les patients atteints de la drépanocytose. En utilisant la méthode de marquage à la biotine et la mesure de la proportion d'HbF par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps anti-HbF, les auteurs ont élaboré une courbe de survie globale pour tous les GR, à partir de laquelle ils ont ensuite dérivé des courbes distinctes pour les GR avec une teneur en HbF détectable (cellules-F) et les GR ne contenant pas d'HbF ou contenant une quantité d'HbF non détectable (cellules non-F). Un total de 10 patients SS ont été recrutés dont 2 qui ont été étudiés avant et après que les pourcentages d'HbF (mesuré par HPLC) et de cellules-F (mesuré par cytométrie de flux) avaient été augmentés suite au traitement par l'hydroxyurée. Parmi les 8 autres patients, 2 prenaient de l'HU au moment de l'étude. L'analyse des courbes de survie séparée des cellules F et des cellules non-F présentées dans la figure 78 a montré que, chez tous les patients inclus, la survie des GR ayant une forte teneur en HbF est plus longue que celle des cellules non-F, et est caractérisée par une variation mineure entre les patients. La valeur moyenne pour la survie de 30% des cellules F était de 24,3 jours. Cependant, les cellules non-F ont une durée de vie beaucoup plus courte et variable en comparaison avec les cellules F. Leur survie peut aller de 4 à 16 jours. Une interaction entre la durée de vie des cellules non-F et le pourcentage des cellules F a été mise en évidence par les auteurs de cette étude puisqu'il a été observé que la durée de vie des cellules non-F est

réduite lorsque le pourcentage des cellules F est augmenté. Bien que le mécanisme qui régit un tel phénomène biologique ne soit pas encore complètement élucidé, l'interprétation de ce dernier résultat peut avoir un lien avec la fonction du système réticuloendothélial.

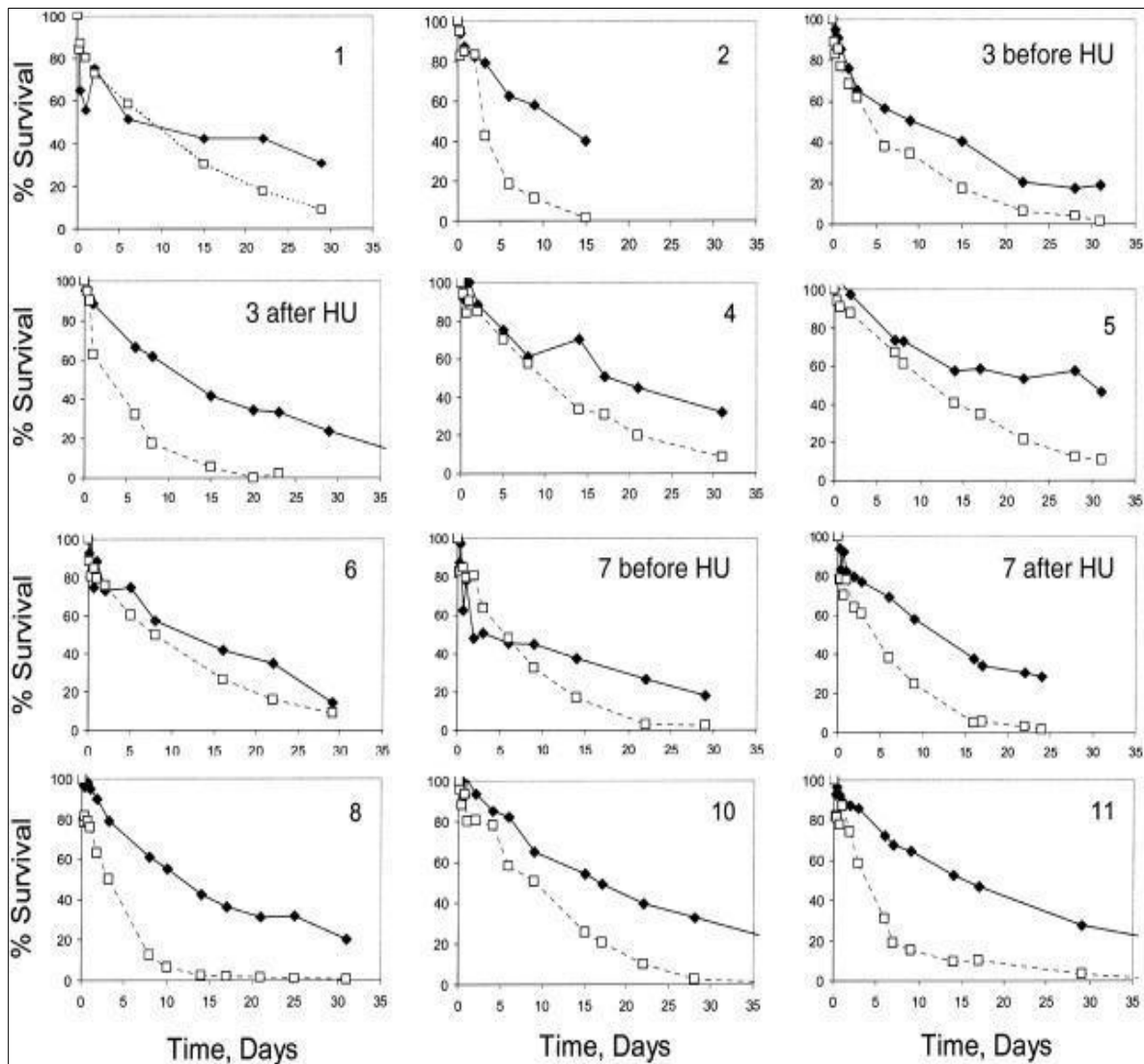


Figure 79. Pourcentage de survie des globules rouges drépanocytaires marqués à la biotine en fonction de leur contenu en HbF (Franco et al., 2006).

La survie est indiquée pour les cellules F (◆) et les cellules non-F (□). La survie de chaque type de cellule a été dérivée de la survie globale des cellules marquées à la biotine et du pourcentage de cellules F marquées à chaque point temporel, comme décrit dans "Matériels et méthodes." Chaque expérience est identifiée conformément au tableau 1.

22. Hydroxyurée et son induction de l'hémoglobine fœtale

Les avantages connus de l'augmentation de l'HbF chez les patients atteints de la drépanocytose ont été à l'origine du développement de diverses options et stratégies thérapeutiques.

Structure chimique et vue historique. L'hydroxyurée, nommée également hydroxycarbamide (HU), appartient à une classe de composés chimiques simples (formule chimique $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$) appelés acides hydroxamiques caractérisés par leur capacité à lier les métaux lourds (**Figure 79**) (Platt, 2008 ; McGann and Ware, 2015; McGann et al., 2018; McGann et al.,2019).

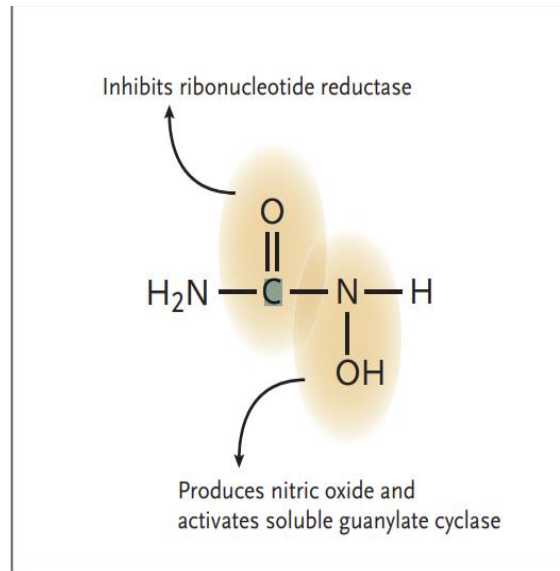


Figure 80. Structure de l'Hydroxyurée (Platt, 2008).

La zone ombragée met en évidence le noyau d'acide hydroxamique de l'hydroxyurée. Les acides hydroxamiques se lient avidement aux métaux lourds et inactivent une variété d'enzymes. L'hydroxyurée inhibe la ribonucléotide réductase, une enzyme contenant du fer, détruisant ainsi les cellules en cycle cellulaire. L'hydroxyurée produit également du monoxyde d'azote et stimule l'enzyme guanylate cyclase. Ces deux activités ont le potentiel d'augmenter la production de cellules F.

L'hydroxyurée est synthétisée pour la première fois en 1869 par Dresler et Stein dans une série d'expériences visant à extraire des dérivés de l'urée. Un siècle plus tard, l'hydroxyurée a été introduite en clinique comme agent chimiothérapeutique pour traiter différents types de tumeurs solides et des leucémies. Grâce à son effet antinéoplasique précocement détecté, l'hydroxyurée a été approuvée pour la première fois par la FDA américaine en 1967. Au milieu des années 1980, des études ont montré que l'hydroxyurée était capable d'induire la synthèse de l'HbF chez les patients drépanocytaires (McGann and Ware, 2015; McGann et al., 2018; McGann et al.,2019). L'hydroxyurée a été approuvée par la FDA en 1998 et par l'Agence européenne des médicaments (EMA) en 2007 pour le traitement de la drépanocytose (Kato et al., 2018). L'hydroxyurée a d'abord été réservée aux patients adultes avec des complications cliniques fréquentes et graves. Cependant, les dernières lignes directrices du *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI) ont recommandé désormais une utilisation beaucoup plus large de l'hydroxyurée, notamment son administration à tous les nourrissons

atteints de la drépanocytose à partir de l'âge de 9 mois, quelle que soit la gravité clinique (McGann et al., 2018).

Mécanismes d'induction d'HbF. Les premiers patients traités à l'hydroxyurée ont eu une réponse dans les 72 heures suivant le traitement, avec une augmentation considérable de jeunes cellules F et finalement un taux élevé d'HbF (McGann and Ware, 2018). Lorsque l'hydroxyurée est administrée à la dose maximale tolérée (DMT) qui varie entre 10 et 35 mg/Kg/jour, le taux d'HbF est augmenté à des niveaux allant de 10% à 40% (Ware et al., 2011). Toutefois, malgré plus de 30 années de recherche documentant les effets bénéfiques biologiques et les nombreuses preuves de l'efficacité clinique du traitement à l'hydroxyurée chez les adultes et les enfants, ses mécanismes d'action pour l'induction de l'HbF restent incomplètement élucidés (Agrawal et al., 2014 ; McGann and Ware, 2015; McGann et al., 2018; McGann et al., 2019). Deux mécanismes d'induction d'HbF par l'HU ont été proposés (Paikari and Sheehan, 2018).

Inhibition de la ribonucléotide réductase. Le mécanisme d'action le plus largement accepté et le mieux compris de l'hydroxyurée *in vivo* est l'inhibition de la ribonucléotide réductase (RR), une enzyme essentielle qui convertit les ribonucléosides en désoxyribonucléosides, lesquels sont nécessaires à la synthèse et à la réparation de l'ADN dans la cellule (**Figure 80A**). L'inhibition puissante de la RR entraîne une diminution des pools intracellulaires de désoxyribonucléotide triphosphates et empêche la progression du cycle cellulaire en phase S (McGann and Ware, 2015; McGann et al., 2018; McGann et al., 2019). L'hydroxyurée inhibe directement la sous-unité M2 de la RR, en liant les deux molécules de fer de la réductase et en désactivant un radical tyrosyle (**Figure 80 B**), mais une régénération spontanée de l'enzyme active se produit lorsque l'hydroxyurée est retirée. Pour cette raison, les effets *in vivo* de l'hydroxyurée sur la RR sont réversibles et prévisiblement transitoires (Platt 2008; Agrawal et al., 2014).

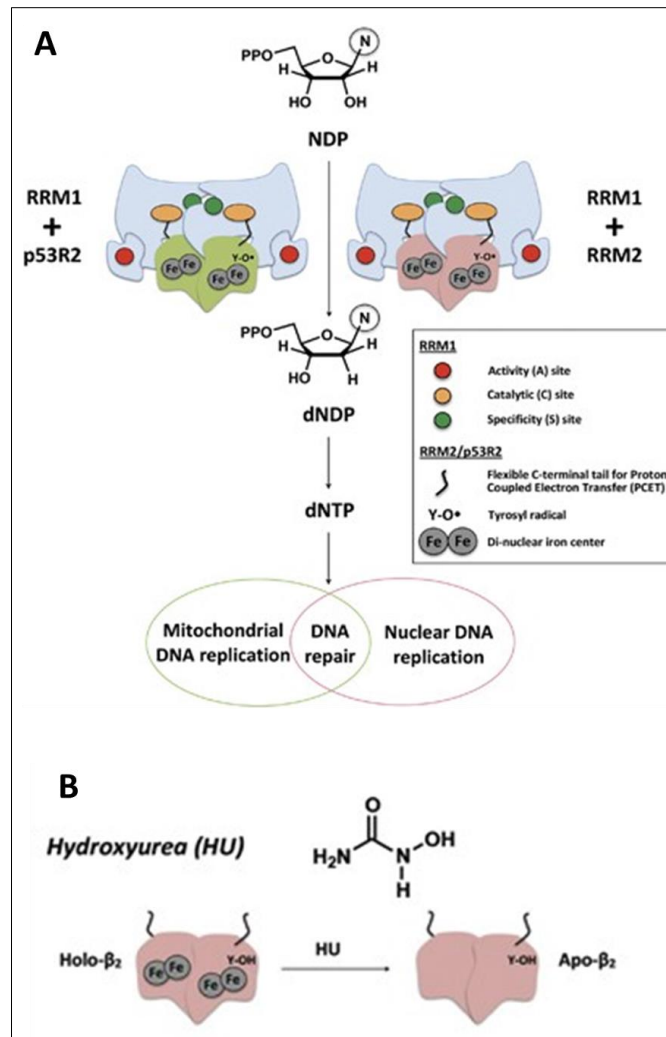


Figure 81. Réaction enzymatique catalysée par la ribonucléotide réductase (A) et effet inhibiteur de l'hydroxyurée (B) (Aye et al., 2014).

L'arrêt temporaire de l'hématopoïèse par l'administration d'hydroxyurée une fois par jour chez les patients drépanocytaires entraîne une suppression cytotoxique intermittente des progéniteurs érythroïdes et une signalisation du stress cellulaire, ce qui modifie ensuite la cinétique et la physiologie érythroïde lors de la récupération et conduit à une réponse "érythropoïèse de stress". Cette dernière favorise la production de globules rouges contenant un taux élevé d'HbF (cellules F) grâce au recrutement de progéniteurs érythroïdes précoces (primitifs ou immatures) qui conservent leur capacité à produire de l'HbF (Figure 81) (Platt, 2008 ; Agrawal et al., 2014 ; McGann and Ware, 2015; McGann et al., 2018; McGann et al., 2019).

Production du monoxyde d'azote. Un autre mécanisme potentiellement important proposé pour l'induction de l'HbF par l'hydroxyurée implique l'induction de la voie de l'oxyde nitrique (NO) – guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Ce modèle est soutenu par les résultats de travaux de recherche réalisés *in vitro* montrant que le métabolisme de l'hydroxyurée

entraîne la production de NO, le NO stimule la guanylate cyclase soluble intracellulaire, une enzyme contenant du fer hémique, qui augmente à son tour le GMPc et induit la production de l'HbF via la protéine kinase (PKG) dépendante du GMPc (Platt 2008; Paikari and Sheehan, 2018).

Autres mécanismes d'action indépendants de l'induction d'HbF. Outre l'induction de l'HbF, le traitement par hydroxyurée dans la drépanocytose est multifactoriel et présente en réalité de multiples avantages potentiels (**Figure 81**). Les effets cytotoxiques de l'hydroxyurée entraînent aussi la réduction de la production de neutrophiles (impliqués dans la survenue de la vaso-occlusion et dont le nombre élevé est associé à la morbidité et à la mortalité), de réticulocytes (impliqués dans la survenue de la vaso-occlusion) et de plaquettes (un important médiateur de l'inflammation) dans la moelle osseuse. Le traitement à l'hydroxyurée a également des effets sur les GR périphériques circulants. Ces derniers subissent plusieurs modifications morphologiques et physiologiques en augmentant la dose du traitement jusqu'à la DMT notamment une macrocytose (un VGM élevé), une augmentation de l'Hb corpusculaire moyenne, une meilleure hydratation et déformabilité cellulaires, une hémolyse moindre, une diminution de l'adhérence et une amélioration globale de la rhéologie. Enfin, la molécule d'hydroxyurée contient un fragment de NO qui, une fois libéré, a des effets bénéfiques sur l'endothélium vasculaire, notamment une vasodilatation locale, et pourrait contribuer à compenser la consommation de NO liée à l'hémolyse (Agrawal et al., 2014).

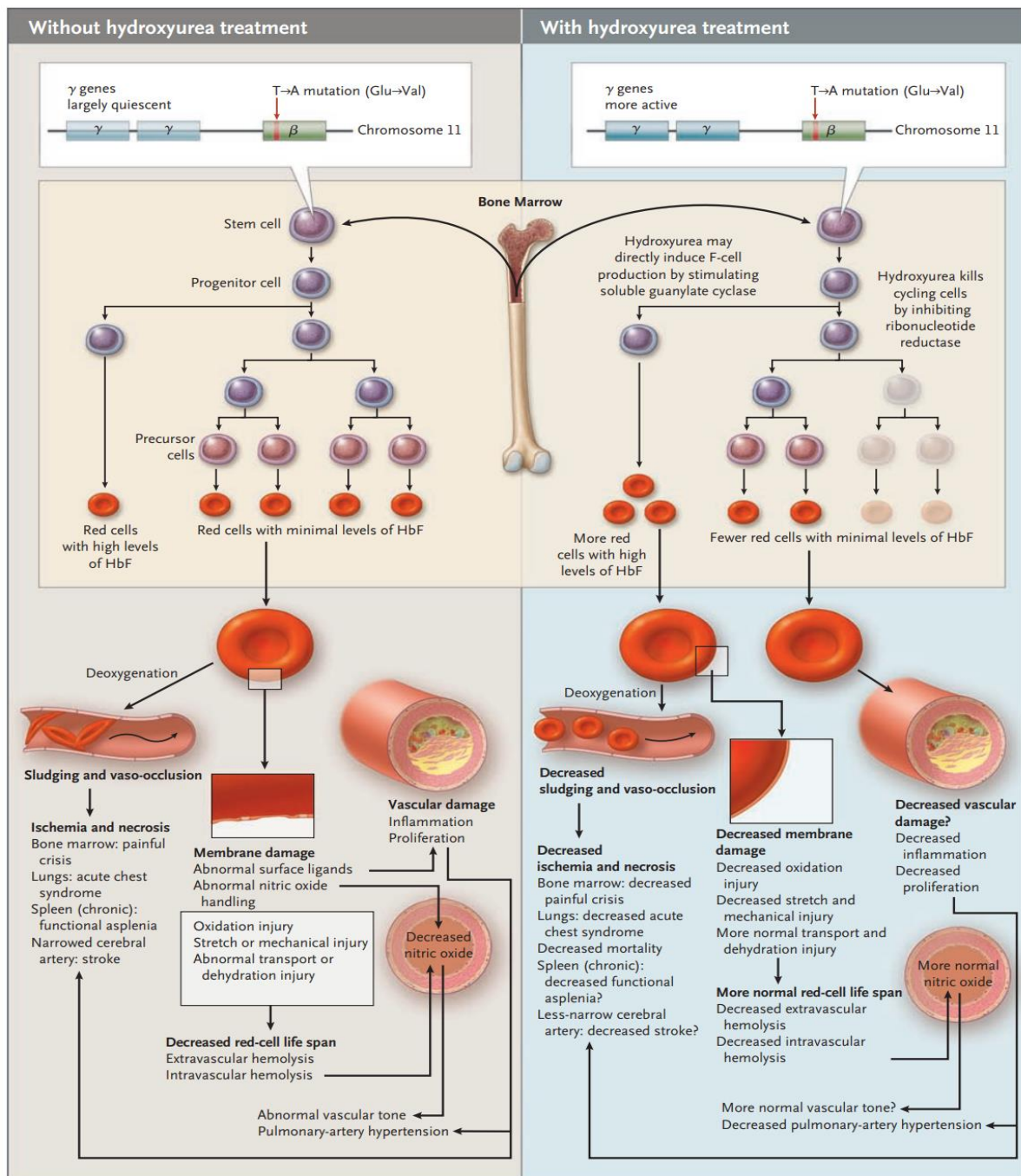


Figure 82. Caractéristiques physiopathologiques de la drépanocytose homozygote et l'effet de l'hydroxyurée (Platt, 2008).

Le gène de la β -globine sur le chromosome 11 contient une mutation qui entraîne la production d'hémoglobine falciforme. Les gènes de la γ -globine ont une séquence normale mais sont quiescents chez les adultes. Dans la moelle osseuse, la plupart des globules rouges sont produits à partir de cellules précurseurs matures et contiennent principalement de l'hémoglobine falciforme. Dans de rares cas, des globules rouges appelés cellules F sont produits directement à partir de progéniteurs primitifs et ont une teneur élevée en hémoglobine fœtale (HbF). Les globules rouges dans la circulation qui ont une forte hémoglobine falciforme subissent une polymérisation et une falsification morphologique lorsqu'ils sont désoxygénés, qui peuvent provoquer des boues ou une vaso-occlusion. L'hémoglobine falciforme endommage la membrane du globule rouge de différentes manières, entraînant une hémolyse et une déplétion de l'oxyde nitrique. Les lésions membranaires entraînent également une augmentation de l'adhérence à la membrane des globules rouges. et des lésions des cellules endothéliales vasculaires. L'hydroxyurée permet aux gènes de la γ -globine d'être plus activement

exprimés. En tuant les cellules du cycle, l'hydroxyurée modifie la cinétique de la prolifération érythroïde, obligeant à produire plus de cellules F à partir de progéniteurs primitifs. L'hydroxyurée produit également de l'oxyde nitrique et stimule directement la production d'hémoglobine fœtale. Comme les cellules F sont moins susceptibles dans les globules rouges contenant peu d'hémoglobine fœtale de d'occlure les vaisseaux et de provoquer des lésions membranaires, le traitement par l'hydroxyurée entraîne moins de symptômes, une anémie hémolytique moins grave et un risque accru d'infection. L'anémie hémolytique moins grave et une mortalité plus faible.

Effets bénéfiques cliniques. Un certain nombre d'essais cliniques menés chez les patients drépanocytaires ont montré les effets bénéfiques de l'utilisation à moyen et long terme de l'hydroxyurée dans la réduction de la fréquence et la sévérité des complications cliniques telles que les crises vaso-occlusives douloureuses (médiane 2,5 pour HU versus 4,5 pour placebo, $p=0,001$, essai clinique MSH), le syndrome thoracique aigu (25 pour HU versus 51 pour placebo, $p=0,001$, essai clinique MSH), ainsi que le besoin de transfusions sanguines (48 patients versus 73, $p=0,001$, essai clinique MSH) et d'hospitalisation. L'hydroxyurée a été également associée à une amélioration de la survie (une réduction de 40% du taux de mortalité) de patients inclus dans l'essai clinique MSH suivis durant 9 ans (Ware et al., 2011; Inusa et al., 2019).

Inconvénients. Bien qu'il s'agisse d'un pilier du traitement de la drépanocytose dans plusieurs pays dans le monde depuis plus de 30 ans, l'hydroxyurée est sous-utilisée en raison de l'insuffisance des infrastructures de soins et de la perception et la peur disproportionnées de la cancérogénicité, de la tératogénicité et de la réduction de la fertilité qui ne semblent pas poser problème jusqu'à maintenant dans les études de suivi (Kato et al., 2018). Ce qui caractérise principalement le traitement par hydroxyurée est une importante variabilité phénotypique inter-patients dont la majeure partie est expliquée par la pharmacocinétique (PK) (profils d'absorption, de distribution, et de clairance), la pharmacodynamique (PD) (les réponse de l'Hb et de l'HbF) et la pharmacogénétique (PGx) de l'hydroxyurée (Ware et al., 2011). Un manque de normalisation concernant les processus optimaux de dosage, de surveillance et d'augmentation de la dose ainsi que de seuils de toxicité a été également observé (McGann et al., 2019). Dans l'études menée par Green et ses collaborateurs en 2016, les auteurs ont extrait des dossiers médicaux les données cliniques rétrospectives de jeunes âgés de 10 à 18 ans pour qui le traitement par hydroxyurée a été prescrit. L'extraction a été effectuée à trois moments différents : avant la prise de l'HU, au moment de la meilleure valeur ou *PBest* (*Personal best*) et lors d'une évaluation récente. Un écart est jugé élevé par rapport au *PBest* si le taux d'HbF mesuré lors de l'évaluation récente a diminué de 20% ou plus malgré une posologie stable. Les auteurs ont également comparé le recours aux soins hospitaliers entre des périodes d'un an, avant la prise d'HU et ± 6 mois pour la *PBest* et l'évaluation récente (**Figure 82A**). Les résultats obtenus ont montré que chez 75 jeunes dont la durée moyenne de la mise sous HU à une dose stable était de 5,9 ans, l'HbF moyenne de 19,5% au moment du *PBest* a diminué de 31,8% lors de la dernière évaluations. L'HbF a diminué de 11,7 et 40,1% dans deux

groupes (**Figure 82B**). Le dernier groupe avait une HbF plus faible avant l'HU et à l'évaluation récente et une posologie plus élevée. Ces jeunes patients ont eu recours plus à l'hospitalisation urgente pendant l'année d'encadrement de l'évaluation récente que pendant la PBest. Le rapport n'a précisé s'il s'agit d'une question liée à l'âge ou à la durée d'utilisation de l'HU.

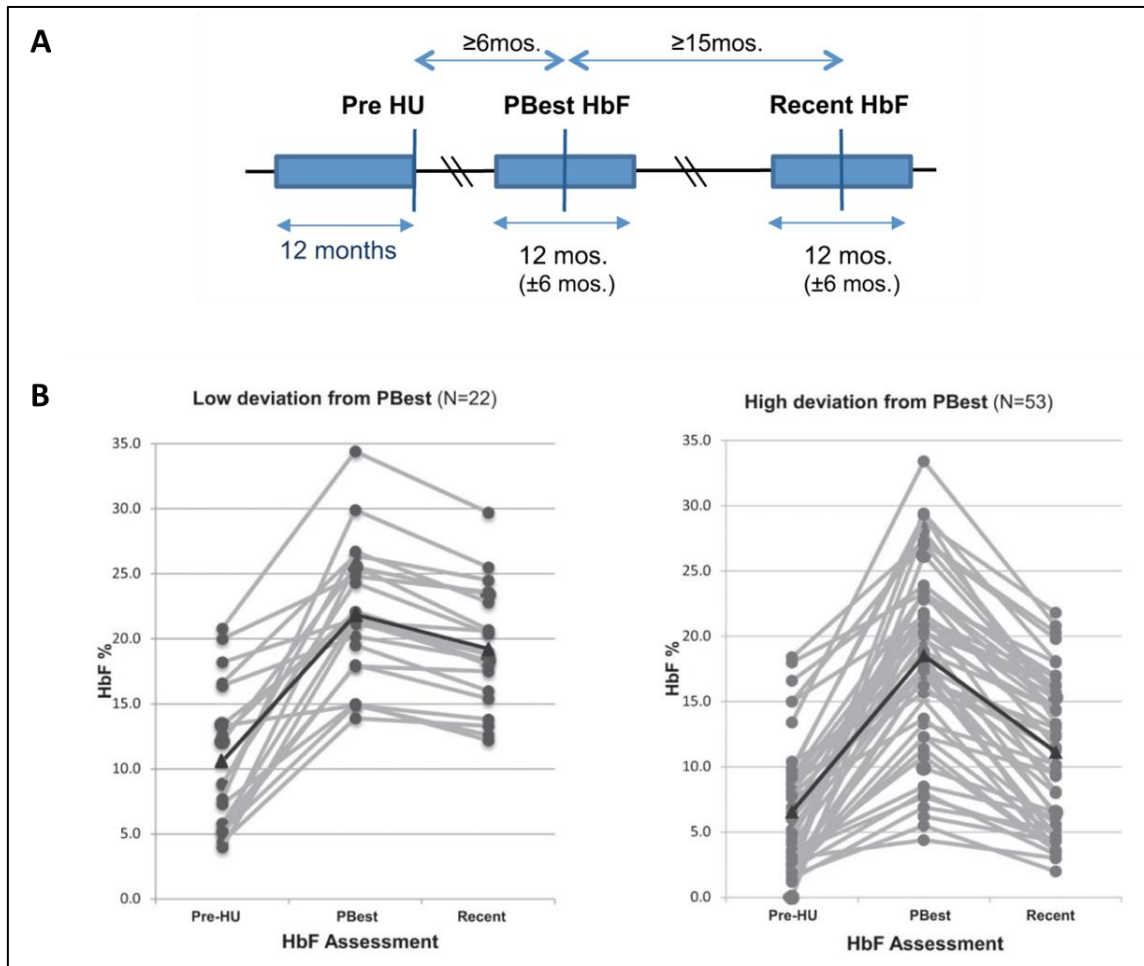


Figure 83. Schéma de collecte des données cliniques (A) et les niveaux d'HbF à trois points de temps d'écart par rapport au PBest (Personal best, faible ou élevé) (B). La ligne noire indique la valeur moyenne à chaque point de temps (Green et al., 2016).

Bien qu'elle soit souvent préventive et non curative et axée sur les symptômes, l'induction pharmacologique de la production d'HbF reste une option intéressante pour diminuer la sévérité de la maladie. La **figure 83** résume tous les agents pharmacologiques inducteurs de l'HbF dans la drépanocytose, des agents actuels qui sont déjà établis et validés pré-cliniquement et cliniquement à différents stades des essais cliniques pour leur capacité à augmenter l'expression des chaînes γ -globine et d'autres agents novateurs en cours de développement (Bou-Fakhredin et al., 2022)

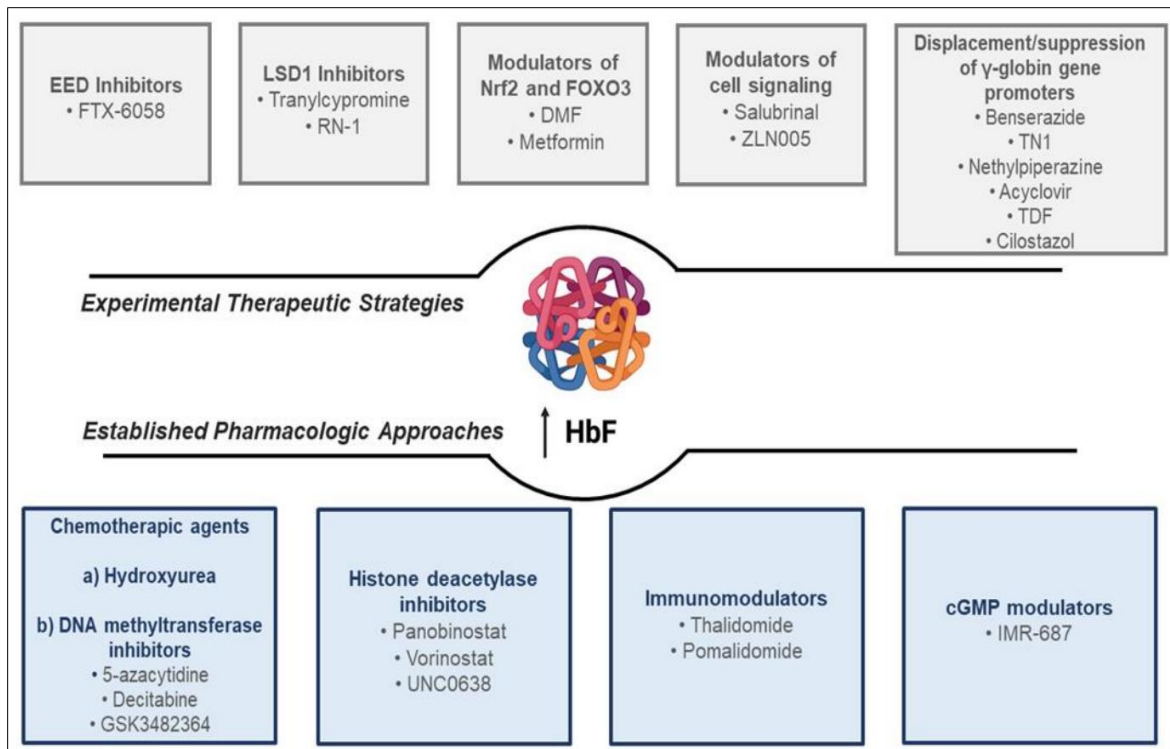


Figure 84. Résumé de toutes les approches pharmacologiques établies et des stratégies thérapeutiques expérimentales pour l'induction de l'HbF dans la drépanocytose (Bou-Fakhredin et al., 2022).

23. Autres stratégies thérapeutiques impliquées dans l'induction de l'hémoglobine foetale

Thérapie génique. Grâce aux progrès du séquençage génomique et à la découverte d'outils moléculaires qui ont permis respectivement de comprendre les mécanismes de régulation de l'Hb et de modifier le génome des cellules souches hématopoïétiques, la thérapie génique de la drépanocytose tant recherchée est rendue possible (Abraham and Tisdale, 2021). Plusieurs approches de la thérapie génique sont actuellement appliquées à la drépanocytose : i) l'addition de gènes où les gènes comme HBB, HBG ou la cassette β -globine anti-polymérisant (qui peut coder pour des variants comme la β^{A-T87Q} ou la β^{AS3}) sont transférés à l'aide d'un système de vecteurs (rétrovirus ou lentivirus) puis insérés dans le génome, ii) l'édition de gènes qui permet d'apporter des modifications génomiques permanentes par suppression ou remplacement de séquences d'ADN en utilisant des systèmes comme meganucleases, ZFNs (*zinc finger nucleases*), TALENS (*transcription activator-like effector nucleases*) ou CRISPR-Cas9 (*clustered regular interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated nuclease 9*) et iii) l'induction de l'HbF (Figure 84) (Hoban et al., 2016; Abraham and Tisdale, 2021; White et al., 2023). La réactivation de la synthèse de l'HbF par thérapie génique peut se faire par 1) l'addition de gène de γ -globine, 2) inversement de la répression de l'expression de la chaîne γ -globine par BCL11A ou répression de BCL11A (inhibiteur des gènes HBG) qui peut être obtenue par

l'addition de gènes codant pour les petits ARN ou ARN interférents en épingle à cheveux (shRNAs pour short hairpin RNA) sous le contrôle des promoteurs spécifiques des érythroïdes qui entraînent une expression érythroïde-spécifique de ces shARN ciblant BCL11A, 3) modifications génétiques au niveau de l'amplificateur (*enhancer*) et les cibles de BCL11A capable de perturber ses effets (Abraham and Tisdale, 2021), 4) expression du domaine d'auto-association de Ldb1, qui est un facteur de transcription impliqué dans le bouclage chromatinien du LCR, lié à des doigts de zinc artificiels . Le bouclage forcé de la chromatine favorisant l'association du LCR avec les gènes de la γ -globine ainsi que la reconnaissance du promoteur de la γ -globine par le complexe Ldb1-doigts de zincs artificiels entraîneront l'augmentation robuste de la synthèse de l'HbF (Hoban et al., 2016). Avant l'application clinique de ces différentes stratégies de thérapie génique, un certain nombre d'obstacles incluant la récupération d'un nombre suffisant de cellules souches pour la modification des gènes, l'augmentation de l'expression des gènes transférés à un niveau thérapeutique et le conditionnement convenable des patients assurant une greffe adéquate des cellules modifiées a dû être surmontés. Pour réussir les thérapies géniques actuellement testées dans le cadre des essais cliniques, de nombreuses obligations doivent être remplies. Parmi celles-ci, une infrastructure et une expertise importantes pour savoir prélever les cellules, administrer la chimiothérapie à des patients qui présentent souvent un dysfonctionnement de leurs organes et modifier des gènes qui s'effectue ex vivo dans des installations spécialisées (Abraham and Tisdale, 2021).

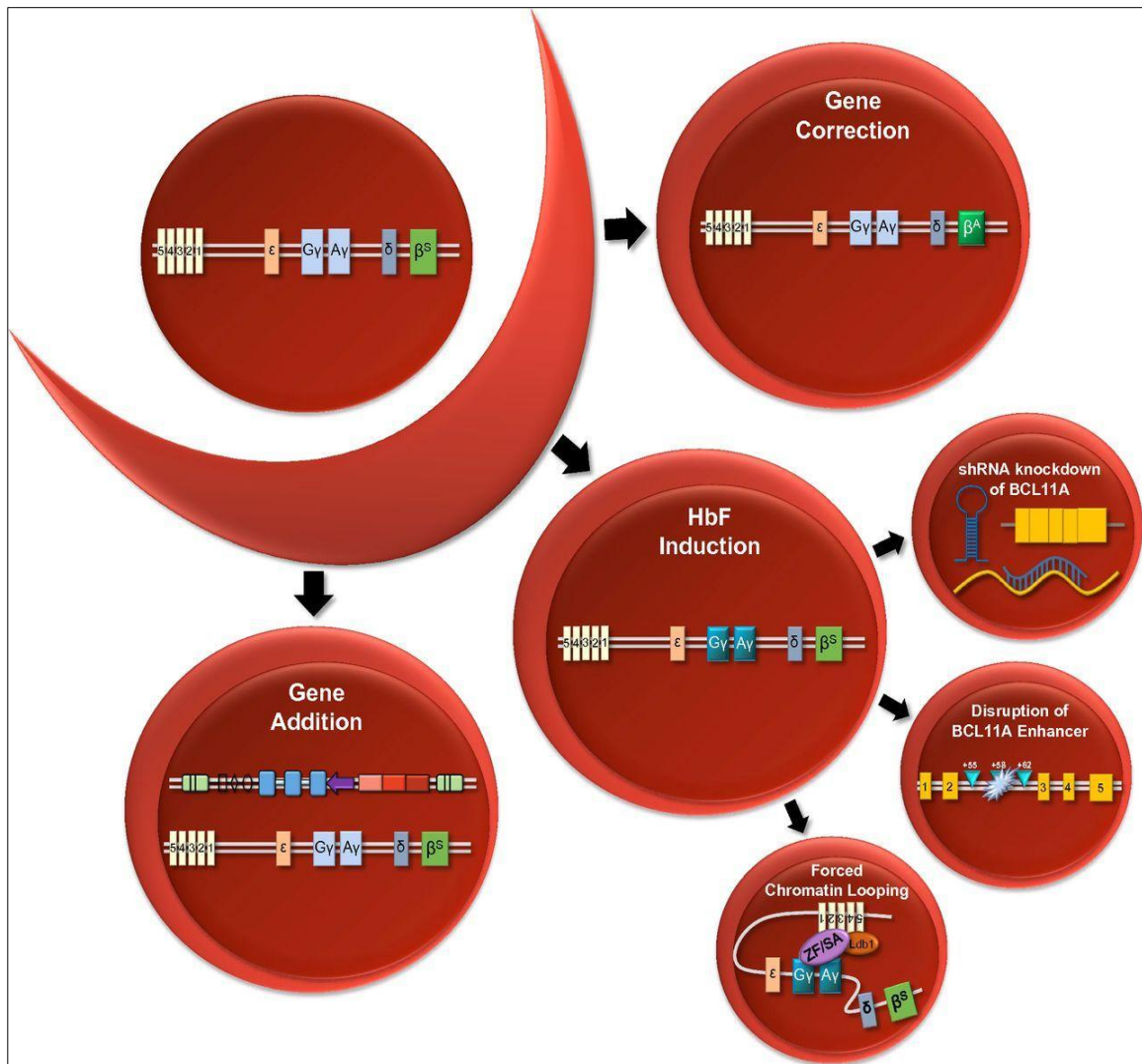


Figure 85. Stratégies de thérapie génique pour la drépanocytose : aperçu schématique des différentes approches pour corriger le phénotype drépanocytaire par thérapie génique (Hoban et al., 2016).

Correction des gènes : l'ingénierie ciblée des génomes conduit à la correction de la mutation drépanocytaire de telle sorte que la β^S est réparée en β^A . Induction de l'HbF : les multiples stratégies d'induction de l'expression de la γ -globine comprennent le knockdown de BCL11A médié par shRNA, la perturbation ciblée du site HS+58 de l'ADNase I dans l'amplificateur spécifique des érythroïdes de BCL11A et le bouclage forcé de la chromatine pour favoriser l'association du LCR de la β -globine avec les gènes de la γ -globine. Ajout de gènes : vecteur lentiviral intégrateur portant une cassette de β -globine antipolymérisante. Ldb1, facteur de transcription ; ZF/SA, domaine d'auto-association du doigt de zinc.

Problématique et objectifs

Problématique et objectifs

En drépanocytose, la formation de polymères intracellulaires d'HbS aboutit entre autres à la destruction prématurée des GR et par conséquent la réduction de leur durée de vie dans la circulation sanguine. La survie des GR drépanocytaires est influencée par la quantité d'HbF. Ainsi, chez un patient donné les cellules F ayant une teneur élevée en HbF survivent plus longtemps que les cellules non-F, à faible teneur en HbF. Chez les patients drépanocytaires, la distribution de l'HbF est souvent hétérogène au sein de la population de GR et sa quantité est variable d'un GR à un autre.

Quantifier l'effet positif de l'HbF sur la durée de vie des GR drépanocytaires, nécessite l'utilisation de techniques d'analyse à l'échelle d'une cellule unique. Actuellement, la seule méthode disponible capable de suivre *in vivo* la durée de vie de GR individualisés est celle de la biotine qui permet une détection des GR par la cytométrie en flux. Néanmoins, bien qu'elle soit une méthode de référence possédant de nombreux avantages, le marquage à la biotine est considéré comme une technique lourde, chronophage, exigeant un suivi de plusieurs semaines voire plusieurs mois avec le besoin de manipuler en *ex-vivo* les cellules à marquer avant leur réinjection chez l'individu.

La découverte de *Bunn et al.* que l'Hb se glyque tout au cours de la durée de vie des GR a conduit à l'utilisation de l'HbA1c comme indice ou marqueur d'âge cellulaire. Les objectifs de ce présent travail sont :

- Le développement d'une nouvelle méthode non invasive d'évaluation de l'âge relatif des GR drépanocytaires à l'échelle individuelle basée sur la mesure de l'Hb glyquée dans chaque GR en utilisant la cytométrie en flux.
- La validation de cette méthode par la quantification de l'effet bénéfique de l'HbF sur l'allongement de la durée de vie relative des GR de patients drépanocytaires.

Matériel et méthodes

24. Groupes de participants à la recherche : critères d'inclusion et d'exclusion

25 Prélèvements sanguins

26. Courbe de densité sur gradient de phtalates

27. Fractionnement des globules rouges en fonction de la densité sur Percoll

28. Paramètres érythrocytaires

29. Mesure des activités enzymatiques

30. Mesure du contenu en hémoglobine A1c et hémoglobine F

31. Mesure de la déformabilité des globules rouges en ektacytométrie à gradient osmolaire

32. Analyse statistique

Chapitre V. Matériel et Méthodes

24. Groupes de participants à la recherche : critères d'inclusion et d'exclusion

L'étude a été menée conformément à la Déclaration d'Helsinki et approuvée par le Comité de Protection des Personnes local (CPP-Île-de-France IV Saint-Louis Hospital, IRB 00003835). Tous les participants ont donné un consentement éclairé écrit après avoir été informés et leurs données ont été rendues anonymes pour protéger la vie privée et la confidentialité des patients. Deux groupes de participants adultes (âge ≥ 18 ans) ont été recrutés : un groupe de donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang (EFS) dont les échantillons de sang ont été utilisés pour le développement de la méthode et un groupe de patients atteints de la drépanocytose homozygote (HbSS) ou hétérozygote composite (HbS-bêta0) sélectionnés depuis la cohorte « ERYTHROPEIDIE » qui est suivie dans l'Unité des Maladies Génétiques du Globule Rouge (UMGGR) – Centre de Référence Adulte de la Drépanocytose à l'Hôpital Henri Mondor (Créteil, France). Les échantillons de ces derniers ont été utilisés pour tester et confirmer la robustesse et la fiabilité de la méthode.

Critères d'exclusion. Les patients diabétiques ou prédiabétiques ainsi que les patients qui sont dans un programme transfusionnel ou qui ont reçu une transfusion sanguine au cours des 3 mois qui précèdent le prélèvement sont exclus.

25. Prélèvements sanguins

Les échantillons de sang des donneurs et des patients ont été prélevés par ponction veineuse dans des tubes contenant de l'héparine comme anticoagulant et ont été traités dans les 24 heures suivant le prélèvement de sang. Ces échantillons se sont servis pour un panel de tests et d'analyses : courbes de densité sur gradient de phtalates, fractionnement des GR en fonction de leur densité, mesure des paramètres érythrocytaires, mesures des activités enzymatiques, mesure de la déformabilité en ektacytométrie, le dosage de l'HbA1c et de l'HbF en HPLC et en cytométrie en flux. Des échantillons de globules rouges de patients congelés en glycérol et stockés à -80°C ont également été utilisés pour la Mesure du contenu en hémoglobine A1c et en hémoglobine F après leur décongélation par gradient de NaCl afin de retirer le glycérol (Hebert et al., 2020).

26. Courbes de densité sur gradient de phtalates

La distribution de la densité des GR a été étudiée par la technique des gradients de phtalates précédemment décrite par Bartolucci et ses collaborateurs (Bartolucci et al., 2012).

i) Préparation des gradients de phtalates. Le phtalate de dibutyle et le phtalate de de diméthyle ont été mélangés pour préparer une batterie de 12 esters de phtalates avec les densités suivantes : 1,080 ; 1,083 ; 1,088 ; 1,090 ; 1,093 ; 1,098 ; 1,101 ; 1,103 ; 1,107 ; 1,110 ; 1,115 g/mL à 20°C.

ii) Préparations des globules rouges. Les GR ont été isolés par centrifugation de 2 mL de sang total à 800G pendant 10 min à température ambiante. Séparés du plasma qui a été récupéré et conservé à -80°C, les GR ont été lavés deux fois et remis en suspension dans du tampon au phosphate (DPBS 1X Gibco) à 50% d'hématocrite final.

iii) Réalisation de la courbe de densité. Pour chaque densité, les tubes de microhématocrite ont été d'abord chargés avec quelques microlitres d'esters de phtalates de densité connue, puis complétés avec la suspension de GR préparée (Figure 86). L'extrémité des tubes microcapillaires a été ensuite scellée avec de l'argile avant de centrifuger l'ensemble des tubes dans une centrifugeuse à microhématocrite à 6440 G pendant 10 min.

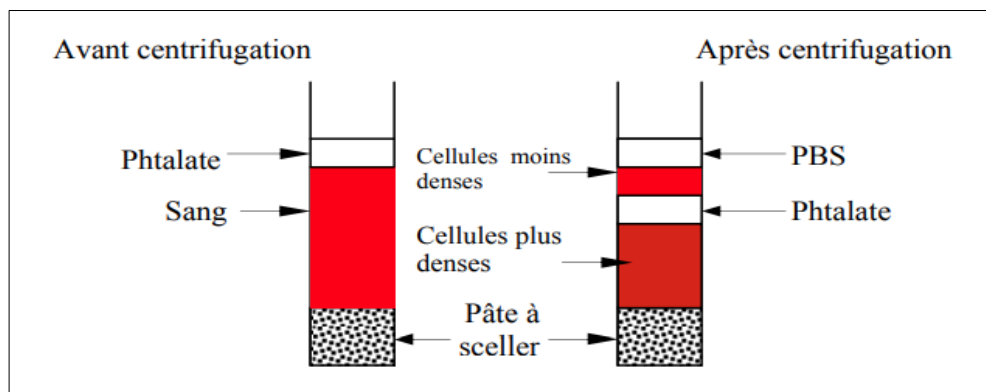


Figure 86. Détermination de la densité des globules rouges en phtalates (Kueviakoe et al., 2009).

Après centrifugation, les longueurs de deux fractions de GR placées au-dessus (a) et au-dessous (b) des esters de phtalates ont été mesurées à l'aide de papier millimétré et exprimées en pourcentage de la longueur totale de la colonne de GR. La proportion des GR au-dessous des phtalates a été déterminée en calculant le rapport $[a/(a+b)]$. Le pourcentage des GR au-dessus des phtalates a été déduit. Les résultats ont permis de tracer en fonction des densités des phtalates la courbe de distribution de la densité des GR pour chaque participant.

27. Fractionnement des globules rouges en fonction de la densité

Le fractionnement des GR selon leur densité a été réalisé sur un gradient discontinu de Percoll comme décrit par Di Liberto et ses collaborateurs (Di Liberto et al., 2016)

i) Préparation du gradient de Percoll. Brièvement, deux solutions de Percoll 1 et 2 de densité 1,022 et 1,142 g/mL respectivement ont été préparées. Le gradient a été construit, du bas vers le haut d'un tube de 15 mL, en 5 couches de 2 mL contenant 35% (1,100 g/mL), 37,5% (1,097 g/mL), 40% (1,094 g/mL), 44,2% (1,089 g/mL) et 48,3% (1,084 g/mL) de solution Percoll 1, respectivement.

ii) Préparation des globules rouges à fractionner. Avant le fractionnement, les GR ont été séparés des autres éléments du sang par filtration à travers une colonne de cellulose comme décrit par Beutler et ses collaborateurs (Beutler et al., 1977), avec quelques modifications. En résumé, un mélange de poids égaux d'alpha-cellulose et de sigma-cellulose a été préparé avec du PBS. Une seringue de 5 mL sans piston a été fixée en position verticale avec la sortie (ouverture) pointant vers le bas. Un petit morceau de fibre de verre a été placé au fond de la seringue avant de verser la bouillie de cellulose bien mélangée en PBS. La colonne de filtration est lavée avec du PBS avant que 1 à 2 mL du sang total soit versé à travers. Le filtrat a été récupéré et le culot de GR dépourvu de globules blancs et de plaquettes a été lavé trois fois à 800G pendant 10 min à 20°C puis remis en suspension à 50% d'hématocrite.

iii) Fractionnement. Les GR en suspension dans du PBS ont été soigneusement déposés sur le gradient de Percoll puis centrifugés à 800 G pendant 20 min à 4°C sans décélération. Après centrifugation, quatre fractions de GR (F1, F2, F3, F4) ont été obtenues, lavées trois fois avec du PBS à 769 G pendant 10 min à 4°C, remises en suspension (50-60% d'hématocrite), et gardées à 4°C avant les analyses.

iv) Globules rouges non fractionnés. Pour les GR non fractionnés, le même protocole de fractionnement a été appliqué en utilisant une seule couche de solution de Percoll à 1,084 g/mL permettant la séparation des GR des autres éléments du sang.

v) Globules rouges denses et non denses de patients atteints de drépanocytose. Les GR de patients SS non traités par HU, purifiés et en suspension dans du PBS ont été soigneusement déposés sur une solution de Percoll à 1,110 g/mL puis centrifugés à 800 G pendant 20 min à 4°C sans décélération, pour séparer les globules rouges denses (densité > 1,110 g/mL) des globules rouges non denses. Après centrifugation, deux fractions de GR (denses et non denses) ont été obtenues, lavées trois fois avec du PBS à 800G pendant 10 min à 4°C, remises en suspension (50-60% d'hématocrite), et congelés avec du glycérol puis stockés à -80°C.

28. Paramètres érythrocytaires

Les paramètres ou indices érythrocytaires notamment le Volume Globulaire Moyen (VGM, *MCV en anglais*), la Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (TCMH, *MCH en anglais*)

et la Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine (CCMH, *MCHC en anglais*) ont été déterminés à l'aide de l'automate d'hématologie ABX Micros ES 60 (HORIBA Medical).

29. Mesure des activités enzymatiques

Les GR de chaque fraction ainsi que les GR non fractionnés ont été hémolysés et les activités enzymatiques de trois enzymes, hexokinase (HK), glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et pyruvate kinase (PK) ont été déterminées selon Beutler (1975) et exprimées en unités par gramme d'hémoglobine (UI/g Hb).

i) Préparation des hémolysats. L'hémolyse des suspensions de GR a été induite en mélangeant sur la glace 50 μ L de culot de GR avec une solution stabilisante constituée de l'EDTA 0,27 M et de la solution de β -mercapto-éthanol pur 1,42 μ M (Sigma) diluée dix fois. L'hémolysat obtenu a été ensuite dilué quinze fois et utilisé pour mesurer les activités enzymatiques avec le système KONE20XT.

ii) Activité enzymatique de l'hexokinase. Les hémolysats de GR ont été incubés avec un mélange de réactifs contenant du tampon TRIS 0,25M pH 8 ; $MgCl_2$ 0,1M ; glucose 0,5 M ; NADP 0,01M et H_2O et avec une dilution de trente fois dans le tampon de G6PD (1 mg/mL) pendant 10 min à 37°C. A ce mélange réactionnel, de l'ATP 0,1M a été ajouté. Les taux de production de NADPH ont été suivis par spectrophotométrie pendant 10 min à 334°C. Les valeurs habituelles chez l'adulte : 0,74 - 1,14 UI/g Hb.

iii) Activité enzymatique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Les hémolysats de GR ont été traités avec un mélange réactionnel (tampon TRIS 0,2M pH 8,6 ; $MgCl_2$ 0,1M ; NADP 1,7 mg/mL, H_2O). La densité optique a été surveillée pendant 5 min avant d'ajouter le glucose-6-phosphate 0,15M comme substrat enzymatique. Le mélange a été incubé 5 min à 25°C. Les taux de production de NADPH ont été suivis par spectrométrie pendant 5 min à 334°C. Les valeurs habituelles chez l'adulte : 5,3 - 7,9 UI/g Hb.

iv) Activité enzymatique de la pyruvate kinase. Les hémolysats de GR ont été traités avec une solution tampon ajustée à pH 7,5 (triétaniamine 0,16M ; KCl 0,12M ; $MgSO_4$ 0,021M ; EDTA 1,3 mM, H_2O), avec NADH (10 mg/mL), avec PEP 0,1M et avec ont LDH (10 mg/2 mL). Après incubation pendant 5 min à 25°C, de l'ADP 0,1M a été ajouté et les taux de production de NADH ont été contrôlés par spectrophotométrie pendant 5 min à 334 nm. Les valeurs habituelles chez l'adulte : 5,9 - 8,1 IU/g Hb.

30. Mesure du contenu en hémoglobine A1c et en hémoglobine F.

Les taux d'HbA1c et d'HbF ont été mesurés soit dans les hémolysats de globules rouges (méthode 1) soit par une analyse cellule-par cellule qui permet d'estimer le contenu en HbA1c et en HbF dans chaque globule (méthode 2).

i) Méthode N°1 - dosage de l'HbA1c et de l'HbF dans les hémolysats par la Chromatographie liquide haute pression échangeuse de cation.

Le système HPLC automatisé (VARIANT™ II, BIO-RAD, double programme HbA2/HbA1c) a été utilisé pour quantifier le taux d'HbF dans les hémolysats des GR de tous les participants (donneurs sains et patients) et le pourcentage d'HbA1c dans seulement les hémolysats des GR qui proviennent des sujets normaux (Hb AA). Les conditions expérimentales étaient celles recommandées par le fabricant.

ii) Méthode 2 - mesure par cytométrie en flux dans les globules rouges individuels des niveaux d'hémoglobine A1c et d'hémoglobine F. La détection de l'HbA1c et quantification de l'HbF dans les GR individuels par cytométrie en flux a été réalisée conformément à la méthode d'immunofluorescence développée au sein de notre équipe et rapportée par Hebert *et al.* (2020), dont les étapes sont développées ci-dessous :

Fixation et perméabilisation. La fixation et la perméabilisation des GR ont été réalisées avec les réactifs du kit Fetal Cell Count™ (fluorescence brillante IQ Products) en suivant les instructions du fabricant.

Immunofluorescence. Les globules rouges fixés et perméabilisés ont été incubés pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité avec soit un anticorps monoclonal de souris anti-HbA1c humain (Biorbyt, Explore Bioreagents, HbA1c anticorps orb 195572 non conjugué, Uniprot ID : P69905) conjugué avec Alexa Fluor 647 (AF 647, Alexa Fluor™ 647 Protein Labeling Kit, Thermo Fisher Scientific), soit un anticorps anti-HbF conjugué à la phycoérythrine (PE) (réactif F, Fetal Cell Count™ kit, produits IQ), soit un anticorps anti-HbS conjugué au Pacific Blue (PB, Pacific Blue Protein Labeling Kit, Thermo Fisher Scientific) ou un mélange de ces anticorps incubés ensembles (HbA1c + HbS ou HbA1c + HbF).

L'ajout d'un anticorps de souris anti-CD71 humain conjugué au Brilliant Violet 421 (BV 421, BD Horizon, clone M-A712, cat.562995) a permis la mesure des réticulocytes immatures CD71 positifs. Comme contrôle isotypique les anticorps IgG1 kappa de souris conjugué avec Alexa Fluor 647 (BD Phosflow, cat.557783), IgG1 kappa de souris couplé à la PE (BD Pharmingen, cat 555749), IgG1 kappa de souris couplé au PB (BD Pharmingen, cat 558120) et IgG2 kappa de souris conjugué avec BV 421 (BD Horizon, clone 40, cat.562438) ont été utilisés comme contrôle négatif. Les GR fixés et perméabilisés seuls ont également été utilisés comme contrôle non

marqué. Après incubation, les GR ont été lavés dans du PBS à 300 G pendant 3 min à température ambiante et analysés par cytométrie en flux à l'aide d'un système BD FACS Canto II (BD Biosciences).

L'homogénéité de distribution de la chaîne alpha de l'hémoglobine au sein de la population de GR a été évaluée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti Human alpha hemoglobin subunit conjugué à l'Alexa Fluor 647 (AF647) (Santa Cruz).

Acquisition par cytométrie en flux. Les intensités de fluorescence d'Alexa Fluor 647, de PE, et de BV 421 ont été suivies à l'aide des PMT fixés à des voltages de 400, 410 et de 300 V respectivement. Pour quantifier l'HbF et pouvoir comparer les résultats obtenus des différentes fractions de GR, des billes de calibration (Becton-Dickinson, QuantiBRITE PE, BD Biosciences) ont été utilisées. Les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse cellulaire FlowJo v.10. (FlowJo, Miltenyi Biotec). L'intensité de fluorescence de chaque GR a été enregistrée sur une échelle logarithmique et une moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (MFI) a été calculée.

31. Mesure de la déformabilité des globules rouge en ektacytométrie à gradient osmolaire

La déformabilité des GR, exprimée en indice d'élongation (EI), a été déterminée à 37 °C par l'ektacytométrie à gradient osmotique (Lorrca® MaxSis ; RR Mechatronics, Hoorn, Pays-Bas). Cette machine possède un analyseur de cellules doté d'un système optique rotatif assisté par un laser. Un schéma général des différentes parties d'un ektacytomètre est montré dans la figure 2A. Un volume de 125 μ L de chaque fraction de GR (à 50% d'hématocrite) a été remis en suspension et bien mélangé par retournement dans un milieu visqueux (polyvinylpyrrolidone, PVP). L'IE des différentes fractions de GR remises dans le PVP est mesuré sous une contrainte de cisaillement (*shear stress*) constante et définie (30Pa) et à une osmolarité croissante (50 à 500m Osm/kg). L'IE mesuré quantifie l'étirement ou l'ellipticité des GR en fonction de l'osmolarité en traduisant le signal lumineux résultant de la diffraction de la lumière induite par le passage des GR devant le laser et enregistrée par une caméra. Son calcul se fait sur la base de la largeur et de la hauteur théoriques de l'ellipse représentées sur la figure de diffraction (**Figure 2A**). L'ektacytométrie à gradient d'osmolarité permet également de déterminer plusieurs autres paramètres (figure 2B) : Omin (c'est-à-dire l'osmolalité à laquelle la valeur de déformabilité des GR atteint un minimum dans la région hypotonique de la courbe), Elmax (c'est-à-dire la déformabilité la plus élevée des GR) et Ohyper (également appelé O'), qui correspond à l'osmolalité à la moitié de l'Elmax dans la région hypertonique de la courbe. Omin reflète la fragilité osmotique et le rapport surface/volume (S/V), Elmax dépend de la déformabilité de la membrane et de la surface des

GR (plus l'IEmax est élevé, plus les GR sont déformables), et Ohyper reflète la viscosité cellulaire déterminée par la concentration de l'Hb (MCHC) et le volume cellulaire.

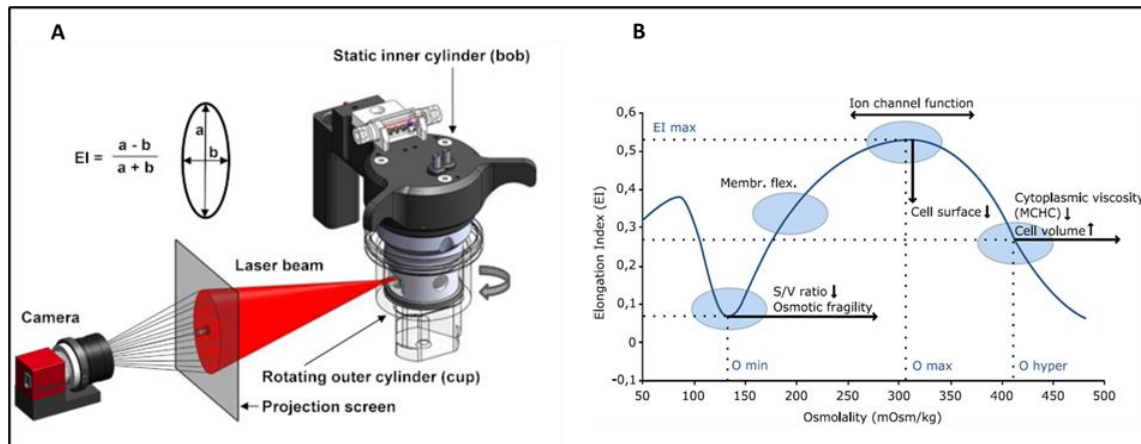


Figure 87. Ektacytomètre de type LoRRca (Lorcca® MaxSis, Pays-Bas).

(A) Schéma de la configuration générale d'un ektacytomètre et de la relation entre le diagramme de diffraction et l'indice d'élongation (EI) (Parrow et al., 2018). Une coupelle extérieure tourne autour d'un bob stationnaire pour générer un shear stress appliqué sur les GR remis en suspension dans la solution de PVP placée entre eux. Un motif de diffraction est généré par un laser qui traverse la solution. Le diagramme de diffraction est affiché sur un écran de projection. Le modèle de diffraction obtenu en réponse au shear stress montre le motif elliptique. L'EI est calculé selon l'équation indiquée. (B) Indices de LoRRca représentés schématiquement sur la courbe d'osmoscan. <https://lorcca.com/wikilorcca/osmoscan-test/>

32. Analyses statistiques

Les différents tests statistiques ont été réalisés sur GraphPad version 6. Les analyses de linéarité ont été calculées par des tests de régressions linéaires de Pearson, les coefficients R^2 et les P value correspondants indiqués, et les intervalles de confiance à 95% affichés sur les figures le cas échéant. La comparaison de valeurs de fluorescence entre réticulocytes (cellules CD71 positives) et GR matures (cellules CD71 négatives), entre GR du malade et ceux issus de donneurs dans le cas des patients transfusés, et entre les sous-populations de GR de patients en fonction de leur teneur en HbF (Low ou High), a été calculée par des tests de Wilcoxon. La comparaison de valeur de fluorescence entre les donneurs sains et les patients d'une part, ou les patients non traités et ceux traités par HU d'autre part, a été réalisée par des tests de Mann-Whitney. La comparaison des différentes fractions de GR de donneurs sains entre-elles, ainsi que la comparaison des intensités de fluorescence de l'Hb glyquée en fonction de leur quantité d'HbF a été calculée par des tests de Friedman. La non-interférence de la fluorescence de l'HbF sur la fluorescence de l'Hb glyquée, et inversement, a été évaluée par Bland-Altman. La distribution Log-normale de l'alpha-globine dans les GR de patients a été confirmée par test de d'Agostino et Pearson - pour ce test, l'homogénéité de distribution a été

validée pour des P-value $> 0,05$. Tous les résultats ont été considérés comme significatifs pour des valeurs de P-value $< 0,05$.

Résultats

33. Validation de l'estimation de l'âge relatif des GR avec la mesure de l'HbA1c par cytométrie de flux chez les donneurs sains (AA).

33.1. Validation avec de l'HbA1c formée *in vitro*.

33.2. Validation avec de l'HbA1c formée *in vivo*.

33.2.1. Dans les réticulocytes (cellules CD71+) et les GR matures.

33.2.2. Dans des fractions de GR d'âge différent isolées par fractionnement en fonction de la densité.

34. Preuve de concept : validation de la robustesse de l'estimation de l'âge relatif des GR par la mesure de l'HbA1c en cytométrie de flux chez les patients SS transfusés.

35. Application de la méthode de mesure de l'âge relatif des GR par HbA1c en cytométrie de flux chez les patients SS non transfusés.

35.1. Comparaison de l'âge relatif entre les GR-SS et les GR-AA.

35.2. Comparaison de l'âge relatif entre les rétics-SS et les rétics-AA.

35.3. Effet du traitement à l'hydroxyurée sur l'âge relatif des GR-SS

35.4. Normalisation de la fluorescence de l'hémoglobine glyquée en présence d'HbF

35.5. Effet du taux d'HbF sur l'âge relatif des GR-SS

35.6. Effet de la teneur en HbF/GR sur l'âge relatif des GR-SS

35.7. Evaluation de l'âge relatif des GR-SS non denses et denses

Chapitre VI. Résultats

33. Validation de l'estimation de l'âge relatif des GR avec la mesure de l'HbA1c par cytométrie de flux chez les donneurs sains.

Pour évaluer la capacité et la robustesse de l'HbA1c mesurée par cytométrie en flux à refléter l'âge relatif des GR, nous avons commencé par déterminer, dans les GR de donneurs sains (AA), le contenu d'Hb glyquée formée *in vitro* et *in vivo*. Cette étape est effectuée à l'échelle de la cellule unique en cytométrie de flux en utilisant un anticorps dirigé contre les quatre premiers acides aminés de la séquence N-terminale de la chaîne bêta-globine de l'HbA1c dont la valine qui subit une glycation.

33.1. Validation avec de l'HbA1c formée *in vitro*.

Le résultat du suivi de la cinétique de glycation *in vitro*, obtenue par l'incubation des GR de donneurs sains (n=3) à 20 °C pendant 7 jours dans une solution de D-glucose à une concentration finale de 10 g/L, a montré une augmentation linéaire significative de l'intensité moyenne de fluorescence des GR marqués avec l'anticorps anti-HbA1c ($R^2=0,88$; $P < 0,001$) reflétant la quantité intracellulaire de l'Hb glyquée en fonction du temps d'exposition de l'Hb au glucose (**Figure 87A**). La linéarité de la glycation *in vitro* de l'Hb en fonction du temps confirme que ce processus est temps-dépendant et spontané puisqu'il n'est médié par aucune activité enzymatique. Ceci est en concordance avec les données rapportées dans la littérature et notamment avec les travaux de Bunn et ses collaborateurs (1976). L'intersection de la droite de régression avec l'axe des ordonnées représente le niveau de glycation de l'Hb *in vivo* juste avant le don de sang (prélèvement sanguin).

33.2. Validation avec de l'HbA1c formée *in vivo*.

33.2.1. Dans les réticulocytes (cellules CD71+) et les GR matures.

Après l'expérience *in vitro*, nous nous sommes intéressés à la mesure de la proportion d'HbA1c formée *in vivo* dans les GR matures et les réticulocytes (cellules CD71+). La **figure 87B** présente les résultats de comparaison du taux d'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux entre les réticulocytes sélectionnés par l'utilisation d'un anticorps anti-CD71+ et les GR matures de donneurs sains. Nos analyses ont montré que la proportion d'Hb glyquée est statistiquement au moins 8 fois plus élevée dans les GR matures (médiane= 4133 ; n=4) que dans les cellules CD-71+ (médiane= 471,8 ; n=4).

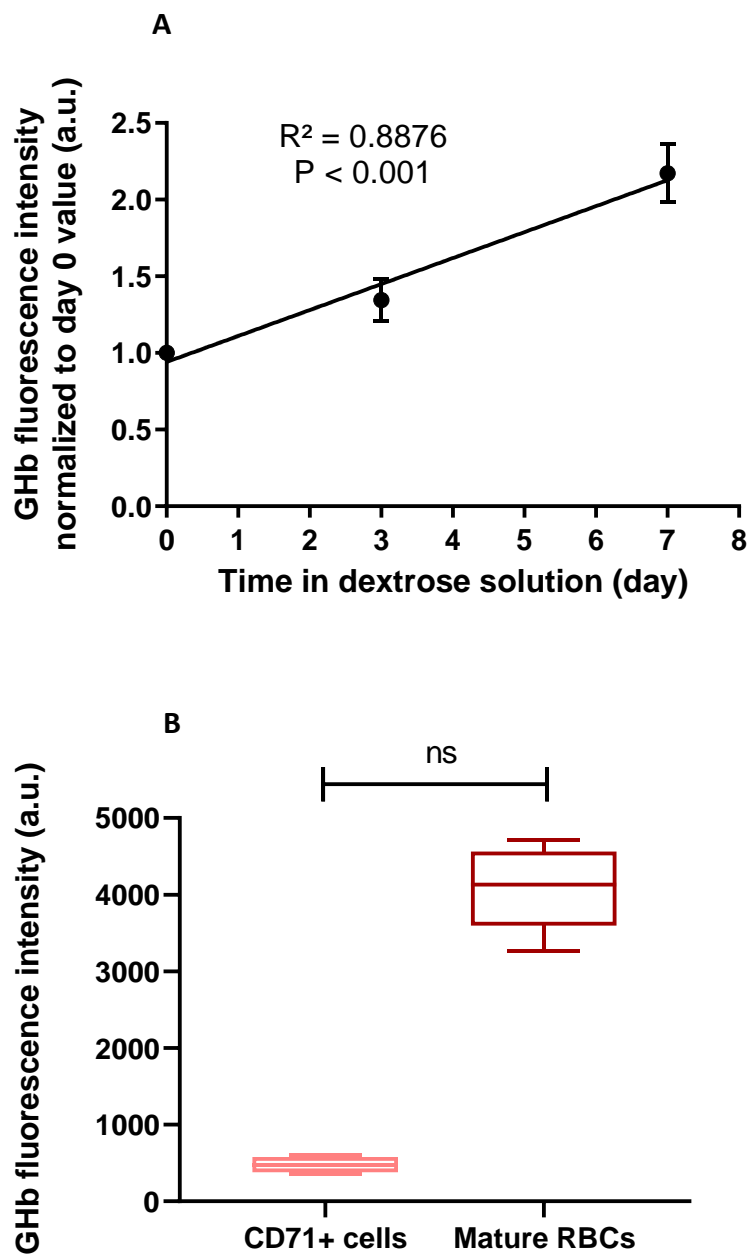


Figure 88. Mesure de l'Hb glyquée formée *in vitro* et *in vivo* par cytométrie en flux dans les GR de donneurs sains.

(A) Mesure dans les GR matures de l'HbA1c formée à partir de la glycation *in vitro* (n=3, simple régression linéaire). (B) Mesure dans les réticulocytes (CD71+) et les GR matures de l'HbA1c formée *in vivo* (n=4, Wilcoxon test avec P non significative).

33.2.2. Dans des fractions de GR d'âge différent isolées par fractionnement en fonction de la densité.

Une autre approche qui permet de vérifier l'évolution de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie de flux en fonction de l'âge des GR-AA était de mesurer la quantité d'HbA1c dans des sous-fractions de GR de densité croissante qui a été décrite associée à leur vieillissement.

Pour obtenir ces dernières, nous avons opté pour le fractionnement des GR en fonction de la densité. En revanche, préalablement au fractionnement, nous avons vérifié que les GR provenant des échantillons de sang des donneurs sains récupérés de la maison du don ne présentaient pas des anomalies de leur courbe de densité qui pourraient être liées à une anomalie membranaire par exemple, et non à un processus de vieillissement. La vérification de la densité des GR a été assurée par l'étude de la courbe de densité érythrocytaire sur gradient d'ester de phtalate comme décrit dans la section matériel et méthodes. La proportion de GR passant l'ester de phtalate (%) est tracée en fonction de la densité donnant ainsi lieu à une courbe de distribution de densité de forme sigmoïde. Un exemple de profil de densité retenu dans le cas de notre étude est présenté dans la [figure 88A](#). Nous avons seulement pris en compte les donneurs dont la courbe de densité est située entre les deux bornes (lignes tracées en orange, figure 2A) qui définissent la zone de normalité. Les courbes de densité érythrocytaire ont toujours été réalisées immédiatement après le prélèvement sanguin sur tube hépariné car, il s'est avéré que le délai d'attente de l'échantillon pouvait entraîner un décalage de la courbe de densité vers la gauche (vers les moindres densités érythrocytaires). (Moutereau *et al.*, congrès annuel de la SHF 2017),

Une fois la densité des GR validée, nous avons procédé au fractionnement des GR sur un gradient discontinu de Percoll préparé en empilant des couches de différentes densités : 1,084 ; 1,089 ; 1,094 ; 1,097 ; 1,100 g/mL. Ce fractionnement des GR matures produit quatre fractions : la fraction supérieure la plus légère contenant les GR jeunes (F1), deux fractions intermédiaires (F2, F 3) et la fraction inférieure la plus dense -GR âgés (F4). La [figure 88B](#) montre un exemple de séparation de GR-AA en fonction de la densité (âge) sur Percoll. Nous pouvons voir que les quatre fractions ont été séparées assez clairement.

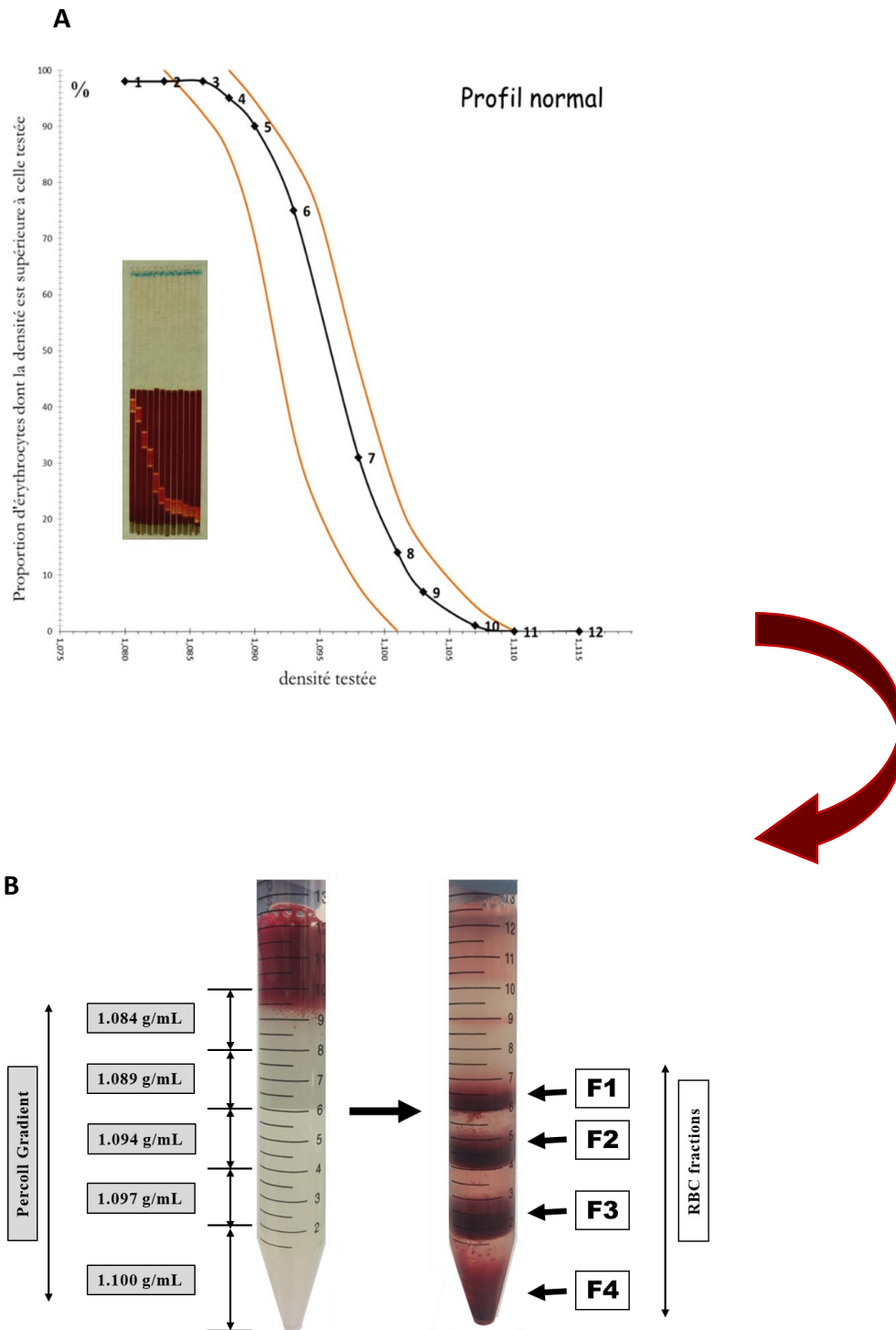


Figure 89. Étude de la distribution de densité des GR-AA et leur fractionnement en fonction de la densité (âge).

(A) Courbe de densité érythrocytaire sur gradient d'ester de phtalate. (B) Fractionnement des GR en quatre sous-populations d'âge moyen différent (F1, F2, F3, F4) en fonction de la densité sur un gradient discontinu de Percoll.

Pour vérifier la qualité du fractionnement et confirmer que la densité augmente dans les fractions obtenues, un certain nombre de caractéristiques liées à la fois à la densité et à l'âge des GR-AA ont été mesurées ou calculées. La **figure 89A** présente les résultats de la mesure des indices érythrocytaires dans les populations de GR fractionnées (F1, F2, F3, F4) et dans les GR non fractionnés (Unf). Les graphiques tracés montrent que la concentration corpusculaire moyenne de l'Hb (CCMH, valeurs obtenues en utilisant l'Horiba et exprimées en g/dL) augmente significativement en fonction de la densité des fractions ($p=0,02$), contrairement au volume globulaire moyen (VGM, mesuré par l'Horiba et exprimé en μm^3) qui lui diminue ($P=0,006$). Nos résultats concernant la teneur corpusculaire moyenne en Hb (TCMH) indiquent que cette dernière reste constante dans les différentes fractions de GR (résultat non montré). Ces données confirment ce qui a été rapporté dans la littérature au sujet de la déshydratation progressive qui caractérise les GR-AA au cours de leur vieillissement dans la circulation sanguine, ce qui entraîne leur réduction de volume (diminution de leur VGM) et l'augmentation de leur CCMH puisque la TCMH ne varie pas, donnant ainsi lieu à des GR âgés plus petits et plus denses.

La déformabilité des GR est un autre paramètre d'analyse des caractéristiques des GR après fractionnement sur gradient de densité. Elle a été mesurée par ektacytométrie à gradient d'osmolarité de type LoRRca (module osmoscan). La compilation des données d'osmoscan provenant des GR fractionnés et non fractionnés de deux donneurs sains est présentée dans la **figure 89B**. Les résultats ne montrent pas de différence de déformabilité maximale (Elmax) ou de fragilité osmolaire (Omin) entre les 4 fractions de GR. Toutefois, les courbes d'osmolarité manifestent, dans l'ordre croissant de densité des différentes fractions de GR, un shift vers la gauche du paramètre Ohyper reflétant ainsi un état de déshydratation progressif ce qui explique l'augmentation de la CCMH en fonction de la densité des GR.

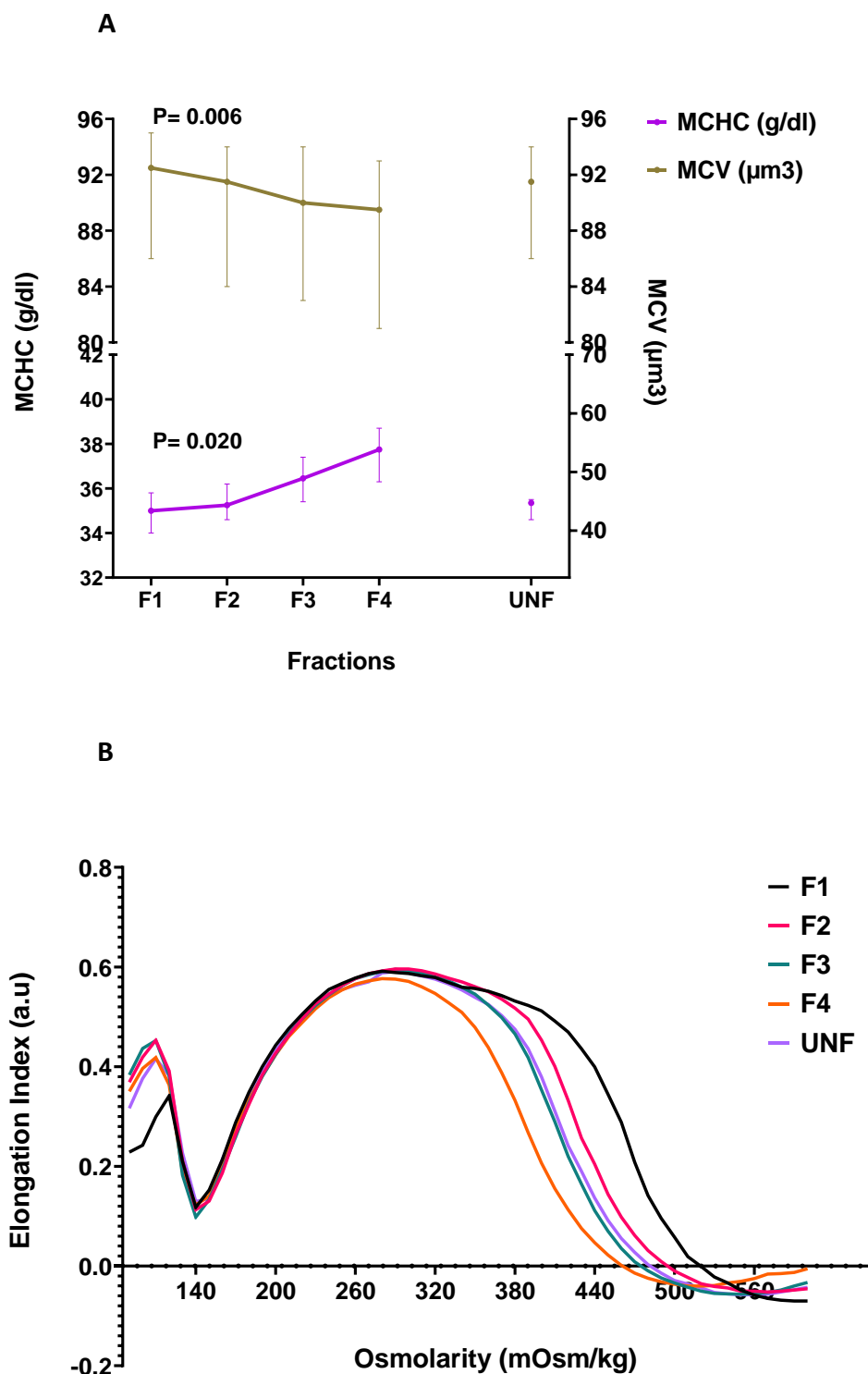


Figure 90. Vérification de la qualité du fractionnement des GR-AA sur gradient de densité.

(A) Indices érythrocytaire mesurés dans les GR fractionnés (F1 ; F2 ; F3 ; F4) et non fractionnés (Unf) : (CCMH ; n=4 ; P=0,02 ; Anova one-way test) et (VGM ; n=4 ; P=0,006 ; Anova one-way test). (B) Profils d'osmoscan des GR fractionnés (F1 ; F2 ; F3 ; F4) et non fractionnés (Unf). (n=2). Contrairement aux paramètres Elmax et Omin qui ne varient pas entre les fractions de densités différentes, l'Ohyper subit un shift vers la gauche en fonction de la densité des GR.

Après avoir confirmé que les 4 fractions de GR obtenues après fractionnement sur gradient de densité présentaient des signes de vieillissement d'après leur état d'hydratation, nous avons vérifié la relation entre la densité et les activités enzymatiques des sous-populations de GR. En effet, celles-ci sont également le reflet de leur âge physiologique. Dans le cas des GR, il a été montré que les activités maximales de la majorité des enzymes glycolytiques diminuent de façon exponentielle avec l'âge des cellules (Seaman et al., 1980). Nous avons donc mesuré, dans les GR-AA séparés en fonction de la densité, les activités de trois enzymes du métabolisme des GR : glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD), hexokinase (HK), pyruvate kinase (PK). Comme indiqué dans la **figure 90A**, les activités de trois enzymes, PK ($P=0,0009$), G6PD ($P<0,0001$), et HK ($P=0,0234$) diminuent de manière statistiquement significative en fonction de la densité des GR. Cette différence réside notamment entre la F1 (GR légers) avec les activités enzymatiques les plus élevées et la F4 (GR denses) caractérisée par les activités les plus faibles. Ces résultats montrent que dans le cas des GR de donneurs sains, l'augmentation de leur densité est associée à leur vieillissement.

Relation entre l'âge moyen des fractions de GR et l'HbA1c. La détermination de la proportion d'Hb glyquée dans les différentes fractions de GR d'âge moyen croissant a été d'abord mesurée par la méthode de référence, l'HPLC à échange d'ions. Les résultats sont exprimés en pourcentage et présentent la proportion de l'HbA1c dans l'hémolysât de chaque sous-population de GR AA. Comme le montre la **figure 90B**, le pourcentage de l'HbA1c mesuré dans les fractions de GR augmente de manière statistiquement significative en fonction de l'âge moyen des GR ($P<0,0001$, $n=5$). Les fractions de GR des mêmes donneurs sains utilisées pour mesurer l'HbA1c en HPLC ont été également utilisées pour la détermination de la quantité d'HbA1c dans chaque GR par cytométrie en flux. Les résultats après analyse des données brutes, présentés dans la **figure 90C** et exprimés en intensité de fluorescence moyenne (MFI), sont similaires à ceux obtenus avec la méthode de référence (HPLC) même si la différence statistique n'est pas significative. La quantité d'HbA1c mesurée dans chaque GR en cytométrie de flux augmente avec l'âge du GR correspondant. Cependant, la dispersion qui reflète la variabilité (technique ou/et biologique) est plus importante en cytométrie qu'en HPLC.

L'efficacité et la fiabilité de l'évaluation de l'âge relatif des GR à travers la mesure de la quantité d'Hb glyquée en cytométrie en flux a été validée par plusieurs approches : sur de l'Hb glyquée formée in vitro, de l'Hb glyquée formée in vivo et sur des GR séparés en fonction de leur densité qui reflète leur âge moyen. Les résultats de toutes ces expériences réalisées avec les GR de donneurs sains ont indiqué que l'Hb glyquée dont la quantité augmente au fur et à mesure que le GR vieillit constitue un indice ou marqueur d'âge cellulaire intéressant qui peut être utilisé pour estimer la durée de vie relative des GR de sujets non diabétiques. Chez ces derniers, comme la concentration de glucose dans le sang reste relativement constante, la glycation dépend essentiellement de la durée de vie des GR.

Dans la méthode de mesure de l'âge relatif des GR que nous développons, nous avons choisi de quantifier l'HbA1c par la cytométrie en flux. Cette technique présente plusieurs avantages. Parmi ceux-ci, nous citons i) sa capacité à mesurer l'intensité de fluorescence provenant de chaque GR qui reflète la quantité d'HbA1c par GR. ii) sa capacité à analyser des sous-populations de GR qui provient de sa capacité d'analyse cellule-par-cellule. iii) sa sensibilité élevée expliquée par sa capacité à analyser et à détecter de faibles taux d'Hb glyquée à partir d'un petit nombre de cellules. Ce dernier avantage est illustré dans le cas de la mesure d'HbA1c dans des réticulocytes - cellules CD71+ (voir figure 1B).

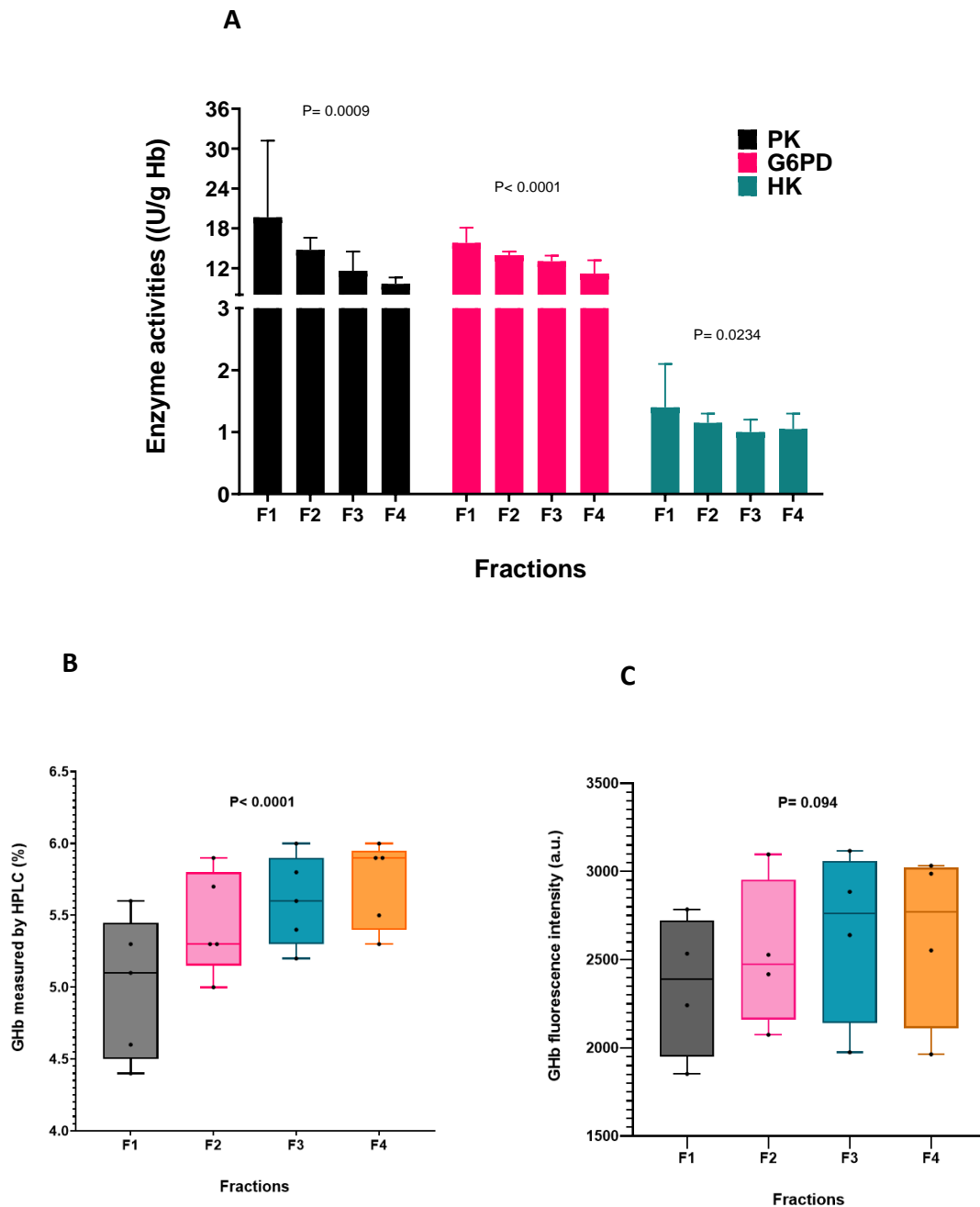


Figure 91. Vérification des relations densité-âge et âge-HbA1c dans les différentes fractions de GR-AA.

(A) Mesure des activités enzymatiques de 3 enzymes du métabolisme du GR : PK ($P=0,0009$), G6PD ($P< 0,0001$), et HK ($P= 0,0234$) dans les différentes fractions ($n=4$, test de Friedman). (B) Mesure du pourcentage d'HbA1c par HPLC dans les différentes fractions ($n=5$, $p< 0,0001$; test de Friedman). L'HbA1c est exprimée en pourcentage de l'Hb totale (C) Intensité de fluorescence moyenne de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux après fixation, perméabilisation et marquage intracellulaire avec un anti-HbA1c, dans les différentes fractions de GR ($n=5$, test de Friedman).

34. Preuve de concept : validation de la robustesse de l'estimation de l'âge relatif des GR par la mesure de l'hémoglobine glyquée en cytométrie de flux chez les patients SS transfusés

Comme preuve de concept et pour tester la robustesse de notre méthode de mesure de l'âge relatif des GR, nous l'avons appliquée chez des patients SS transfusés non diabétiques. Contrairement aux donneurs sains qui contiennent dans leur sang seulement une seule population de GR circulants (GR-AA), les patients SS transfusés ont deux populations de GR circulants : des GR autologues du patient (GR-SS) et des GR transfusés (GR-AA). Pour évaluer la proportion de l'Hb glyquée dans chaque population de GR, nous avons utilisé un anticorps de souris anti- β^s de l'Hb humaine qui permet de discriminer entre les GR-SS (GR HbS-positifs) et les GR-AA (GR HbS-négatifs). Les figures **Figure 91A** et **Figure 91B** illustrent les deux populations de GR en question chez un patient SS transfusé.

Les résultats obtenus sur un total de 5 patients SS transfusés non diabétique ont montré une différence dans la quantité d'Hb glyquée entre la population de GR-AA et la population de GR-SS, valable pour tous les patients (**Figure 91C**). L'analyse statistique n'a pas indiqué une différence significative mais une tendance ($P=0,062$), probablement du fait d'un faible effectif (n) (**Figure 91D**). La comparaison de la quantité d'hémoglobine glyquée dans les deux populations de GR a montré qu'elle était d'environ 4 fois plus faible dans les GR HbS-pos (GR-SS autologues, médiane de la MFI = 1533) que dans les GR HbS-neg (GR-AA transfusés, médiane de la MFI = 6101) (**Figure 91D**). Ces données qui sont en concordance avec ce qui a été rapporté dans la littérature concernant la durée de vie réduite des GR de patients SS par rapport à celle des GR-AA valide davantage l'utilisation de l'Hb glyquée comme marqueur d'âge relatif des GR notamment dans un contexte pathologique. Les résultats de cette expérience révèlent aussi la force de notre méthode qui réside dans sa capacité à pouvoir déterminer la quantité d'HbA1c (donc l'âge relatif) de plus d'une sous-population de GR chez le même individu, contrairement aux méthodes biochimiques de Référence (HPLC par exemple).

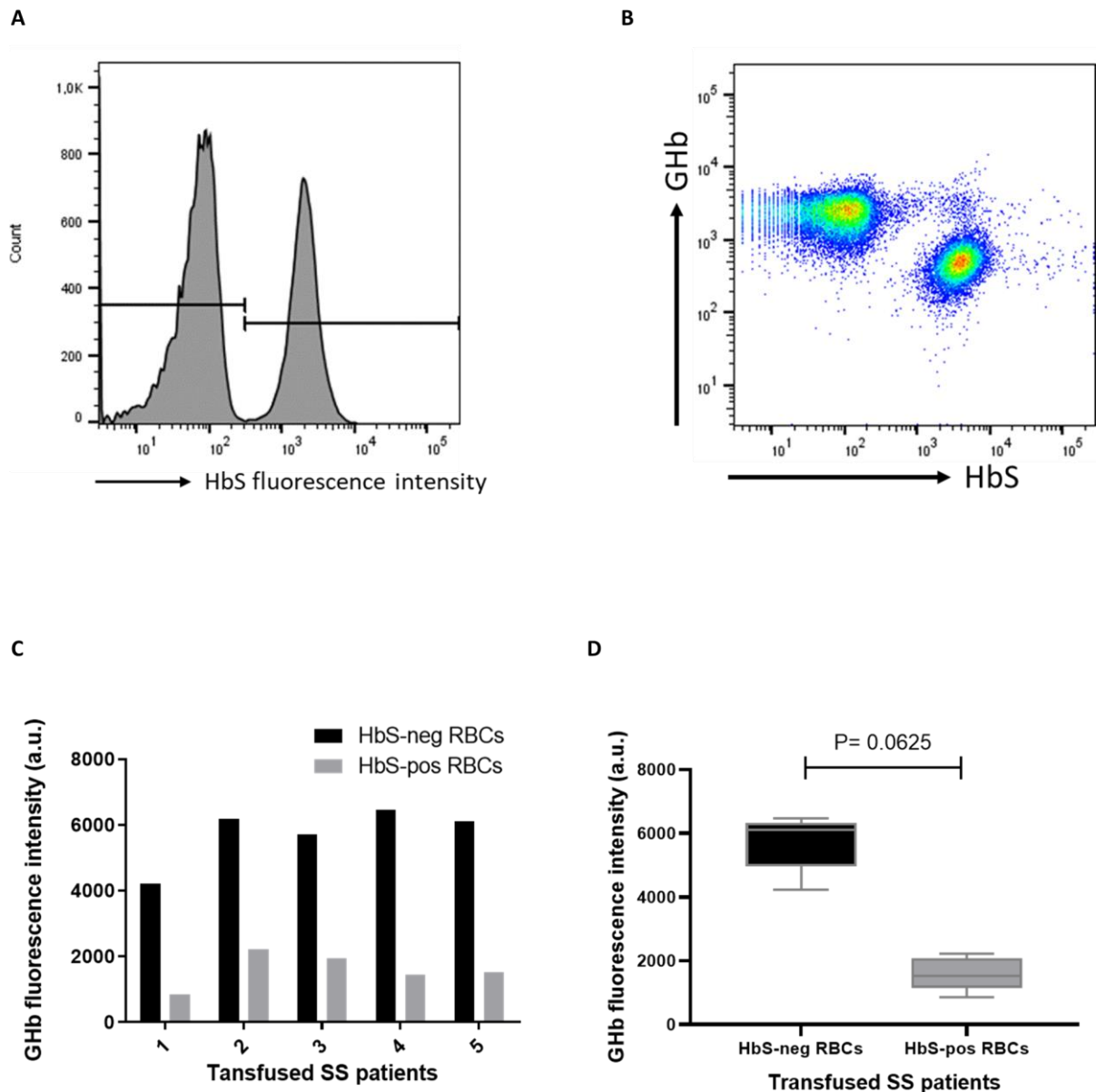


Figure 92. Quantité d'Hb glyquée mesurée par cytométrie de flux dans les GR autologues et transfusés discriminés par l'utilisation d'un anticorps anti- β S de des patients SS transfusés non diabétiques.

(A) Histogramme représentatif de cytométrie de flux montrant la distribution de deux populations de GR : population de GR-HbS positifs (GR-SS autologues) et population de GR-HbS négatifs (GR-AA transfusés). (B) Graphique en points (dot blot) de la cytométrie de flux représentant les deux populations de GR analysées co-marquées pour l'Hb glyquée (axe des Y) et HbS (axe des X). (C) Intensité de fluorescence moyenne de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux après fixation, perméabilisation et marquage intracellulaire avec un anti-HbA1c, dans les GR-SS (GR HbS-neg) et les GR-AA (GR HbS-pos) ($n=5$). (D) Le ratio HbA1-GR HbS-neg/HbA1c-GR HbS-pos est égal à 3,97 ($n=5$; $P=0,0625$, test de Wilcoxon).

35. Application de la méthode de mesure de l'âge relatif des GR par l'analyse de la glycation en cytométrie de flux chez les patients SS non transfusés.

35.1. Comparaison de l'âge relatif entre les GR-SS et les GR-AA.

Comme mentionné précédemment, l'objectif de ce travail de recherche est de développer une méthode qui permette de mesurer l'âge relatif des GR rouges de patients drépanocytaires. Après une double validation de la fiabilité et de la faisabilité de notre méthode chez les donneurs sains et les patients SS transfusés, nous avons procédé à l'application de cette nouvelle méthode de mesure de la durée de vie relative des GR chez les patients drépanocytaires homozygotes (SS) non diabétiques. Comme attendu, l'analyse des données obtenues de la mesure de l'Hb glyquée dans les GR de patients SS (GR-SS) en comparaison avec les GR de donneurs sains a montré que la quantité d'Hb glyquée était remarquablement plus faible dans les GR-SS (n=18 ; médiane = 1794) que dans les GR contrôle (GR-AA) (n= 9 ; médiane=5238) (**Figure 92A**). Cette différence est statistiquement significative ($P < 0,0001$). Encore une fois, nos résultats sont en concordance avec la littérature au sujet de la durée de vie réduite des GR de patients drépanocytaires.

35.2. Comparaison de l'âge relatif entre les rétics-SS et les rétics-AA.

Pour comprendre et mieux interpréter la différence en termes d'Hb glyquée entre les GR-SS et les GR-AA matures, nous avons décidé d'utiliser notre méthode pour vérifier la quantité d'HbA1c (l'âge) dans les réticulocytes (rétics) aussi bien de donneurs sains que de patients SS non transfusés. Le but de cette vérification est également de répondre à la question suivante : y aurait-il une différence au niveau de l'érythropoïèse entre les patients SS et le groupe contrôle qui pourrait potentiellement refléter des taux de glycation différents dans les stades qui précèdent le stade du GR mature et fonctionnel ?

Pour répondre à cette question, nous avons effectué un double marquage ciblant à la fois l'Hb glyquée et le récepteur de la transferrine TfR/CD71⁺. CD71⁺ est utilisé comme un marqueur informatif de la maturation réticulocytaire, puisque les réticulocytes sortant de la moelle osseuse ont le CD71 à leur surface qui disparaît pendant la maturation (remodelage membranaire) dans la circulation. Les résultats obtenus en cytométrie de flux ont montré que la quantité d'Hb glyquée des réticulocytes des patients SS non transfusés avait une forte tendance à être plus basse que celle des donneurs sains (**Figure 92B**) ($P = 0,057$). Ces résultats laissent supposer que les réticulocytes chez les patients SS seraient soit libérés de la moelle osseuse plus précocement que les réticulocytes contrôle sans que la durée de temps passé dans la circulation à l'état réticulocyte soit changée (cas de l'érythropoïèse de stress), soit qu'ils passent au stade du GR mature plus tôt (maturation accélérée) une fois dans la circulation, ce qui expliquerait, dans les deux cas, la quantité faible en Hb glyqué dans les rétics-SS par rapport aux rétics-AA.

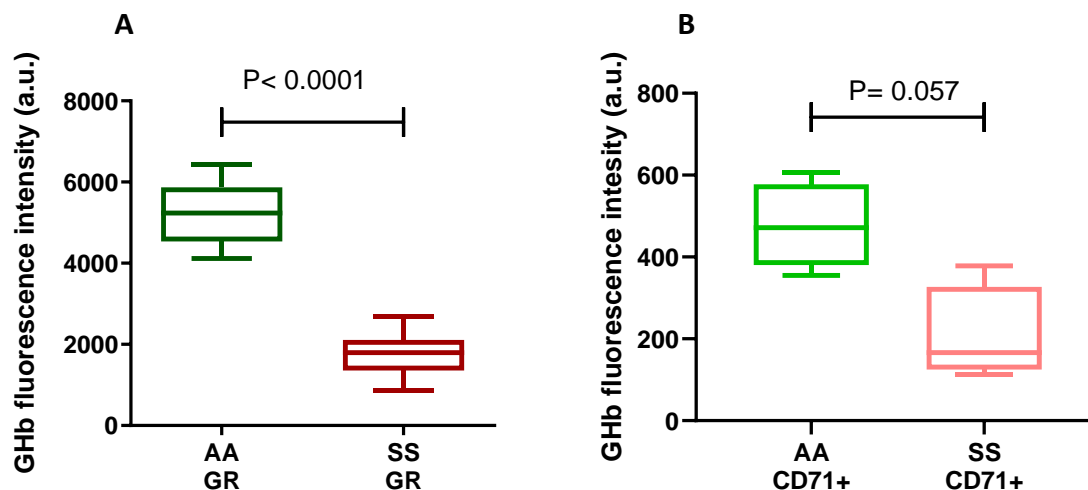


Figure 93. Application de la méthode de mesure de l'âge relatif des GR par l'Hb glyquée en cytométrie de flux chez les patients drépanocytaires homozygotes non diabétiques.

(A) Comparaison de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée, mesurée par cytométrie en flux après fixation, perméabilisation et marquage intracellulaire avec un anti-HbA1c, de la quantité d'Hb glyquée entre les GR-SS (n= 18) et les GR contrôles matures (n=9) ($P < 0,0001$, test de Mann-Whitney). (B) Comparaison de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée, mesurée par cytométrie en flux après fixation, perméabilisation, marquage intracellulaire avec un anti-HbA1c et ajout d'un anti-CD71, entre les rétics-SS (n= 4) et les rétics-AA (n=4) ($P = 0,057$, test de Mann-Whitney).

35.3. Effet du traitement par l'hydroxyurée sur l'âge relatif des GR-SS

Les résultats des expériences précédentes ont montré que la quantité d'Hb glyquée dans les GR de patients SS mesurée avec notre méthode était significativement faible traduisant une réduction drastique de la durée de vie relative des GR-SS. Parmi les traitements les plus utilisés pour atténuer la sévérité de la drépanocytose, nous identifions l'hydroxyurée (HU). Bien que les patients drépanocytaires ne soient pas tous de bons répondeurs au traitement par l'HU, ce dernier est connu pour ses effets biologiques pléiomorphes qui consistent principalement à l'augmentation de la synthèse des chaînes gamma qui constituent l'HbF. Pour analyser l'effet de l'HU sur les quantités d'Hb glyquée dans les GR de patients SS non transfusés, nous avons mesuré avec notre méthode la quantité d'Hb glyquée dans les GR de deux groupes de patients : patients SS avec HU (n= 24) et patients SS sans HU (n= 25). La [figure 92A](#) montre la différence statistiquement significative du pourcentage d'HbF mesuré par HPLC entre les patients non traités et les patients traités par HU ($P = 0.003$), confirmant ainsi l'effet de l'HU dans l'augmentation du taux d'HbF. Dans la [figure 92B](#), les résultats de la comparaison des valeurs de l'Hb glyquée entre le groupe avec HU et sans HU ont montré que les GR de patients traités avec l'HU ont une quantité d'Hb glyquée statistiquement plus élevée (MFI médiane = 1963) que les GR de patients n'ayant pas reçu de traitement (MFI médiane = 878,7) ($P < 0,001$).

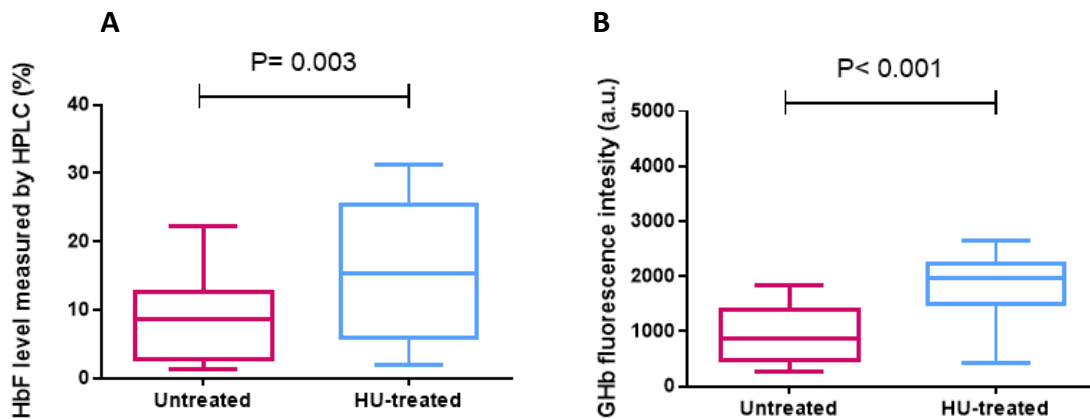


Figure 94. Effet de l'HU sur l'âge relatif des GR par l'Hb glyquée en cytométrie de flux chez les patients drépanocytaires homozygotes non diabétiques.

(A) Comparaison du niveau d'HbF, mesuré par HPLC, entre des patients non traités (n= 25) et des patients traités (n=24) par HU. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hémoglobine totale (P= 0,0001, test de Mann-Whitney). (B) Comparaison de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée, mesurée par cytométrie en flux après fixation, perméabilisation et marquage intracellulaire avec un anti-HbA1c, entre des patients non traités (n= 25) et des patients traités (n =24) par HU (P< 0,01, test de Mann-Whitney).

Le résultat montrant l'effet positif de l'HU sur la quantité d'Hb glyquée et par conséquent sur l'âge relatif des GR-SS nous a conduit vers la deuxième étape qui a consisté à identifier le mécanisme par lequel l'HU permet d'allonger la durée de vie relative des GR chez les patients drépanocytaires. Mais avant, une étape technique consistant à normaliser la fluorescence de l'Hb glyquée a été nécessaire d'être effectuée.

35.4. Normalisation de la fluorescence de l'hémoglobine glyquée en présence d'HbF

Comme précédemment mentionné, la littérature indique que l'HbF ne semble pas se glyquer au niveau du premier acide aminé « la glycine » de sa chaîne γ -globine. En outre, l'anticorps que nous avons utilisé pour détecter l'Hb glyquée étant spécifique à la chaîne β -globine glyquée, il ne peut pas reconnaître la chaîne γ -globine de l'HbF. Par conséquent, pour une cellule individuelle qui contient beaucoup d'HbF, la valeur de l'Hb glyquée (GHb) mesurée est sous-évaluée car elle tient compte seulement de la fraction d'HbS qui se glyque.

Pour normaliser l'intensité de fluorescence de GHb qui correspond à la fraction d'HbS, par rapport à l'hémoglobine totale, il faut soustraire l'HbF de l'hémoglobine totale. De cette façon, l'intensité de fluorescence normalisée correspondra à ce qui serait mesuré s'il n'y avait pas d'HbF dans les cellules. Cette normalisation nécessite plusieurs pré-requis :

- Que l'HbF ne se glyque pas au niveau de l'extrémité N-terminale de sa chaîne γ ,

- Que la TCMH soit uniformément distribuée dans tous les GR
- Que l'HbF soit quantifiable dans chaque GR

La **figure 94A** montre le marquage intracellulaire de l'HbA1c réalisé sur des GR d'un patient présentant une PHHF et qui présente un taux d'HbF de 100%, mesuré par HPLC (**figure 94B**). Le niveau d'intensité de fluorescence de l'HbA1c mesuré dans ses GR (12,2) et dans ses réticulocytes CD71+ (8,75) est similaire aux niveaux mesurés par l'utilisation d'un isotype contrôle (7,07) ou sur les GR non marqués (6,46). Ces résultats permettent de valider le premier pré-requis.

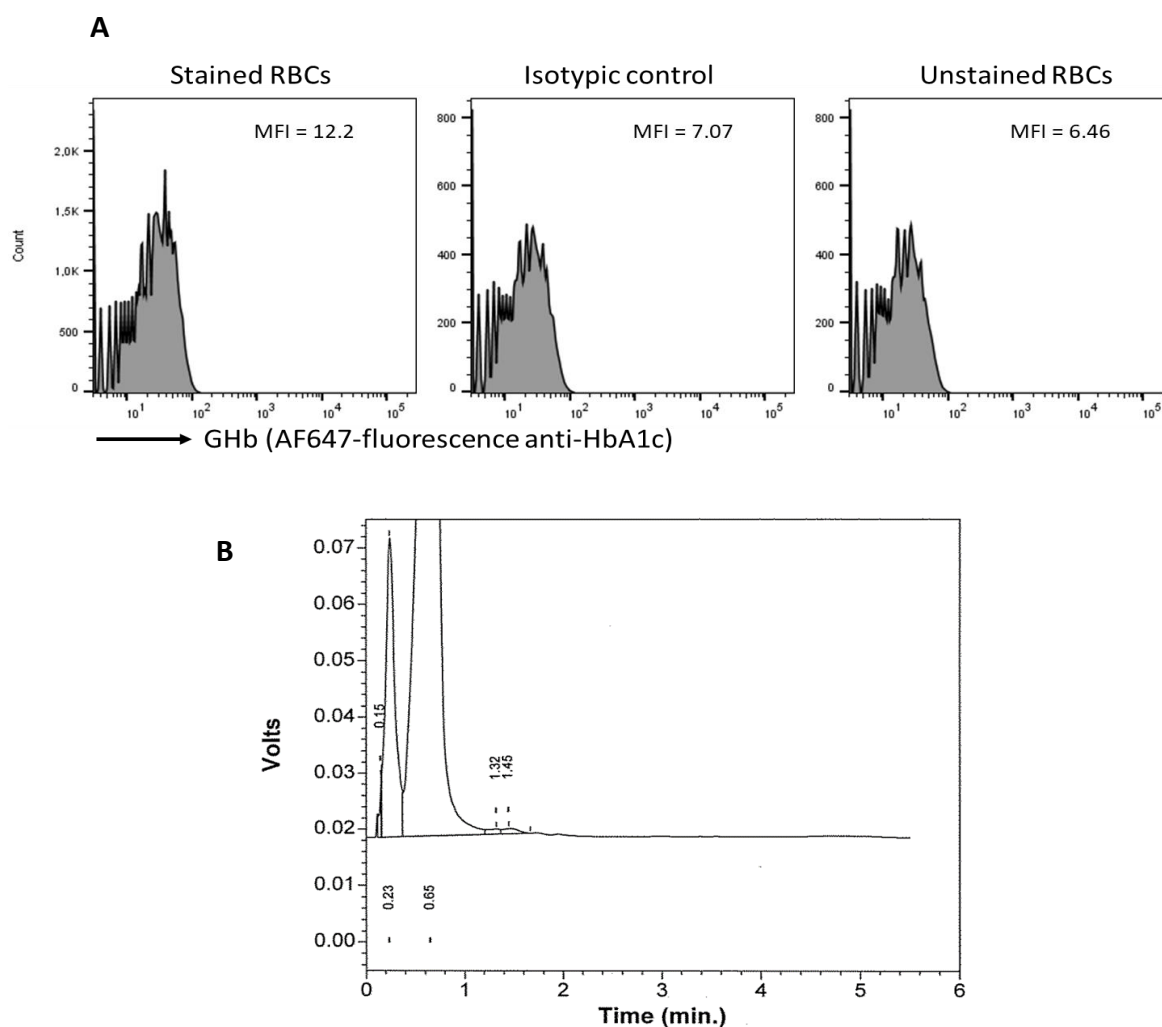


Figure 95. Mesure de l'Hb glyquée par cytométrie en flux dans des GR d'un patient 100% HbF après fixation et perméabilisation.

(A) Histogrammes représentatifs de la fluorescence de l'Hb glyquée dans des GR incubés avec l'anti-HbA1c (panel de gauche), dans des GR incubés avec un isotype contrôle (panel central) et dans des GR incubés avec aucun anticorps (contrôle non marqué - panel de droite). Pour chaque panel, la valeur de fluorescence moyenne (MFI) de l'Hb glyquée est donnée. (B) Profil HPLC représentatif (n=11) des GR du patient 100% HbF utilisés pour les marquages de la figure 8A montrant deux espèces de l'hémoglobine : temps de rétention 0,23 min = HbF-acétylée et 0,65 min = HbF.

Pour s'assurer que la teneur en hémoglobine totale soit similaire dans tous les globules rouges d'un même individu, pris individuellement, nous avons réalisé le marquage intracellulaire de la chaîne alpha-globine en utilisant un anticorps monoclonal anti-alpha-globine fluorescent. La **figure 95** montre 2 histogrammes, représentatifs d'une distribution homogène de l'alpha-globine, et par extension de l'Hb totale, dans les GR d'un patient traité par HU et d'un patient non traité. Pour chaque individu non traité (n= 25) et traité par HU (n= 24), le test statistique de normalité de D'agostino & Pearson a été réalisé pour s'assurer que la distribution de l'Hb totale dans la population de GR suivait la loi Normale, permettant de répondre au deuxième pré-requis.

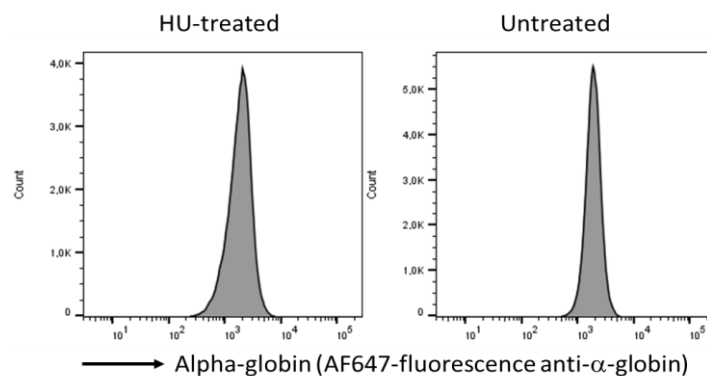


Figure 96. Mesure de la chaîne alpha de l'Hb par cytométrie en flux dans des GR.

Histogrammes représentatifs de la fluorescence de l'Hb glyquée dans des GR incubés avec un anti-alpha-globine après fixation et perméabilisation dans des GR des patients non traités (n = 25 ; panel de gauche) et traités par HU (n= 24 ; panel de droite). Pour chaque patient, un test de normalité de D'agostino & Pearson a été réalisé indépendamment.

Enfin, nous avons réalisé la quantification de l'HbF par GR chez les mêmes patients non-traités ou traités par HU. Pour ce faire, nous avons quantifié l'HbF en présence de l'anticorps qui cible l'HbS glyquée (voir l'influence d'un anticorps par rapport à l'autre). La quantification a été effectuée selon la méthode de Hebert *et al.* (2020) développée au sein de notre équipe de recherche et est basée sur une corrélation linéaire mise en évidence entre le contenu moyen en HbF (MCHbF) et l'intensité moyenne de fluorescence mesurée dans chaque GR en utilisant l'anticorps anti-HbF et normalisée à l'aide des billes de quantification. En se référant à cette corrélation, le pourcentage de GR qui contiennent une quantité donnée d'HbF (seuils d'HbF exprimée en picogramme) est calculé. Nous avons tout d'abord vérifié que le double marquage HbA1c-HbF n'interfère pas sur la mesure de la fluorescence de l'Hb glyquée. Pour cela, l'intensité de fluorescence moyenne d'Hb glyquée mesurée lors de simples marquages (anti-HbA1c seul) a été comparée à l'intensité de la fluorescence moyenne d'Hb glyquée mesurée lors de doubles marquages (anti-HbA1c et anti-HbF ensembles). La **figure 96A** est une représentation de Bland-Altman montrant la variation de chaque mesure par le ratio de l'intensité de fluorescence (double marque / mono marquage) en fonction de la moyenne de

l'intensité de fluorescence. Le biais de mesure est évalué à 1,072, que nous avons estimé comme négligeable. La **figure 96B** montre la corrélation linéaire ($P < 0.001$) entre l'intensité de fluorescence en double marquage par rapport à l'intensité de fluorescence en simple marquage. Des résultats similaires ont été obtenus en comparant les valeurs de coefficient de variation de chaque intensité de fluorescence de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux, attestant que l'ajout de l'anti-HbF ne modifie pas non plus la distribution dans la population de GR. Ces résultats montrent que l'ajout de l'anti-HbF n'altère pas le signal de fluorescence de l'Hb glyquée mesuré par cytométrie en flux. Nous avons obtenu des résultats similaires sur l'intensité de l'HbF et sa quantification en présence ou non de l'anti-HbA1c (Résultats non montrés).

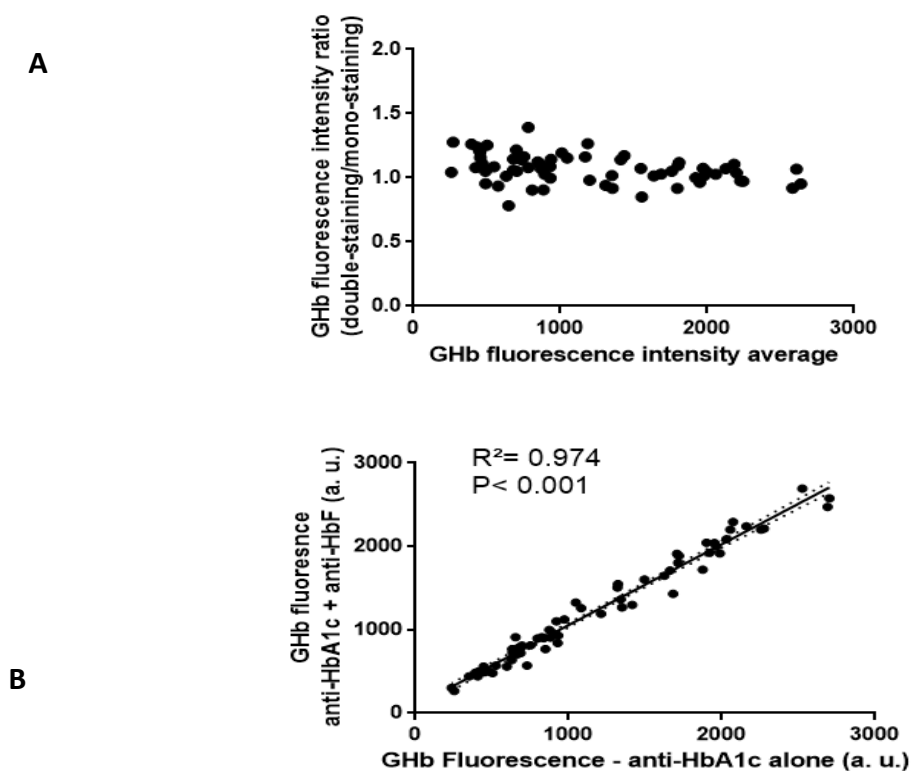


Figure 97. Effet de l'ajout d'un anti-HbF fluorescent sur la mesure de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée.

(A) Représentation de Bland-Altman montrant la variation de la mesure de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée par cytométrie en flux en présence ou absence d'anti-HbF. L'axe des y représente le ratio de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée du double marquage (HbA1c + HbF) sur le mono marque (HbA1c seul) ($n = 67$). L'axe des x représente la moyenne (double marquage et mono marquage) de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée. (B) Régression linéaire montrant la relation entre la mesure de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée dans le cas du double marque (HbA1c + HbF) et dans le cas du mono marquage (HbA1c seul) ($n = 67$; $P < 0,001$; test de Pearson).

Les résultats de la distribution quantitative de l'HbF par GR sont présentés dans la **figure 97A**. Nous avons mesuré des pourcentages de GR possédant entre 0-2 pg et 2-4 pg d'HbF par GR

qui est plus faibles chez les patients traités par HU par comparaison aux patients non traités ($P < 0.001$ et $P = 0.029$, respectivement). Les pourcentages de GR possédant entre 8-10 pg et ≥ 10 pg d'HbF par GR étaient plus élevés chez les patients traités par HU que chez les non-traités ($P = 0.025$ et $P < 0.001$, respectivement). Ces résultats sont en accord avec un taux d'HbF plus élevé chez les patients traités (Médiane = 15,4% ; de 1,9% à 31,2%) que chez les individus non traités (Médiane = 8,6% ; de 1,4% à 22,2%), une différence elle aussi statistiquement significative ($P = 0.003$; **Figure 97A**). Les seuils d'HbF par GR, c'est-à-dire le pourcentage de GR contenant à minima 2, 4, 6, 8 ou 10 pg d'HbF, étaient eux-aussi tous plus élevés, de manière statistiquement significative ($P < 0.001$) chez les individus traités par HU que chez les non traités comme le montre la **figure 97B**.

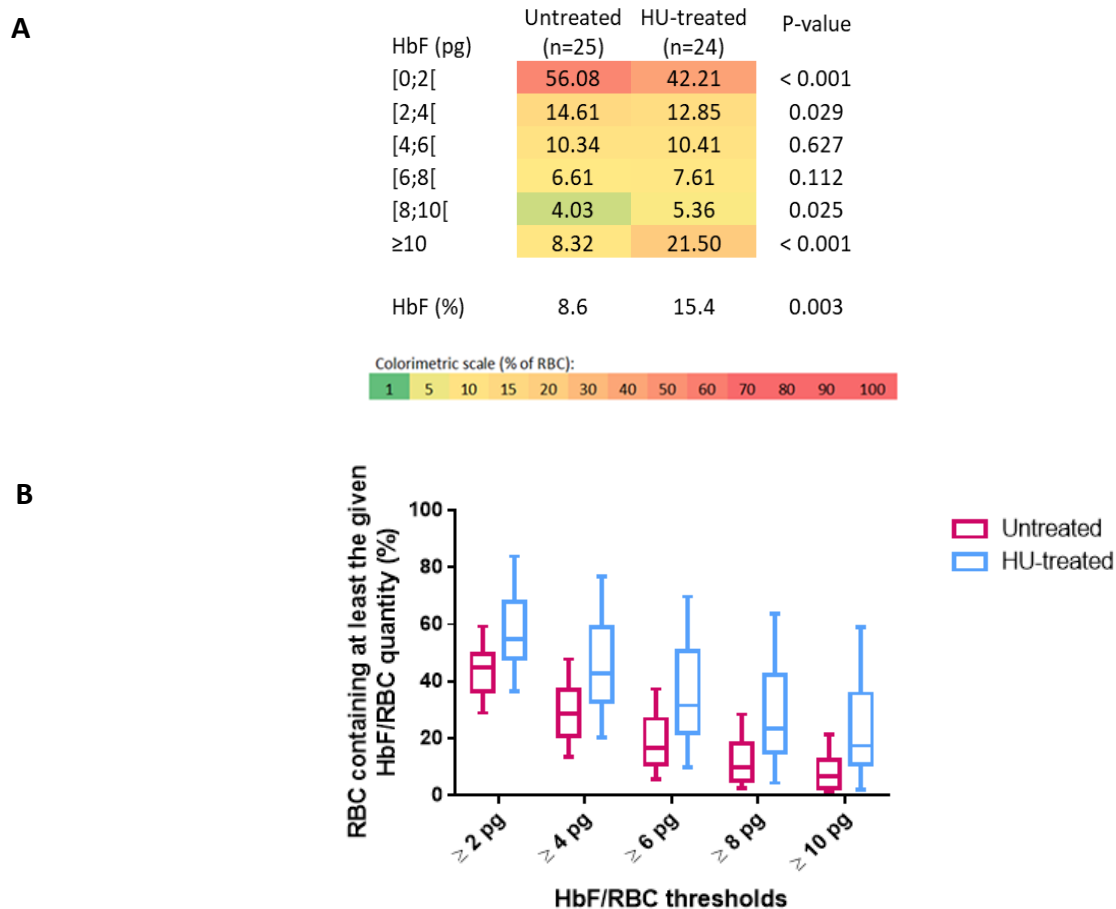


Figure 98. Quantification de l'HbF par GR chez les patients non traités ou traités par HU.

(A) Comparaison de la distribution quantitative de l'HbF par GR chez des patients non traités ($n = 25$) et traités par HU ($n = 24$). Les GR sont triés et ordonnés en catégories (GR possédant entre 0 et < 2 pg d'HbF : [0;2[pg d'HbF ; possédant entre 2 et < 4 pg d'HbF : [2;4[pg d'HbF ; etc) selon leur contenu en HbF/GR exprimée en pg d'HbF et exprimés en pourcentage de la population de GR. Pour chaque catégorie la valeur de P-value du test de Mann-Whitney est affichée. L'échelle colorimétrique permet une visualisation de la distribution des GR en fonction du pourcentage de cellules dans chaque catégorie. **(B)** Différence du pourcentage de GR qui possèdent à minima 2, 4, 6, 8 ou 10 pg d'HbF/GR chez les patients traités ou non traités par HU.

Pour chaque cellule individuellement, l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée a été normalisée selon la formule :

$$\text{normGHb} = \frac{\text{GHb}}{(\text{TCMH} - \text{HbF})} \times \text{TCMH}$$

Où, normGHb est l'intensité de la fluorescence de l'Hb glyquée normalisée, GHb est l'intensité fluorescence mesurée par cytométrie, HbF est la teneur (en pg) en HbF de la cellule et TCMH est la TCMH de l'échantillon de GR. Cette formule est valable si et seulement si la distribution de l'Hb totale est uniforme dans l'échantillon de GR utilisé. Après normalisation, la différence d'intensité de fluorescence d'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux chez les patients traités ou non traités par HU (**Figure 93B**) reste statistiquement significative ($P < 0,001$ - test de Mann-Whitney).

35.5. Effet du taux d'HbF sur l'âge relatif des GR-SS

La **figure 98A** illustre la corrélation linéaire positive ($R^2 = 0,65$; $P < 0,001$) retrouvée entre le taux normalisé d'Hb glyquée évaluée en cytométrie de flux et le pourcentage d'HbF déterminé par HPLC dans l'hémolysât des GR de patients SS avec et sans hydroxyurée ($n=49$). Il semble qu'il y ait un lien entre l'augmentation du taux total d'HbF et l'augmentation de la quantité d'Hb glyquée. Dans la **figure 98B**, nous avons utilisé un code de couleur pour différencier, dans le nuage de points, entre les points qui correspondent aux patients traités par HU et ceux qui représentent les patients non traités. L'observation visuelle du code de couleur nous montre que l'HU augmenterait la quantité d'Hb glyquée et allongerait donc la durée de vie des GR-SS de façon dépendante de l'HbF. De plus, la relation linéaire entre les 2 groupes de patients ne présente pas de différence statistiquement significative ($P = 0,417$) de pente ($60,3 \pm 17,0$ pour les patients non traités et $76,9 \pm 10,9$ pour les patients traités par HU). Ceci indique que l'augmentation de normGHb observée par l'HbF est identique, avec ou sans traitement. En revanche, les ordonnées à l'origine des régressions linéaires entre les 2 groupes de patients présentent une différence qui est statistiquement significative ($P < 0,001$).

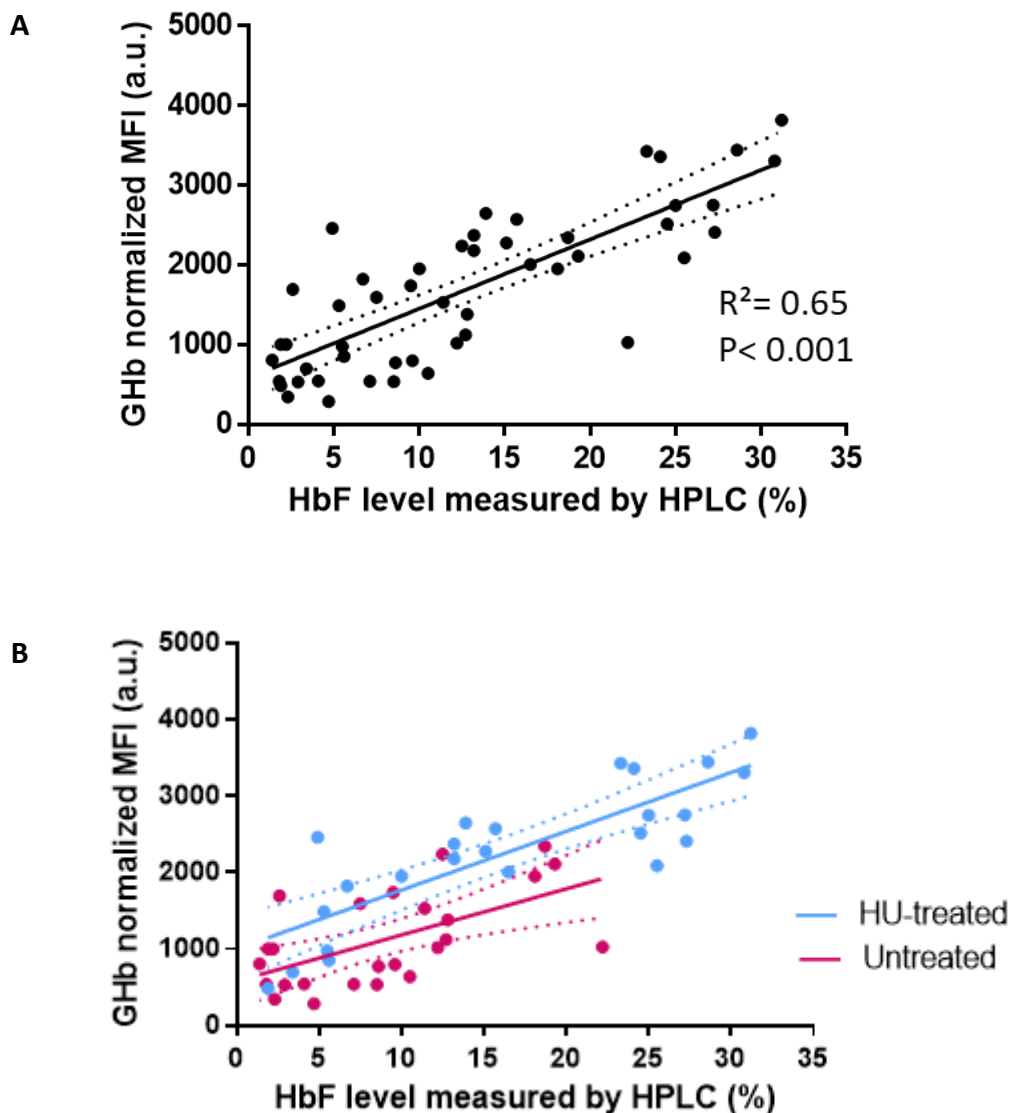


Figure 99. Effet du l'HbF sur la l'âge relatif des GR-SS mesuré par glycation de l'hémoglobine en cytométrie de flux.

(A) Corrélation linéaire entre l'intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux (axe des y) et le pourcentage d'HbF déterminé par HPLC (axe des x) chez des patients SS, traités et non traités par HU (n=49) ; coefficient de Pearson $R^2 = 0,65$; $P < 0,001$). L'intervalle de confiance à 95% est affiché en lignes pointillées (B) Corrélations linéaires, avec les mêmes données que le panel A, calculées séparément pour les patients non traités (n= 25 ; coefficient de Pearson $R^2 = 0,35$; $P < 0,001$) et traités par HU (n = 24 ; coefficient de Pearson $R^2 = 0,69$; $P < 0,001$). Les intervalles de confiance à 95% de chaque corrélation linéaire sont affichés en lignes pointillées.

35.6. Effet de la teneur en HbF/GR sur l'âge relatif des GR-SS

Dans le but de vérifier l'hypothèse émise à la fin de l'expérience précédente qui laisse supposer l'existence d'un effet positif sur la quantité d'Hb glyquée dans les GR-SS induit par l'HbF à des taux élevés, nous avons dans un premier temps analysé, chez

chaque patient SS, la quantité d'Hb glyquée mesurée par cytométrie de flux dans deux sous-populations de GR définies par leur teneur en HbF (low HbF-RBC et high HbF-RBC) et discriminées selon la distribution de l'HbF étudiée à l'aide de l'anticorps anti- γ de l'Hb humaine (**Figure 99A**). Les résultats obtenus à partir de l'analyse de 7 patients SS ont révélé qu'effectivement la quantité d'Hb glyquée était statistiquement plus élevée dans la sous-population de GR manifestant une forte teneur en HbF (médiane= 1949) que dans celle des GR avec une teneur faible en HbF (médiane= 917) ($P= 0,016$) (**Figure 99B**)

La même expérience menée chez le groupe contrôle (4 donneurs sains) n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les deux sous-populations de GR (faible et forte teneur en HbF) (**Figure 99C**).

Les résultats obtenus dans le groupe de patients SS et dans celui de donneurs sains indiquent que l'HbF permet d'augmenter la quantité d'Hb glyquée et par conséquent l'allongement de la durée de vie des GR uniquement chez les patients drépanocytaires. L'HbF semble n'avoir aucun impact sur la durée de vie des GR-AA.

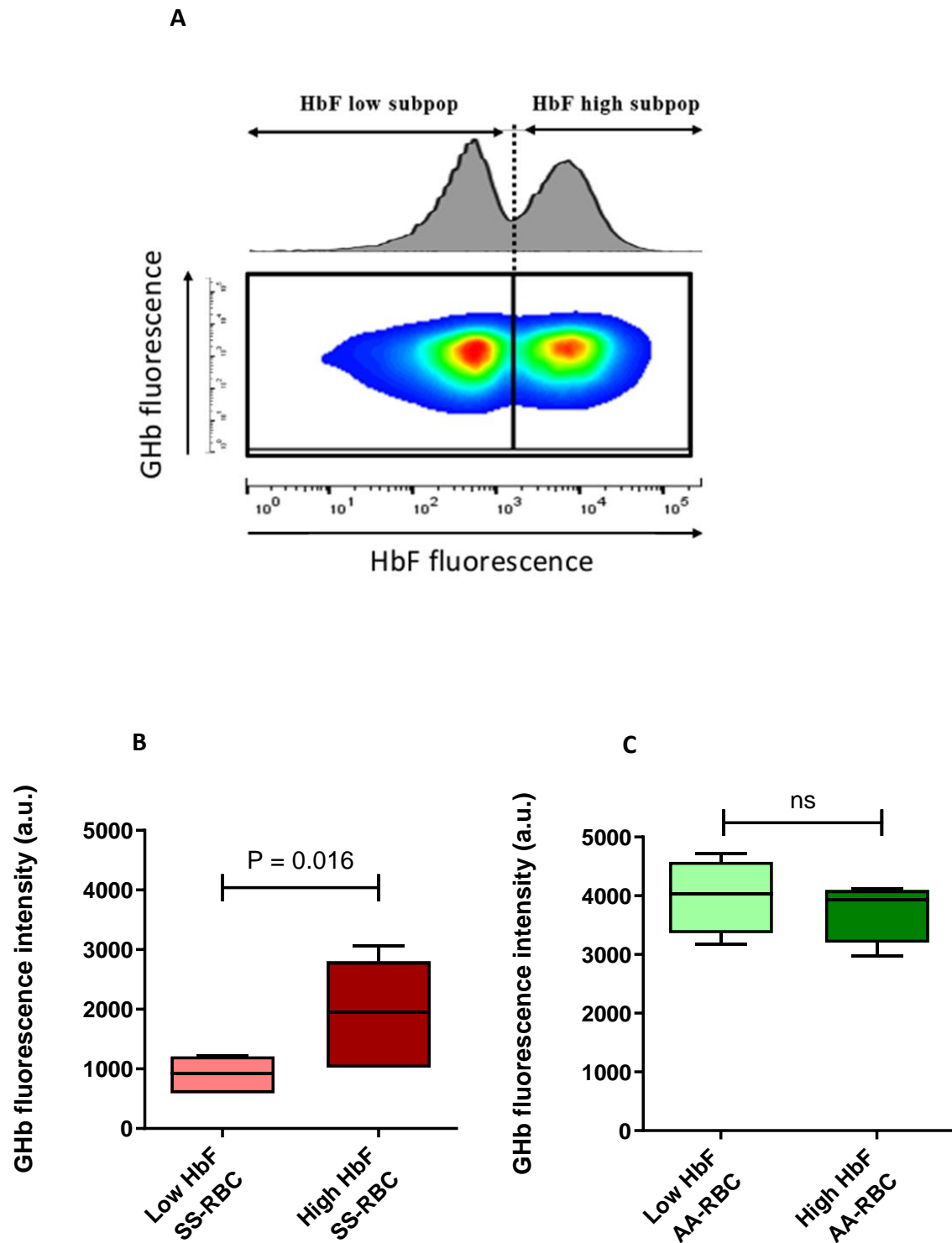


Figure 100. Effet positif de l'HbF sur la quantité d'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux dans les sous-populations de GR de patients SS non transfusés et non diabétiques discriminées en fonction de la distribution de l'HbF.

(A) Histogramme de cytométrie en flux représentatif de deux sous-populations de GR à faible teneur en HbF (Low HbF RBC) et à forte teneur en HbF (High HbF RBC). Comparaison de la quantité d'Hb glyquée entre les GR à forte et à faible teneur en HbF, (B) chez les patients SS ($n = 7$; $P = 0,016$, Test de wilcoxon) et, (C) dans le groupe contrôle (GR-AA) ($n = 4$; $P = 0,25$, Test de wilcoxon).

Nous avons séparé les sous-population de GR des patients SS (n=49) traités ou non traités par HU non plus visuellement sur la base d'une population HbF-Low et HbF-High, mais sur la base de leur teneur en HbF, quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la **figure 100A**, qui montre les niveaux de fluorescence d'Hb glyquée normalisée (normGHb) en fonction de la quantité minimale d'HbF (en pg) dans les GR. Nous pouvons observer que les sous-populations de GR qui contiennent plus d'HbF ont une intensité de fluorescence normalisée d'Hb glyquée augmentée, indiquant que les GR correspondants vivent plus longtemps. Pour chaque seuil d'HbF/GR, les intensités de fluorescence normalisée d'Hb glyquée étaient plus élevées dans les GR des patients traités par HU par comparaison aux patients non traités et ce de façon statistiquement significative (résultats non montrés).

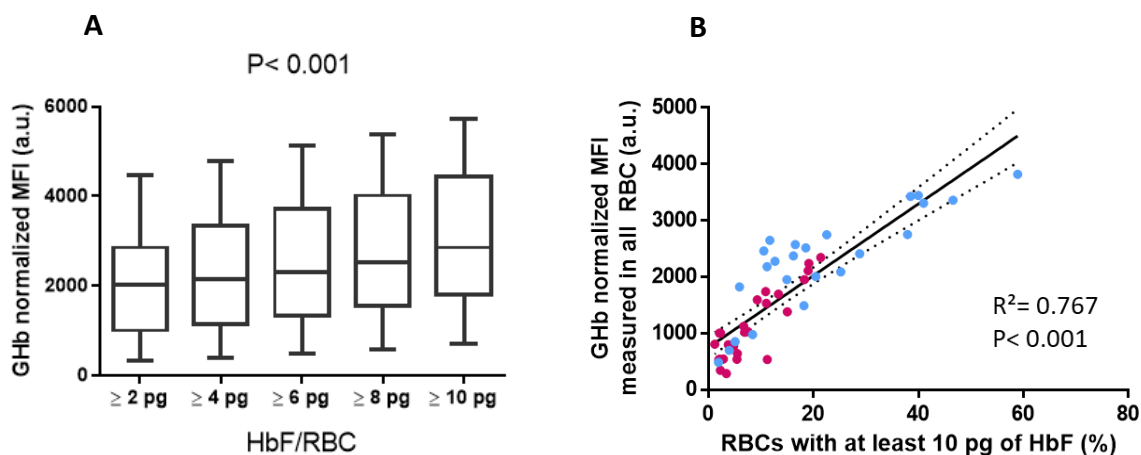


Figure 101. Effet positif de l'HbF sur la survie relative des GR de patients.

(A) Intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux selon le contenu minimal en HbF par GR chez les patients traités ou non traités par HU (n= 49 ; $P < 0.001$; test de Friedman). (B) Corrélation linéaire entre Intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux et le pourcentage de GR qui possèdent un minimum de 10 pg d'HbF/GR chez les patients non traités (rose) ou traité par HU (bleu) (selon le contenu minimal en HbF par GR (n= 49 ; coefficient de Pearson $R^2 = 0,767$; $P < 0,001$).

L'effet de la quantité d'HbF par cellule sur l'augmentation de l'Hb glyquée a ensuite été évalué en regardant la relation entre l'intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée, mesurée dans la totalité des GR, avec le pourcentage de GR qui possèdent un minimum de 10 pg d'HbF/GR, une quantité modélisée comme inhibitrice de la polymérisation de l'HbS (Steinberg et al., 2014) (**Figure 100B**). Les résultats montrent une relation linéaire ($P < 0.001$) entre l'augmentation de l'intensité de fluorescence mesurée dans tous les globules rouges des patients et le pourcentage de GR qui possède un minimum de 10 pg d'HbF. Des corrélations linéaires similaires ont été calculés en utilisant le pourcentage de GR qui possèdent un minimum de 6 pg d'HbF ($R^2 = 0,789$; $P < 0,001$) et ceux qui possèdent un minimum de 8 pg d'HbF ($R^2 = 0,783$; $P < 0,001$) (tests de Pearson). Nous avons préalablement démontré que le

pourcentage de GR qui possèdent plus de 6, 8 et 10 pg d'HbF chez les patients atteints de drépanocytose est inversement corrélé à l'incidence des crises vaso-occlusives (Hebert et al, 2020).

35.7. Evaluation de l'âge relatif des GR-SS non denses et denses

Les GR denses et pathologiques sont une caractéristique de la drépanocytose. Par gradient de percoll, nous avons séparé les GR denses (densité supérieure à 1,110 g/mL), des GR non denses (densité inférieure à 1,110 g/mL) de 9 patients SS non transfusés et non diabétiques. Nous avons sélectionné des patients non traités par HU car il a été démontré que l'HU réduit de façon drastique la fraction de GR dense chez les patients (Rakotoson et al., 2015).

Nous avons ensuite mesuré en parallèle les niveaux de fluorescence de l'Hb glyquée (normalisée comme ci-dessus - après vérification de l'homogénéité de distribution de l'Hb dans chaque échantillon) et quantifié l'HbF par GR. La distribution quantitative de l'HbF/GR est présentée dans la **figure 101A**. Quelle que soit la quantité d'HbF/GR, nous n'avons observé aucune différence statistiquement significative entre les GR non denses et les GR denses des patients (tests de Wilcoxon). Nous n'avons pas non plus observé de différences statistiquement significative des seuils d'HbF par GR, entre les GR non denses et les GR denses de ces patients, comme le montre la **figure 101B**. L'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée normalisée, mesurée par cytométrie en flux, était plus faible dans les GR denses que dans les GR non denses, sauf pour un patient ($P= 0,027$; test de Wilcoxon) (**Figure 101C**). Ce résultat indique que la population de GR denses est de manière générale moins âgée que celle des non denses chez ces patients.

A

HbF (pg)	Non Dense RBCs (n=9)	Dense RBCs (n=9)	P-value
[0;2[55.97	57.29	0.359
[2;4[17.49	17.54	0.999
[4;6[11.62	11.23	0.055
[6;8[6.54	6.05	0.301
[8;10[3.23	2.92	0.496
≥10	5.15	4.96	0.375

Colorimetric scale (% of RBC):

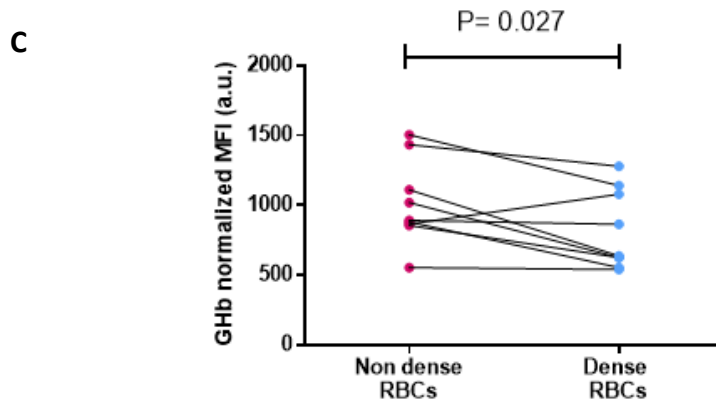
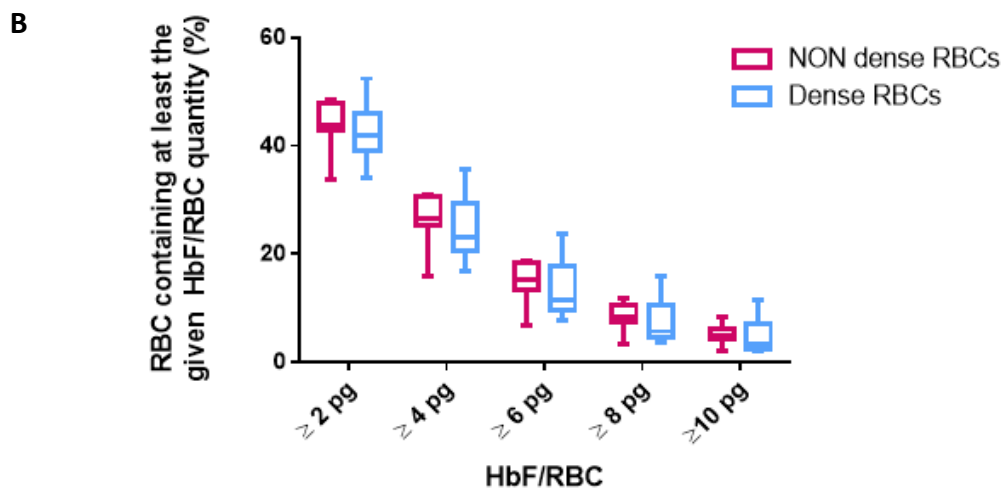


Figure 102. Comparaison des niveaux d'HbF et d'Hb glyquée cellules non denses et denses.

A) Comparaison de la distribution quantitative de l'HbF par GR dans les GR non denses et les GR denses de patients non traités par HU (n= 9). Les GR sont triés et ordonnés en catégories selon leur contenu en HbF/GR exprimée en pg d'HbF et exprimés en pourcentage de la population de GR. Pour chaque catégorie la valeur de P-value du test de Wilcoxon est affichée. L'échelle colorimétrique permet une visualisation de la distribution des GR en fonction du pourcentage de cellules dans chaque catégorie. **(B)** Différence du pourcentage de GR qui possèdent à minima 2, 4, 6, 8 ou 10 pg d'HbF/GR entre les GR non denses et les GR dense

des patients non traités par HU. **(C)** Différence d'intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée, mesurée par cytométrie en flux, entre les GR non denses et les GR denses des patients non traités par HU (n= 9 ; P= 0,027 ; test de Wilcoxon).

La plus faible intensité moyenne de fluorescence d'Hb glyquée dans les cellules denses, représente leur plus faible durée de vie de façon globale. Associé au fait que nous n'avons observé aucune différence de contenu en HbF entre les cellules non denses et denses, suggère une large hétérogénéité de distribution des Hb dans ses sous-populations cellulaires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé la distribution d'Hb glyquée comme le montre les histogrammes de la **figure 102A**. Les coefficients de variation de l'intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée plus élevés dans les cellules denses (médiane = 103,8% - de 84,7% à 123%) que non denses (médiane = 91,5% - de 71,3% à 114,3%) comme le montre la **figure 102B** (P= 0.039 ; test de wilcoxon), confirment cette hétérogénéité de durée de vie plus importante dans la sous population de GR denses. Nous avons ensuite quantifié l'HbF/GR en sélection, dans les GR non denses et dans les GR denses, les 10% de GR avec l'intensité de fluorescence normalisée d'Hb glyquée la plus élevée (correspondant au 10% de GR les plus vieux - **Figure 102C**). La même quantification a été réalisée dans les 5% de GR avec l'intensité de fluorescence normalisée d'Hb glyquée la plus élevée (correspondant au 5% de GR les plus vieux - **Figure 102D**). Enfin, nous avons également calculé les intensité de fluorescence normalisée moyenne d'Hb glyquée pour chacune de ses sous populations et avons comparé les valeurs en calculant le ratio MFI Hb glyquée dense sur MFI Hb glyquée non dense.

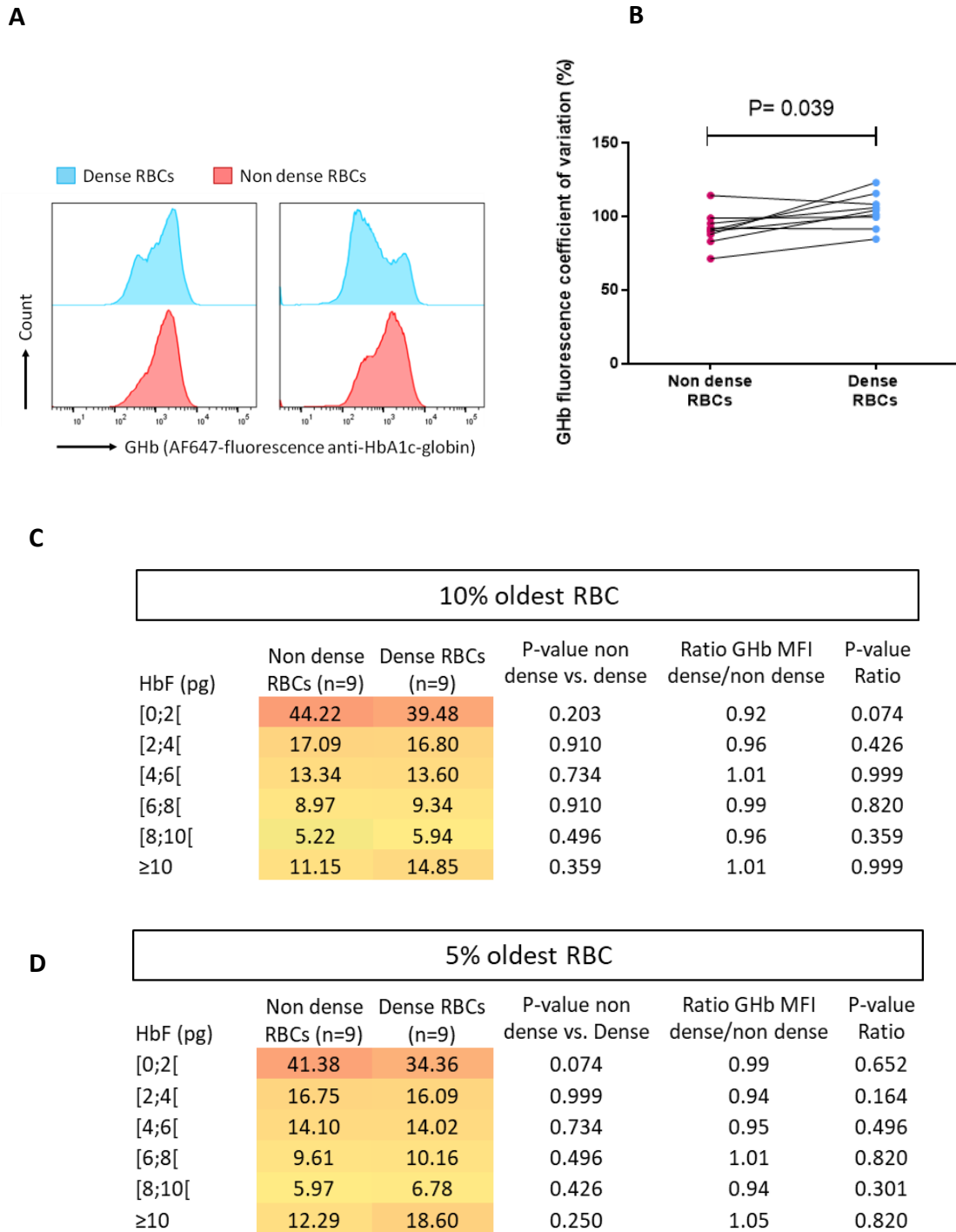


Figure 103. Analyse de l'hétérogénéité de la sous population de GR denses.

(A) Histogrammes représentatives de la distribution de la fluorescence de l'Hb glyquée dans des GR non denses (rose) et denses (bleu) obtenu chez 2 patients non traités par HU. (B) Différence des coefficients de variation d'intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée, mesurée par cytométrie en flux, entre les GR non denses et les GR denses des patients non traités par HU (n= 9 ; P= 0,039 ; test de Wilcoxon). (C et D) Comparaison de la distribution quantitative de l'HbF par GR dans les GR non denses et les GR denses de patients non traités par HU (n= 9). Quantifications réalisés dans les 10% de GR avec la plus forte intensité de fluorescence normalisée d'Hb glyquée (panel C) et les 5% de GR avec la plus forte intensité de fluorescence normalisée d'Hb glyquée (panel D). Les GR sont triés et ordonnés en

catégories selon leur contenu en HbF/GR exprimée en pg d'HbF et exprimés en pourcentage de la population de GR. Pour chaque catégorie la valeur de P-value du test de Wilcoxon est affichée. L'échelle colorimétrique permet une visualisation de la distribution des GR en fonction du pourcentage de cellules dans chaque catégorie. Pour chaque catégorie, le ratio denses/non denses, d'intensité de fluorescence normalisée mesuré par cytométrie en flux, est indiqué. Tests de Wilcoxon.

La quantification dans les sous populations de GR, aussi bien au niveau de l'HbF que de l'Hb glyquée, nous a permis d'apprécier les différences de contenu en HbF et d'âge relatif des GR non denses et denses. Nous avons observé dans les 10% et 5% de GR les plus âgés une différence respective de +33,2% et +51,3% de GR qui possèdent plus de 10 pg d'HbF dans les GR denses par rapport aux GR non denses. Cette accumulation était corrélée à une différence respective de -10,8% et -17,0% de possédant moins de 2 pg d'HbF dans les GR denses par rapport aux GR non denses. Nous n'avons observé aucune différence statistiquement significative d'intensité de fluorescence normalisée d'Hb glyquée entre les GR non dense et les GR dense, les ratios étant tous proches de 1, que ce soit sur les 10% ou les 5% de GR les plus âgés. Ces résultats sont en faveur d'une hétérogénéité de population dans les GR denses de patients atteintes de drépanocytose. D'une manière globale, ces GR denses sont moins âgés que les GR non denses. En revanche, l'analyse des GR les plus âgés dans chaque sous population (non denses et denses) montre une accumulation de GR possédant des quantités d'HbF (>10 pg) inhibitrice de la polymérisation de l'HbS qui vivent aussi longtemps que les GR non dense avec la même quantité d'HbF. Ces analyses démontrent la présence concomitante dans les GR denses, de GR qui possèdent peu d'HbF et qui sont majoritairement peu âgés, et en plus faible proportion, de GR à forte teneur en HbF (>10 pg) et âgés.

Discussion

36. Etape de validation : Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux est un marqueur d'âge relatif des globules rouges.

36.1. L'augmentation de de l'Hb glyquée dans les GR est linéaire en fonction du temps

36.2. L'augmentation de l'Hb glyquée est corrélée à la durée de vie des GR.

37. Etape de validation de la robustesse de la méthode : l'hémoglobine glyquée mesurée par cytométrie en flux est capable d'évaluer l'âge relatif de plusieurs sous-populations de GR chez le même individu.

38. Etape d'application de la méthode chez les patients SS

38.1. Ages relatifs réduits des GR et des réticulocytes des patients SS

38.2. Allongement de l'âge relatif des GR-SS par le traitement à l'hydroxyurée

38.2.1. Augmentation du nombre de GR-SS contenant des teneurs élevées en HbF et diminution du pourcentage de GR pauvres en HbF par l'hydroxyurée.

38.2.2. Allongement de l'âge relatif des GR-SS par HU via l'augmentation du taux d'HbF et aussi par des mécanismes indépendants de l'augmentation du pourcentage d'HbF.

38.3. Allongement de l'âge relatif de la sous-population de GR-SS riches en HbF

38.4. Allongement croissant de l'âge relatif des GR-SS par des teneurs croissantes en HbF.

38.5. L'âge relatif des GR-SS denses et non denses.

39. Avantages et inconvénients de la méthode d'évaluation d'âge relatif par la mesure de l'HbA1c en cytométrie en flux.

39.1. Points forts de notre méthode d'évaluation d'âge relatif des GR.

39.2. Points forts de notre méthode d'évaluation d'âge relatif des GR

Chapitre VII : Discussion

L'une des caractéristiques de la drépanocytose est l'anémie hémolytique chronique, une diminution de la concentration d'Hb d'un patient due à un déséquilibre entre l'apport et l'élimination de l'Hb dans la circulation. Ce déséquilibre traduit un dysfonctionnement dans les mécanismes de l'homéostasie contrôlant le ratio production/destruction des GR. La raison principale de ce déséquilibre est la déplétion prématurée des GR déclenchée essentiellement par l'hémolyse des GR-SS fragilisés par les polymères de l'HbS. Le résultat de cette élimination précoce des GR est une durée de vie cellulaire réduite. La durée de vie des GR fait référence à la durée pendant laquelle les GR survivent dans la circulation après avoir été libérés de la moelle osseuse.

La sévérité de la drépanocytose est atténuée notamment par l'HbF dotée d'un effet anti-polymérisant de l'HbS et caractérisée par une distribution bien souvent hétérogène et une quantité variable au sein de la population des GR drépanocytaires. Les travaux de Franco et al. (2006) (Franco et al. 2006) ont montré que l'HbF a un impact positif sur la durée de vie des GR-SS.

Cependant, une quantification précise du lien qui existe entre la quantité d'HbF et l'étendu de l'allongement de la durée de vie de chaque GR est limitée par l'absence d'un moyen simple d'application, rapide et non invasif de mesure de la durée de vie des GR à l'échelle de la cellule unique. En effet, la seule méthode de mesure de la durée de vie des GR capable d'analyser cellule-par-cellule est celle de la biotine basée sur l'analyse et la quantification des GR marqués par cytométrie en flux. Toutefois, cette technique présente quelques inconvénients (la durée nécessaire pour le suivi des GR biotinylés qui varie entre quelques semaines à quelques mois, la manipulation des GR marqués en ex-vivo avant leur réinjection chez l'individu et l'état d'équilibre hématologique qui doit être maintenu pendant toute la période de mesure, car toute fluctuation peut être altérer la durée de vie détectée) qui la rendent peu pratique pour la recherche sur les animaux et les applications cliniques (Donald M. Mock et al. 2014).

Dans le présent travail, nous avons développé une nouvelle méthode qui a pour objectif i) d'évaluer l'âge relatif des GR et ii) d'estimer l'étendu d'allongement de la survie des GR drépanocytaires circulants par l'HbF. Notre méthode est basée sur l'utilisation de l'Hb glyquée intracellulaire mesurée à l'échelle de la cellule unique par cytométrie en flux après fixation et perméabilisation des GR. Puisque, selon nos résultats (figure 88) et ceux de Bunn et ses collaborateurs (1976), la quantité d'Hb glyquée augmente dans les GR en fonction du temps et que cette augmentation est en corrélation avec la durée de vie des GR circulants, la mesure de la quantité d'Hb glyquée par GR constitue un indicateur d'âge des GR chez les sujets non diabétiques.

Le développement de notre méthode d'évaluation de l'âge relatif des GR a été effectué en trois étapes : 1) validation par différentes approches de l'utilisation de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux comme marqueur d'âge relatif des GR, 2) vérification de la robustesse de la méthode et de sa capacité à évaluer l'âge relatif de plus d'une sous-population de GR chez le même individu, et en fin 3) son application chez les patients atteints de la drépanocytose pour l'évaluation de l'âge relatif des GR-SS et la quantification de l'effet bénéfique de la teneur en HbF sur l'allongement de l'âge relatif de chaque GR-SS.

36. Etape de validation : l'hémoglobine glyquée mesurée par cytométrie en flux est un marqueur d'âge relatif des globules rouges.

Il est important à noter que la considération de l'HbA1c, quantifiée avec les méthodes biochimiques classiques, comme un éventuel indicateur d'âge des GR a été déjà abordée depuis l'étude de Bunn et al. (1976) après avoir constaté la formation continue et relativement linéaire in vivo de l'HbA1c au cours de la durée de vie des GR et la diminution de la teneur en HbA1c dans les GR des patients souffrant d'anémie hémolytique et d'une durée de vie érythrocytaire réduite environ la moitié de celle des individus sains. L'utilisation de l'HbA1c comme marqueur d'âge a été ensuite validée par le marquage au ⁵¹Cr dans l'étude de Panzer et al.(1982). Plus tard, l'HbA1c a été utilisée conjointement avec les méthodes de séparation des cellules in vitro pour confirmer l'âge des différentes fractions de GR ou avec d'autres méthodes de marquage in vivo telles que la biotine (Cohen et al., 2008).

La nouveauté apportée par notre méthode est l'utilisation de la cytométrie en flux pour mesurer la teneur intracellulaire en HbA1c. Cette mesure est effectuée à l'échelle de la cellule unique, ce qui permet de séparer les GR en plusieurs sous-populations d'âges différents en se basant seulement sur l'HbA1c. En outre, la technique de cytométrie est capable de suivre/d'analyser/de quantifier simultanément plusieurs propriétés et caractéristiques du GR par cellule (HbS/HbA1c, HbF/CD71+, HbF/HbA1c, CD71+/HbA1c en l'occurrence), ce qui convient et répond notamment à notre deuxième objectif fixé consistant à étudier le lien entre la quantité d'Hb glyquée et la quantité d'HbF par GR.

Tout comme l'HbA1c mesurée par HPLC, l'HbA1c mesurée par cytométrie en flux a été validée comme marqueur d'âge relatif des GR dans notre étude. Cette confirmation a été démontrée par plusieurs approches menées sur de l'Hb glyquée in vitro ou in vivo et sur des GR fractionnés sur un gradient de densité.

36.1. L'augmentation de la glycation de l'Hb dans les globules rouges est linéaire en fonction du temps

Nos résultats concernant l'augmentation de la glycation de l'Hb in vitro de manière continue et linéaire en fonction du temps rejoignent ceux obtenus in vivo, chez l'Homme, avec les

marquages par le fer radioactif (Haney and Bunn, 1976) et à la biotine (Cohen et al., 2008). Les travaux de Panzer et al. (1982) en revanche ont montré que la relation entre les taux d'Hb glyquée et la survie des GR mesurée par le ^{51}Cr peut être représentée par une régression linéaire avec abscisse logarithmique ou par un modèle monexponentiel, cependant, les sommes des carrés résiduels étaient plus élevées dans ce dernier (Panzer et al., 1982).

36.2. L'augmentation de l'Hb glyquée est corrélée à la durée de vie des globules rouges

HbA1c in vivo. La teneur en Hb glyquée mesurée par notre méthode dans les GR matures était 8 fois plus importante de celle des réticulocytes, confirmant que les valeurs de l'Hb glyquée dépendent de l'âge des GR. Chez le sujet sain, les cellules érythroïdes dépourvues de leur noyau sortent de la moelle osseuse et migrent vers la circulation où elles survivent entre 1 à 3 jours sous forme de réticulocytes avant de se transformer en GR matures. Le taux d'Hb glyquée des réticulocytes correspondant à 1/8 du taux d'Hb glyquée moyen des GR matures représente le taux de glycation de l'Hb des GR normaux dans la circulation durant 1 à 3 jours. Nos résultats concernant les réticulocytes semblent être concordants avec ceux de Cohen et al. (2008) qui ont montré que la teneur en HbA1c dans les TfR(+)/CD71+ isolés après le marquage à la biotine était à la fois inférieure à celle prévue par l'extrapolation de l'évolution temporelle de la glycation au temps zéro mais supérieure à celle à laquelle nous pourrions s'attendre en comparant la durée de vie circulante des GR à la durée de la glycation .

HbA1c dans les fractions de GR de densité différente. L'augmentation des valeurs en Hb glyquée dans l'ordre croissant de densité de 4 fractions de GR reflétant leur stade de vieillissement a été obtenue aussi bien avec notre méthode qu'avec la méthode contrôle (HPLC), indiquant que plus le GR vieillit dans la circulation, plus son Hb se glyque. Ces résultats sont en cohérence avec ceux des études de Elseweidy et Abraham. (1984) et Bosch et al. (1992) qui ont également suivi l'évolution de l'HbA1c mesurée par des méthodes classiques telles que la chromatographie d'affinité et l'HPLC respectivement dans des fractions de GR générées aussi *via* le fractionnement sur gradient de densité.

Dans cette partie de validation de notre méthode, nous avons utilisé le fractionnement des GR par densité pour générer des sous-populations de GR d'âge progressivement croissant sur lesquelles nous avons voulu démontrer l'augmentation séquentielle et graduelle correspondante des valeurs de l'HbA1c. Bien que la méthode de fractionnement sur gradient de densité de Percoll soit une technique qui est largement utilisée, notamment vue les caractéristiques du Percoll contribuant à maintenir une morphologie cellulaire normale des GR, néanmoins, il semble que la densité érythrocytaire ne varie pas de manière uniforme et monotone au cours du vieillissement des GR circulants. En effet, individuellement sur plusieurs de nos échantillons de GR-AA fractionnés, nous avons remarqué souvent qu'il n'existe pas une différence dans les données brutes entre la F3 et la F4 et parfois même entre la F2, la F3 et la

F4. Dans la littérature, la problématique de densité cellulaire qui ne corrèlerait pas avec l'âge des GR a été soulevée par plusieurs études : les études d'hypertransfusion chez le rat (Ganzoni et al., 1971), l'étude de marquage de GR par le fer chez le lapin (Piomelli et al., 1967) et l'étude à la biotine chez l'Homme (Franco 2012). Tous ces travaux ont indiqué que la densité des GR varie essentiellement durant la première moitié de leur durée de vie (les 4 premières semaines pour l'étude à la biotine), mais elle varie peu ou pas du tout durant l'autre moitié. Ces résultats pourraient être expliqués entre autres par le phénomène d'inversion de la densité terminale des GR vieillissants (*Terminal Density Reversal phenomenon, TDR*) décrit dans les GR humains par Bookchin et al. (2000) et qui consiste à la capacité de certains GR âgés à résister à la déshydratation liée au vieillissement physiologique en regagnant du sodium (Bookchin et al., 2000). Ce phénomène permettrait aux GR de gonfler et de se positionner, lors du fractionnement par densité, dans la fraction la plus légère avec les GR les plus jeunes. Pour remédier à cet obstacle, des chercheurs ont proposé de séparer les GR en fonction d'un autre marqueur de sénescence comme le volume ou en combinant deux méthodes de séparation des GR telles que le fractionnement par densité combiné à l'élutriation (fractionnement par volume) (Clark, 1988).

Inconvénient des méthodes de séparation in vitro. Il est important à noter que la plupart des techniques de séparation des GR sur la base de différences de propriétés physiques, y compris la méthode de densité, ont un inconvénient majeur en commun qui consiste à donner des fractions de GR avec un petit nombre de GR dans chaque fraction.

En dépit des questions soulevées sur le degré de corrélation entre la densité des GR et leur âge et sur les difficultés techniques liées à l'utilisation de la méthode de densité, nos résultats concernant les caractéristiques utilisées pour juger l'efficacité du fractionnement (CCMH et déformabilité par osmoscan) et pour vérifier le lien entre la densité et l'âge des GR-AA (activités des enzymes) sont globalement similaires à ce qui a été rapporté dans la littérature.

Indices érythrocytaires. Nos résultats obtenus pour l'augmentation de la CCMH, la diminution du VGM et la TCMH qui reste constante en fonction de la densité des GR concordent avec ceux de Cohen et al. (1976) et de Salvo et al. (1982), deux études qui ont fractionné les GR d'individus sains en 6 fractions et 5 fractions respectivement en utilisant le Percoll. Dans les études séparant les GR en fonction du volume ou une combinaison de deux méthodes (densité-volume), les mêmes résultats sont obtenus pour la CCMH et le VGM. Cependant, une diminution de la TCMH a été observée et expliquée par le phénomène de vésiculation qui se produit lors du vieillissement des GR (Bosch et al., 2009).

Déformabilité. Notre choix de technique de mesure de la déformabilité des GR dans les différentes fractions a été porté sur l'ektacytométrie en gradient d'osmolarité pour sa capacité à nous fournir des informations sur les modifications du rapport S/V et de la viscosité

intracellulaire résultant des changements dans la CCMH. Les résultats obtenus des GR de 2 sujets sains ont montré que malgré le shift vers la gauche de la viscosité cytoplasmique des fractions les plus denses suivant l'état de déshydratation des GR, la déformabilité maximale (Elmax) et la fragilité osmolaire ne semblent pas être affectées par le processus de vieillissement des GR-AA issus du fractionnement sur gradient de densité. Dans l'étude de Bosch et al. (1994), sur des GR de 5 donneurs sains fractionnés sur Percoll, les auteurs ont noté des différences au niveau des paramètres Ohyper ainsi qu'Elmax entre les 4 fractions. Toutefois, comme pour nos résultats, aucun changement de ratio S/V n'a été observé entre ces différentes fractions de GR. En revanche, avec la séparation des GR par la combinaison de deux méthodes (densité-volume), un changement au niveau du rapport S/V a été constaté (Bosch et al., 2009).

Activités des protéines enzymatiques du métabolisme des GR. La diminution des activités enzymatiques de 3 enzymes du métabolisme du GR (HK, PK et G6PD) que nous avons quantifiées et les différences statistiques détectées notamment entre la F1 et la F4 sont les résultats obtenus dans notre travail qui concordent avec les résultats rapportés par plusieurs études décrivant l'existence d'un certain degré de vieillissement moléculaire des enzymes de GR, en particulier les enzymes de la glycolyse, au cours de sa durée de vie (Seaman et al., 1980 ; Salvo et al., 1982 ; Haram et al., 1991 ; Zimran et al., 1990). Selon Seaman et al. (1980), ce vieillissement moléculaire des enzymes glycolytiques pourrait être à l'origine de la déclinaison progressive des capacités métaboliques des GR menaçant leur intégrité structurale lors de la sénescence (Haney and Bunn, 1976)

Activités des enzymes du métabolisme vs. âge des GR. L'utilisation des activités des enzymes du métabolisme pour relier la densité à l'âge des GR a soulevé deux problématiques : i) Bien que le modèle de déclinaison des activités des enzymes métaboliques du GR ne soit pas complètement élucidé, il semble que leur diminution n'est pas linéaire au cours du processus de vieillissement. Dans l'étude de Seaman et al. (1980), il a été montré que les activités maximales des enzymes glycolytiques des GR fractionnés en fonction de leur densité sur un gradient d'albumine ou d'arabinogalactane diminuent selon un modèle exponentiel avec l'âge des GR. Cependant, dans les expériences de Haram et al. (1991) sur des GR séparés sur un gradient de densité, la diminution de l'HK s'est avérée biphasique contrairement à celle de la PK qui était uniphasique. Le modèle biphasique est expliqué par la maturation réticulocytes-GR matures. ii) la deuxième problématique réside au niveau de la demi-vie ($t_{1/2}$) de la majorité des enzymes glycolytiques du GR qui est supérieure à la durée de vie des GR. Seulement 3 enzymes font l'exception à cette règle : HK (33 jours), PK (29 jours) et l'aldolase (77 jours) (Seaman et al., 1980). Pour notre étude, le choix des enzymes était judicieux sauf pour la G6PD même si les résultats semblent être aussi cohérents que ceux de 2 autres enzymes.

37. Etape de validation de la robustesse de la méthode : l'hémoglobine glyquée mesurée par cytométrie en flux est capable d'évaluer l'âge relatif de plus d'une population de GR chez le même individu.

L'objectif premier de notre travail était de développer une méthode pour évaluer l'âge relatif des GR de patients drépanocytaires. Ces derniers sont caractérisés par la présence de sous-populations de GR-SS différentes dans leur sang. Avant d'appliquer notre méthode, préalablement validée, sur les GR de patients SS, nous avons d'abord testé sa robustesse chez les patients SS transfusés ayant également dans leur sang deux sous-populations de GR (GR-AA transfusés et GR-SS autologues) qui peuvent être discriminées sans aucune ambiguïté en utilisant un anticorps anti- β^S .

Dans la littérature, la durée de vie des GR-SS rapportée par une étude menée chez les GR humains marqués à la biotine varie entre 2 à 6 semaines (Rhodes et al. 2016). Ces résultats concordent avec les nôtres puisque la quantité d'Hb glyquée était d'environ 4 fois plus faible dans les GR-SS autologues que dans les GR-AA transfusés, ce qui signifie que la durée de vie des GR-SS déterminée avec notre méthode serait de 4 semaines si nous considérons que la durée de vie des GR-AA est théoriquement fixée à 16 semaines (120 jours).

La force de précision de notre méthode provient de l'utilisation de la cytométrie en flux comme technique d'analyse. D'autres méthodes comme la cytométrie d'image par fluorescence (*Fluorescence Image Cytometry*) qui peut éventuellement être utilisée également pour mesurer la fluorescence émise par les GR marqués via une méthode d'immunofluorescence reflétant la quantité d'Hb glyquée dans chaque GR. Cependant, cette méthode est chronophage et nécessite un savoir-faire.

38. Etape d'application de la méthode chez les patients SS

Dans l'étape précédente, nous avons démontré que notre nouvelle méthode, en plus qu'elle est capable de suivre l'âge relatif de plus d'une sous-population de GR chez le même individu, elle est précise puisqu'elle a abouti à un résultat similaire à celui de la mesure de la durée de vie des GR (la biotine).

38.1. Ages relatifs réduits des GR et des réticulocytes des patients SS

La première application de notre méthode chez les patients SS a consisté à évaluer les âges relatifs de leurs GR ainsi que de leurs réticulocytes (cellules CD71+) et de les comparer à ceux du groupe contrôle (GR-AA). La réduction drastique de la durée de vie relative des GR de patients SS non transfusés a confirmé les résultats obtenus chez les patients SS transfusés et ceux rapportés dans la littérature par l'étude de Franco et al. (2006) puisque le ratio entre l'âge relatif des GR de patients SS et celui des GR de donneurs sains est d'environ 1/3 (qui est

équivalent à 6 semaines environ si nous estimons à 120 jours ou 6 semaines la durée de vie théorique des GR de donneurs sains).

L'avantage que confère la cytométrie de flux dans l'analyse simultanée de plusieurs antigènes cellulaires nous a permis d'évaluer la durée de vie relative également des cellules CD71+. Cette dernière tend, chez les patients SS, à être plus faible que dans le groupe contrôle. Pour tenter d'interpréter ce résultat, nous avons émis deux hypothèses qui supposent soit une maturation accélérée dans la circulation, soit une libération précoce de la moelle osseuse. La première hypothèse n'a pas pu être vérifiée car aucune étude abordant cette problématique n'a été retrouvée dans la littérature. Cependant, pour la seconde hypothèse, l'érythropoïèse de stress semble être capable d'expliquer de telle situation. En effet, l'érythropoïèse de stress, après une hémolyse par exemple, augmente le nombre de réticulocytes circulants. Ce transit accru des réticulocytes modifie la population de réticulocytes circulants vers des stades plus immatures. L'immaturité des réticulocytes est démontrée par une augmentation de la taille des cellules, de la coloration de la réticuline, de l'absorption du fer, et de l'activité des transporteurs ioniques membranaires. Les réticulocytes immatures circulants produits lors d'un stress érythropoïétique ont besoin du même temps total pour la maturation que les autres réticulocytes immatures normaux qui ne sont pas libérés précocement de la moelle osseuse (Rhodes et al., 2016).

38.2. Allongement de l'âge relatif des GR-SS par le traitement à l'hydroxyurée

La deuxième application de notre méthode était de vérifier si l'âge relatif des GR-SS était modifié quand les patients inclus étaient sous traitement à l'HU. Nos résultats obtenus de la comparaison entre le groupe de patients SS avec HU et celui sans HU ont montré qu'effectivement que l'utilisation de l'HU chez les patients SS permet l'augmentation du taux d'HbF et l'allongement de l'âge relatif des GR-SS. Pour aller plus loin dans notre analyse, nous avons cherché à comprendre et à déterminer les mécanismes par lesquels l'HU exerce ces effets bénéfiques (l'augmentation du % d'HbF et l'allongement de la durée de vie des GR) chez les patients SS. Pour précision, nous avons déjà une piste connue pour l'augmentation du taux d'HbF par GR par l'HU, définie à partir des travaux de recherche menés au sein de notre équipe par Hébert et al.

38.2.a. Augmentation du nombre de GR-SS contenant des teneurs élevées en HbF et diminution du pourcentage de GR pauvres en HbF par l'hydroxyurée.

Dans la littérature, il a été rapporté que les taux d'HbF chez les patients drépanocytaires représentent les contributions de trois processus mutuellement indépendants : la production de cellules F, la biosynthèse de l'HbF au sein des cellules F et la survie préférentielle des cellules F (Dover et al., 1978). Aujourd'hui, nous savons que les deux premiers processus sont induits par l'HU. Pour vérifier si l'HU contribue d'une manière directe ou indirecte, au troisième processus,

la survie préférentielle des cellules F, nous avons analysé la distribution quantitative de l'HbF pour les GR dans les deux groupes de patients SS, avec ou sans HU, par la méthode d'Hébert et al. déjà établie. Nos résultats de quantification de l'HbF, qui pour rappel consiste à déterminer le pourcentage de GR pour chaque seuil d'HbF/GR, ont montré que l'HU entraîne la diminution du nombre de GR très pauvres en HbF (> 0 pg et < 2 pg), mais en revanche augmente le nombre de GR contenant plus de 8 pg d'HbF. Ces résultats confirment les données obtenus dans l'étude de Hébert et al. (2020) qui ont observé, lors de l'analyse de la distribution de l'HbF chez 14 patients atteints de la drépanocytose avant et pendant le traitement par l'HU, une diminution significative de la population de GR contenant moins de 2 pg d'HbF/GR.

38.2.b. Allongement de l'âge relatif des GR-SS par HU *via* l'augmentation du taux d'HbF et des mécanismes indépendants d'HbF.

Après avoir observé que l'HU permet l'allongement de la durée de vie relative des GR-SS évaluée avec notre méthode d'un côté, et l'augmentation du nombre de GR contenant des teneurs fortes en HbF analysée par la méthode de distribution de l'HbF de l'autre côté, nous nous sommes questionnés quant à l'existence d'un éventuel lien entre les taux d'HbF et l'âge relatif des GR-SS qui serait à l'origine de l'effet d'enrichissement en GR riches en HbF observé lors de l'étude de la distribution d'HbF à l'échelle cellulaire .

Pour pouvoir vérifier l'existence d'un lien entre les taux d'HbF et les quantités d'Hb glyquée traduisant l'âge relatif des GR, nous avons d'abord procédé à la normalisation de l'intensité de fluorescence de l'Hb glyquée dans les GR-SS en retranchant l'intensité de fluorescence liée à l'HbF de l'intensité de fluorescence de l'Hb totale. Cette soustraction permet la prise en compte seulement d'Hb «glyquable», car comme discuté précédemment dans la section introduction – chapitre Hb glyquée, l'HbF ne se glyque pas au niveau du premier acide aminé de l'extrémité N-terminale de la γ -globine pour deux raisons : i) le premier acide aminé de l'extrémité N-terminale de la γ -globine est une glycine différente de la valine (le premier acide aminé de l'extrémité N-terminale de la β -globine), ii) la glycine de l'extrémité N-terminale de la γ -globine subit plutôt de l'acétylation que de la glycation. Pour précision, selon la littérature, l'HbF pourrait être glyquée mais uniquement au niveau des résidus de lysine (Bunn and Forget, 1986). Cette glycation secondaire n'est pas reconnue par l'anticorps utilisé pour cibler et détecter la quantité de l'Hb glyquée par rapport à l'Hb totale. Cela a été confirmé lors de l'analyse de la quantité d'Hb glyquée par cytométrie dans les GR d'un individu manifestant une persistance héréditaire d'HbF homozygote (100%) (Hb glyquée est presque nulle). Cette procédure technique n'a été possible qu'une fois la distribution uniforme de la TCMH dans les tous GR et la quantification de l'HbF dans chaque GR ont été conformées.

L'analyse du lien entre l'âge relatif des GR (après normalisation) et les taux d'HbF a abouti à une parfaite corrélation linéaire confirmant ainsi le lien entre l'allongement de l'âge relatif des

GR-SS et leur teneur en HbF. Nos résultats sont cohérents avec ceux de l'étude de Elseweidy and Abraham. (1984). qui ont rapporté une relation directe et forte entre les valeurs d'HbS glyquée déterminées par la chromatographie Bio-Rex 70 et les taux d'HbF quantifiés par la microchromatographie chez des patients afro-américains atteints de la drépanocytose homozygote ($r= 0,8$). Cependant, nos données ne concordent pas avec les résultats obtenus par (Alayash et al., 1986), qui n'ont pas réussi à mettre en évidence une corrélation significative entre les valeurs de l'HbS glyquée et les taux d'HbF chez les patients drépanocytaires de la province orientale de l'Arabie saoudite dont le pourcentage de l'HbF est en dessous de 10 à 12% ($r= 0,23$).

La pente de linéarité entre l'âge relatif des GR-SS et leur teneur en HbF est identique chez tous les patients SS inclus qu'ils soient sous HU ou pas, ce qui signifie que le traitement par HU augmente l'âge relatif des GR-SS en augmentant leur quantité d'HbF. Toutefois, la détection d'une différence statistiquement significative au niveau des ordonnées à l'origine des deux régressions (avec et sans HU) indique que l'HU prolonge l'âge relatif des GR-SS, pas seulement par l'augmentation du taux d'HbF, mais aussi par d'autres mécanismes HbF-indépendants. En effet, selon (Ballas et la., 1989) qui ont suivi quelques effets bénéfiques de l'HU après 1 an de traitement chez les patients SS, en plus de l'augmentation du taux d'HbF, l'HU augmente le VGM, diminue la CCMH, augmente la teneur en K+, améliore l'état d'hydratation et impacte positivement les propriétés rhéologiques telles que la déformabilité des GR de patients drépanocytaires. Sur le plan clinique, il a été démontré que l'HU prévient la survenue de complications aiguës telles que la crise vaso-occlusive et le syndrome thoracique aiguë (Charache et al., 1995; Steinberg, 2008).

38.3. Allongement de l'âge relatif de la sous-population de GR-SS riches en HbF

La mise en évidence d'un lien fort et positif entre l'âge relatif des GR-SS et leur contenu en HbF, nous a conduit à déterminer l'âge relatif de deux sous-population de GR-SS classées en fonction leur teneur en HbF. Nos résultats ont montré que chez le même patient SS, les GR présentant une forte teneur en HbF survivent plus longtemps que les GR pauvres en HbF. Le rapport d'âge relatif de la sous-population avec une teneur faible en HbF (HbF-low) par rapport à la sous-population avec une forte teneur (HbF-High) était d'environ 2 dans notre cohorte de patients SS. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Franco et al., 1998), qui ont utilisé le marquage à la biotine pour déterminer la survie des cellules F et des cellules non-F (GR-SS avec de l'HbF non détectable par cytométrie en flux) et ont montré que la survie des cellules non-F est d'environ 2 semaines pour la plupart des patients, tandis que les cellules F survivent beaucoup plus longtemps, généralement entre 6 à 8 semaines.

38.4. Allongement croissant de l'âge relatif des GR-SS par des teneurs croissantes en HbF.

Après une vue globale de l'impact positif de l'HbF sur l'âge relatif des GR-SS, nous avons voulu connaître l'effet de chaque étendu (*range* en anglais) d'HbF sur le degré d'allongement de l'âge relatif de chaque GR-SS. Pour ce faire, nous avons d'abord constitué, grâce à la méthode de quantification de l'HbF par cytométrie en flux, des sous-groupes de GR-SS contenant le même étendu d'HbF (≥ 2 ; ≥ 4 ; ≥ 6 ; ≥ 8 ; ≥ 10 pg d'HbF) pour lesquels nous avons déterminé l'âge relatif correspondant. Les données générées de cette expérience ont montré que : i) l'âge relatif de chaque GR s'allonge en fonction de sa quantité en HbF. Plus il y a de l'HbF dans le GR, plus celui-ci survit plus longtemps. ii) Au sein de la population de GR avec de l'HbF détectable, l'âge relatif est influencé par la quantité d'HbF dans chaque GR. Les GR situés à l'extrémité supérieure de la fourchette survivent plus longtemps que les cellules qui se trouvent dans l'extrémité inférieure de la fourchette. Nous pouvons s'attendre à un système où plus une extrémité augmente, plus l'autre extrémité diminue. En effet, dans l'étude de Franco et al. (2006), une corrélation inverse entre la survie des cellules non-F et le pourcentage des GR avec de l'HbF a été mise en évidence chez 2 patients drépanocytaires dont la survie des GR a été suivie par marquage à la biotine. Une des explications de l'influence négative du pourcentage des GR avec de l'HbF détectable dans la circulation sur la durée de vie des cellules non-F est la sensibilité de la surveillance des GR endommagés qui traduit l'état fonctionnel de la rate. En effet, les patients avec de l'HbF élevée peuvent avoir une fonction splénique préservée, ce qui pourrait aider à l'élimination plus rapide des cellules contenant peu ou pas d'HbF (Franco et al., 2006).

Les données obtenues de cette expérience abouti à la même conclusion tirée par Franco et al. (2006) qui consiste au fait que la sous-population de GR avec de l'HbF détectable par cytométrie en flux n'est pas uniforme et que des différences relativement faibles dans la teneur en HbF sont capables de modifier la survie cellulaire.

38.5. L'âge relatif des GR-SS denses et non denses.

Les GR drépanocytaires déplétés en potassium se déshydratent et deviennent anormalement denses. L'augmentation pathologique de leur densité érythrocytaire est importante à la fois pour l'hémolyse et la vaso-occlusion (Franco et al. 2000). L'objectif de cette partie de notre travail est d'analyser la relation entre l'âge relatif, le contenu en HbF et la déshydratation des GR de patients SS non traités par HU. Les mêmes analyses appliquées dans les précédentes expériences ont été effectuée sur les fractions denses et non denses de GR-SS. L'évaluation de l'âge relatif des GR dans les 2 fractions a montré que les GR denses semblent être plus jeunes que les GR non denses. Cependant l'analyse de la distribution de l'HbF n'a révélé aucune différence dans la quantité d'HbF entre les factions quel que soit le seuil d'HbF/GR. Le coefficient de variation de l'intensité de fluorescence normalisée de l'Hb glyquée estimé s'est

avéré plus important dans la fractions dense que dans la fraction non denses indiquant ainsi que la fraction de GR denses est très hétérogène en termes d'âges relatifs cellulaires et qu'elle éventuellement constitué de plusieurs sous-fractions de GR d'âge relatif différent. Pour simplifier l'analyse et s'intéressant uniquement à une seule sous-population de GR dans la fraction dense, nous avons analysé les 10% et les 5% des GR les plus âgés de chaque fraction (dense et non dense). Les résultats obtenus ont montré qu'il n'existe toujours pas de différence d'âge relatif ou de distribution en HbF dans les proportions de GR analysées entre les denses et les non denses. Toutefois, nous avons constaté un nombre appréciable de GR contenant la quantité d'HbF inhibitrice de la polymérisation (> 10 pg d'HbF) dans la proportion des GR denses. L'explication à cette observation pourrait être liée à l'incapacité de l'HbF même à des quantités élevées à protéger les GR lorsqu'ils subissent une déshydratation accentuée.

39. Avantages et inconvénients de la méthode d'évaluation d'âge relatif par la mesure de l'HbA1c en cytométrie en flux.

39.1. Points forts de notre méthode d'évaluation d'âge relatif des GR.

Elle est simple d'application, non invasive et nécessitant uniquement un seul prélèvement sanguin, contrairement aux méthodes standards de mesure de la survie des GR (51Cr et biotine) qui sont invasives, chronophages et exigeant plusieurs prélèvements sur une période de suivi qui peut aller jusqu'à 4 mois.

Elle peut produire des résultats fiables même en dehors de l'état d'équilibre (*steady state*). En effet, il n'y a aucun besoin pour que les paramètres hématologiques restent constants/stables pendant la période de la mesure car en combinaison avec la mesure du taux des réticulocytes, la distinction entre une anomalie de production de GR et une anomalie de destruction prématurée de GR est possible. Dans le cas de la biotine et le 51Cr, le nombre de GR et le volume total du sang respectivement devraient rester inchangeables pendant la période de marquage.

La puissance de notre méthode est liée à l'utilisation de la cytométrie en flux qui permet d'analyser des millions de GR/ seconde et de suivre/ d'évaluer plusieurs sous-population chez le même individu (donneur sain ou patient) avec le ou les marquages adéquats.

Elle est capable directement le taux d'hémolyse contrairement aux marqueur indirects d'hémolyse (LDH, bilirubine) qui sont des sous-produits de dégradation des GR et d'autres types cellulaires (hépatiques, musculaires, etc).

39.2. Points faibles de notre méthode d'évaluation d'âge relatif des GR.

Pour le moment, elle n'est pas applicable chez les diabétiques, les prédiabétiques et les sujets manifestant une persistance héréditaire homozygote.

En cas de splénectomie ou d'une perte de sang (hémorragie, il conviendra d'attendre 4 semaines et 1 semaine respectivement pour que les valeurs de l'Hb glyquée reviennent à la normale (Panzer et al., 1982). Elle est relative, et les résultats ne sont pas exprimés en unité de temps. Cependant, dans l'optique d'une application en routine, nous pourrions s'attendre à un système similaire à celui appliqué dans le test à l'EMA permettant de comparer les mesures obtenues chez les patients avec celles de plusieurs témoins (sujets sains) et de rendre ainsi les résultats sous forme d'un pourcentage de perte de fluorescence par rapport aux contrôles.

Dans le cas des patients drépanocytaires, nous ne disposons pas encore des données sur une éventuelle influence de la polymérisation de l'HbS sur le taux/la vitesse de glycation de l'HbS, la détection et la mesure précise de l'Hb glyquée par les anticorps et sur le processus de déglycation. Nous avons établi un protocole pour vérifier cette hypothèse qui consiste à mesurer de l'Hb glyquée dans les GR-SS désoxygénés quand l'HbS est sous forme de polymères puis à l'état désoxygéné (exposition au CO) lorsque l'HbS est complètement en suspension dans le cytoplasme.

Dans le cas des membranopathies chez les patients drépanocytaires, nous ignorons si les anomalies membranaires sont capables de provoquer la précipitation de l'Hb entraînant ainsi des changements dans le taux de glycation ou des difficultés techniques dans la mesure précise de sa valeur. Pour vérifier, nous pourrions incuber séparément les GR intacts de ces patients ainsi que l'hémolysat des GR dans une solution de glucose et mesurer les valeurs de l'Hb glyquée dans les deux cas.

Conclusion

Conclusion

Nous concluons à partir de toutes les données présentées dans ce travail que la détermination de l'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux peut, à condition que le diabète sucré puisse être exclu, servir de marqueur d'âge relatif des GR.

La méthode développée dans cette étude fournit un outil de simple utilisation, rapide et fiable d'évaluation d'âge relatif d'une population ou de plusieurs sous-populations de GR chez le même individu.

L'application de notre méthode dans le contexte de la drépanocytose a permis de confirmer les résultats des autres méthodes de mesure de la durée de vie des GR (la biotine notamment).

Cette nouvelle méthode d'évaluation d'âge relatif des GR peut être utile pour :

- Evaluer directement le taux d'hémolyse chez les patients atteints d'anémies hémolytiques comme les patients manifestant des déficits enzymatiques héréditaires du globules rouges (déficit en glucose-6-déshydrogénase) par exemple.
- Suivre l'efficacité des traitements qui sont déjà sur le marché, ou en cours de validation dans les essais cliniques (Voxelotor, Etavopivat, Mitapivat : molécules en cours de validation clinique qui semblent augmenter le taux d'Hb et donc allonger la durée de vie des GR).
- Juger l'efficacité de la thérapie génique en drépanocytose qui génère des sous-populations de GR plus ou moins protégées par l'Hb thérapeutique.
- Cribler de nouvelles molécules et stratégies thérapeutiques visant à augmenter la durée de vie des GR.

L'amélioration de notre méthode pour qu'elle puisse exprimer les résultats en unité de temps pourrait rendre inutile les études de marquage des GR chez certains patients non diabétiques.

Bibliographie

- Abraham, Allistair A., and John F. Tisdale. 2021. "Gene Therapy for Sickle Cell Disease: Moving from the Bench to the Bedside." *Blood* 138 (11): 932–41. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003776>.
- Abraham, E. C., B. F. Cameron, A. Abraham, and M. Stallings. 1984. "Glycosylated Hemoglobins in Heterozygotes and Homozygotes for Hemoglobin C with or without Diabetes." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 104 (4): 602–9.
- Abraham, E.C. 1981. "Glycosylated Minor Components of Human Fetal Hemoglobin." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 667 (1): 168–76. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(81\)90077-5](https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90077-5).
- Abraham, E.C., M. Stallings, B.F. Cameron, and T.H.J. Huisman. 1980. "Minor Hemoglobins in Sickle-Cell Heterozygotes and Homozygotes with and without Diabetes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 625 (1): 109–17. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(80\)90113-0](https://doi.org/10.1016/0005-2795(80)90113-0).
- Agrawal, Rohit Kumar, Rakesh Kantilal Patel, Varsha Shah, Lalit Nainiwal, and Bhadra Trivedi. 2014. "Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review." *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion* 30 (2): 91–96. <https://doi.org/10.1007/s12288-013-0261-4>.
- Ahmed, Mostafa H., Mohini S. Ghatge, and Martin K. Safo. 2020. "Hemoglobin: Structure, Function and Allostery." In *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and Other Body Fluid Proteins*, edited by Ulrich Hoeger and J. Robin Harris, 94:345–82. Subcellular Biochemistry. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14.
- Akinsheye, Idowu, Abdulrahman Alsultan, Nadia Solovieff, Duyen Ngo, Clinton T. Baldwin, Paola Sebastiani, David H. K. Chui, and Martin H. Steinberg. 2011. "Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia." *Blood* 118 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-325258>.
- Alayash, A.I., A. Dafallah, H. Al-Husayni, A.K. Al-Ali, A. Al-Quorain, A.H.S. Omer, M.T. Wilson, J. Bonaventura, and R. Cashon. 1986. "Glycosylated Hemoglobin Levels in a Benign Form of Sickle Cell Anemia in Saudi Arabia." *Acta Haematologica* 75 (3): 160–64. <https://doi.org/10.1159/000206111>.
- Aldrich, T. K., S. K. Dhuper, N. S. Patwa, E. Makolo, S. M. Suzuka, S. A. Najeebi, S. Santhanakrishnan, R. L. Nagel, and M. E. Fabry. 1996. "Pulmonary Entrapment of Sickle Cells: The Role of Regional Alveolar Hypoxia." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 80 (2): 531–39. <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.80.2.531>.
- Allen, David W., W. A. Schroeder, and Joan Balog. 1958. "Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content." *Journal of the American Chemical Society* 80 (7): 1628–34. <https://doi.org/10.1021/ja01540a030>.
- Ashby, W. 1919. "THE DETERMINATION OF THE LENGTH OF LIFE OF TRANSFUSED BLOOD CORPUSCLES IN MAN." *The Journal of Experimental Medicine* 29 (3): 267–81. <https://doi.org/10.1084/jem.29.3.267>.
- . 1948. "The Span of Life of the Red Blood Cell; a Resume." *Blood* 3 (5): 486–500.
- Aye, M., S. Sastry, and P. Derbyshire. 2014. "G248(P) Growth Pattern in Sickle Cell Disease (SCD) Children." *Archives of Disease in Childhood* 99 (Suppl 1): A107–8. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306237.245>.
- Back, Djuna Z. de, Elena B. Kostova, Marian van Kraaij, Timo K. van den Berg, and Robin van Bruggen. 2014. "Of Macrophages and Red Blood Cells; a Complex Love Story." *Frontiers in Physiology* 5: 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00009>.
- Badior, Katherine E., and Joseph R. Casey. 2018. "Molecular Mechanism for the Red Blood Cell Senescence Clock: MOLECULAR MECHANISM FOR THE RBC SENESCENCE CLOCK." *IUBMB Life* 70 (1): 32–40. <https://doi.org/10.1002/iub.1703>.

- Bailey, K, J S Morris, P Thomas, and G R Serjeant. 1992. "Fetal Haemoglobin and Early Manifestations of Homozygous Sickle Cell Disease." *Archives of Disease in Childhood* 67 (4): 517–20. <https://doi.org/10.1136/adc.67.4.517>.
- Ballas, S. K., G. J. Dover, and S. Charache. 1989. "Effect of Hydroxyurea on the Rheological Properties of Sickle Erythrocytes in Vivo." *American Journal of Hematology* 32 (2): 104–11. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830320206>.
- Bartolucci, Pablo, Carlo Brugnara, Armando Teixeira-Pinto, Serge Pissard, Kamran Moradkhani, H el ene Jouault, and Frederic Galacteros. 2012. "Erythrocyte Density in Sickle Cell Syndromes Is Associated with Specific Clinical Manifestations and Hemolysis." *Blood* 120 (15): 3136–41. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-424184>.
- Bentley, S. A., H. I. Glass, S. M. Lewis, and L. Szur. 1974. "Elution Correction in ⁵¹Cr Red Cell Survival Studies." *British Journal of Haematology* 26 (2): 179–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1974.tb00461.x>.
- Benz, Jr., Edward J., Nancy Berliner, and Fred J. Schiffman, eds. 2017. *Anemia: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. 1st ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108586900>.
- Berlin, Nathaniel I. 1964. "Determination of Red Blood Cell Life Span." *JAMA* 188 (4). <https://doi.org/10.1001/jama.1964.03060300037009>.
- Beutler, E., K. G. Blume, J. C. Kaplan, G. W. L ohr, B. Ramot, and W. N. Valentine. 1977. "International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis." *British Journal of Haematology* 35 (2): 331–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1977.tb00589.x>.
- Bhoopalan, Senthil Velan, Lily Jun-shen Huang, and Mitchell J. Weiss. 2020. "Erythropoietin Regulation of Red Blood Cell Production: From Bench to Bedside and Back." *F1000Research* 9 (September): F1000 Faculty Rev-1153. <https://doi.org/10.12688/f1000research.26648.1>.
- Bogdanova, Anna, Lars Kaestner, Greta Simionato, Amittha Wickrema, and Asya Makhro. 2020. "Heterogeneity of Red Blood Cells: Causes and Consequences." *Frontiers in Physiology* 11: 392. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00392>.
- Bonnefond, Am elie, Martine Vaxillaire, Yann Labrune, C ecile Lecoeur, Jean-Claude Ch evre, Nabila Bouatia-Naji, St ephane Cauchi, et al. 2009. "Genetic Variant in *HK1* Is Associated With a Proanemic State and A1C but Not Other Glycemic Control-Related Traits." *Diabetes* 58 (11): 2687–97. <https://doi.org/10.2337/db09-0652>.
- Bookchin, Robert M., Zipora Etzion, Martin Sorette, Narla Mohandas, Jeremy N. Skepper, and Virgilio L. Lew. 2000. "Identification and Characterization of a Newly Recognized Population of High-Na⁺, Low-K⁺, Low-Density Sickle and Normal Red Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (14): 8045–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.130198797>.
- Bookchin, Robert M., and Paul M. Gallop. 1968. "Structure of Hemoglobin Alc: Nature of the N-Terminal β Chain Blocking Group." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 32 (1): 86–93. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90430-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90430-0).
- Bosch, F. H., J. M. Werre, L Schipper, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, T. Huls, F.L.A. Willekens, G. Wichers, and M. R. Halie. 2009. "Determinants of Red Blood Cell Deformability in Relation to Cell Age." *European Journal of Haematology* 52 (1): 35–41. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1994.tb01282.x>.
- Bosman, Giel J. C. G. M. 2013. "Survival of Red Blood Cells after Transfusion: Processes and Consequences." *Frontiers in Physiology* 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00376>.
- Bou-Fakhredin, Rayan, Lucia De Franceschi, Irene Motta, Maria Domenica Cappellini, and Ali T. Taher. 2022. "Pharmacological Induction of Fetal Hemoglobin in β -Thalassemia and Sickle Cell Disease: An Updated Perspective." *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 15 (6): 753. <https://doi.org/10.3390/ph15060753>.
- Brown, Karen A. 1996. "Erythrocyte Metabolism and Enzyme Defects." *Laboratory Medicine* 27 (5): 329–33. <https://doi.org/10.1093/labmed/27.5.329>.
- Brownlee, M.D, Michael. 1995. "ADVANCED PROTEIN GLYCOSYLATION IN DIABETES AND AGING." *Annual Review of Medicine* 46 (1): 223–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.46.1.223>.

- Bruggen, R. van. 2013. "CD47 Functions as a Removal Marker on Aged Erythrocytes." *ISBT Science Series* 8 (1): 153–56. <https://doi.org/10.1111/voxs.12038>.
- Brugnara, Carlo. 2018. "Sickle Cell Dehydration: Pathophysiology and Therapeutic Applications." Edited by P. Connes. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 68 (2–3): 187–204. <https://doi.org/10.3233/CH-189007>.
- Bry, Lynn, Philip C Chen, and David B Sacks. 2001. "Effects of Hemoglobin Variants and Chemically Modified Derivatives on Assays for Glycohemoglobin." *Clinical Chemistry* 47 (2): 153–63. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.2.153>.
- Bryk, Agata H., and Jacek R. Wiśniewski. 2017. "Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome." *Journal of Proteome Research* 16 (8): 2752–61. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00025>.
- Bunn, H F, D N Haney, S Kamin, K H Gabbay, and P M Gallop. 1976. "The Biosynthesis of Human Hemoglobin A1c. Slow Glycosylation of Hemoglobin in Vivo." *Journal of Clinical Investigation* 57 (6): 1652–59. <https://doi.org/10.1172/JCI108436>.
- Bunn, H., and Forget. 1986. "Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects." *Annals of Internal Medicine* 105 (5): 820. https://doi.org/10.7326/0003-4819-105-5-820_2.
- Bunn, H. Franklin, and Paul J. Higgins. 1981. "Reaction of Monosaccharides with Proteins: Possible Evolutionary Significance." *Science* 213 (4504): 222–24. <https://doi.org/10.1126/science.12192669>.
- Bunn, H. Franklin, David N. Haney, Kenneth H. Gabbay, and Paul M. Gallop. 1975. "Further Identification of the Nature and Linkage of the Carbohydrate in Hemoglobin A1c." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 67 (1): 103–9. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(75\)90289-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(75)90289-2).
- Burger, Patrick, Dirk de Korte, Timo K. van den Berg, and Robin van Bruggen. 2012. "CD47 in Erythrocyte Ageing and Clearance - the Dutch Point of View." *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie* 39 (5): 348–52. <https://doi.org/10.1159/000342231>.
- Camargo, Joiza L., Jonathas Stiff, and Jorge L. Gross. 2006. "The Effect of Aspirin and Vitamins C and E on HbA1c Assays." *Clinica Chimica Acta* 372 (1–2): 206–9. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.031>.
- Campanella, M. Estela, Haiyan Chu, and Philip S. Low. 2005. "Assembly and Regulation of a Glycolytic Enzyme Complex on the Human Erythrocyte Membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (7): 2402–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409741102>.
- Campbell, Leon, Tessa Pepper, and Kate Shipman. 2019a. "HbA1c: A Review of Non-Glycaemic Variables." *Journal of Clinical Pathology* 72 (1): 12–19. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204755>.
- . 2019b. "HbA1c: A Review of Non-Glycaemic Variables." *Journal of Clinical Pathology* 72 (1): 12–19. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204755>.
- Castro, O., G. W. Osbaldiston, L. Aponte, R. Roth, J. Orlin, and S. C. Finch. 1976. "Oxygen-Dependent Circulation of Sickle Erythrocytes." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 88 (5): 732–44.
- Caulier, Alexis, Elodie Drumez, Jordan Gauthier, Marie Robin, Didier Blaise, Yves Beguin, Mauricette Michallet, et al. 2019. "Scoring System Based on Post-Transplant Complications in Patients after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Myelodysplastic Syndrome: A Study from the SFGM-TC." *Current Research in Translational Medicine* 67 (1): 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2018.08.003>.
- Cavagnoli, Gabriela, Ana Laura Pimentel, Priscila Aparecida Correa Freitas, Jorge Luiz Gross, and Joiza Lins Camargo. 2017. "Effect of Ethnicity on HbA1c Levels in Individuals without Diabetes: Systematic Review and Meta-Analysis." Edited by Raghil Ali. *PLOS ONE* 12 (2): e0171315. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171315>.
- Chandalia, H. B., and P. R. Krishnaswamy. 2002. "Glycated Hemoglobin." *Current Science* 83 (12): 1522–32.
- Charache, Samuel, Michael L. Terrin, Richard D. Moore, George J. Dover, Franca B. Barton, Susan V. Eckert, Robert P. McMahon, and Duane R. Bonds. 1995. "Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle Cell Anemia." *New England Journal of Medicine* 332 (20): 1317–22. <https://doi.org/10.1056/NEJM199505183322001>.

- Clark, M. R. 1988. "Senescence of Red Blood Cells: Progress and Problems." *Physiological Reviews* 68 (2): 503–54. <https://doi.org/10.1152/physrev.1988.68.2.503>.
- Clark, S. L., A. E. Santin, P. A. Bryant, R. Holman, and K. J. Rodnick. 2013. "The Initial Noncovalent Binding of Glucose to Human Hemoglobin in Nonenzymatic Glycation." *Glycobiology* 23 (11): 1250–59. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt061>.
- Coban, Erkan, Mustafa Ozdogan, and Aysen Timuragaoglu. 2004. "Effect of Iron Deficiency Anemia on the Levels of Hemoglobin A1c in Nondiabetic Patients." *Acta Haematologica* 112 (3): 126–28. <https://doi.org/10.1159/000079722>.
- Coburn, R. F. 1970. "Endogenous Carbon Monoxide Production." *The New England Journal of Medicine* 282 (4): 207–9. <https://doi.org/10.1056/NEJM197001222820407>.
- Cohen, Robert M., Robert S. Franco, Paramjit K. Khera, Eric P. Smith, Christopher J. Lindsell, Peter J. Ciralo, Mary B. Palascak, and Clinton H. Joiner. 2008. "Red Cell Life Span Heterogeneity in Hematologically Normal People Is Sufficient to Alter HbA1c." *Blood* 112 (10): 4284. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-154112>.
- Colella, Marina Pereira, and Fabíola Traina. 2015. "Fetal Hemoglobin and Hemolysis Markers in Sickle Cell Anemia." *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia* 37 (3): 148–49. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.03.015>.
- Conran, Nicola. 2015. "Prospects for Early Investigational Therapies for Sickle Cell Disease." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 24 (5): 595–602. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1012292>.
- Cordle, D.G., R.G. Strauss, G. Lankford, and D.M. Mock. 1999. "Antibodies Provoked by the Transfusion of Biotin-Labeled Red Cells." *Transfusion* 39 (10): 1065–69. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39101065.x>.
- Corrons, J.L. Vives, L. Berga Casafont, and E. Feliu Frasnado. 2021. "Concise Review: How Do Red Blood Cells Born, Live, and Die?" *Annals of Hematology* 100 (10): 2425–33. <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>.
- Cunha, Maria VEIGA da-, Patrick Jacquemin, Ghislain Delpierre, Catherine Godfraind, Ivan Théate, Didier Vertommen, Frédéric Clotman, Frédéric Lemaigre, Olivier Devuyt, and Emile Van Schaffingen. 2006. "Increased Protein Glycation in Fructosamine 3-Kinase-Deficient Mice." *Biochemical Journal* 399 (2): 257–64. <https://doi.org/10.1042/BJ20060684>.
- D'Alessandro, Angelo, Kirk C. Hansen, Elan Z. Eisenmesser, and James C. Zimring. 2019. "Protect, Repair, Destroy or Sacrifice: A Role of Oxidative Stress Biology in Inter-Donor Variability of Blood Storage?" *Blood Transfusion*, July. <https://doi.org/10.2450/2019.0072-19>.
- D'Alessandro, Angelo, and Lello Zolla. 2017. "Proteomic Analysis of Red Blood Cells and the Potential for the Clinic: What Have We Learned so Far?" *Expert Review of Proteomics* 14 (3): 243–52. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1291347>.
- Delpierre, G., and E. Van Schaffingen. 2003. "Fructosamine 3-Kinase, an Enzyme Involved in Protein Deglycation." *Biochemical Society Transactions* 31 (6): 1354–57. <https://doi.org/10.1042/bst0311354>.
- Delpierre, Ghislain, Didier Vertommen, David Communi, Mark H. Rider, and Emile Van Schaffingen. 2004. "Identification of Fructosamine Residues Deglycated by Fructosamine-3-Kinase in Human Hemoglobin." *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27613–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402091200>.
- Di Liberto, Gaetana, Laurent Kiger, Michael C. Marden, Laurent Boyer, Florence Canoui Poitrine, Marc Conti, Marie Georgine Rakotoson, et al. 2016. "Dense Red Blood Cell and Oxygen Desaturation in Sickle-Cell Disease: Oxygen Desaturation and Sickle-Cell Disease." *American Journal of Hematology* 91 (10): 1008–13. <https://doi.org/10.1002/ajh.24467>.
- Dinkla, S. 2016. "Erythrocyte Aging and Disease A Tale of Membranes and Microparticles" 41 (3).
- Dorin, Mel, and Beckman Instruments. n.d. "Developing Elutriation Protocols."
- Dunn, J-Oc, Mg Mythen, and Mp Grocott. 2016. "Physiology of Oxygen Transport." *BJA Education* 16 (10): 341–48. <https://doi.org/10.1093/bjaed/mkw012>.
- Dzierzak, Elaine, and Sjaak Philipsen. 2013. "Erythropoiesis: Development and Differentiation." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (4): a011601. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>.

- Eaton, William A., and H. Franklin Bunn. 2017. "Treating Sickle Cell Disease by Targeting HbS Polymerization." *Blood* 129 (20): 2719–26. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-02-765891>.
- Ebaugh, Franklin G., Charles P. Emerson, Joseph F. Ross, Rose Aloia, Pearl Halperin, and Helen Richards. 1953. "THE USE OF RADIOACTIVE CHROMIUM 51 AS AN ERYTHROCYTE TAGGING AGENT FOR THE DETERMINATION OF RED CELL SURVIVAL IN VIVO 12." *Journal of Clinical Investigation* 32 (12): 1260–76. <https://doi.org/10.1172/JCI102855>.
- English, Emma, Iskandar Idris, Georgina Smith, Ketan Dhatariya, Eric S. Kilpatrick, and W. Garry John. 2015. "The Effect of Anaemia and Abnormalities of Erythrocyte Indices on HbA1c Analysis: A Systematic Review." *Diabetologia* 58 (7): 1409–21. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3599-3>.
- Fitzgibbons, J F, R D Koler, and R T Jones. 1976. "Red Cell Age-Related Changes of Hemoglobins Ala+b and Alc in Normal and Diabetic Subjects." *Journal of Clinical Investigation* 58 (4): 820–24. <https://doi.org/10.1172/JCI108534>.
- Flückiger, R., and K. H. Winterhalter. 1976a. "In Vitro Synthesis of Hemoglobin Alc." *FEBS Letters* 71 (2): 356–60. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80969-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80969-6).
- Flückiger, R., and K.H. Winterhalter. 1976b. "In Vitro Synthesis of Hemoglobin A_{1c}." *FEBS Letters* 71 (2): 356–60. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80969-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80969-6).
- Föllner, Michael, and Florian Lang. 2020. "Ion Transport in Eryptosis, the Suicidal Death of Erythrocytes." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (July): 597. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00597>.
- Franco, R. S., J. Lohmann, E. B. Silberstein, G. Mayfield-Pratt, M. Palascak, T. A. Nemeth, C. H. Joiner, M. Weiner, and D. L. Rucknagel. 1998. "Time-Dependent Changes in the Density and Hemoglobin F Content of Biotin-Labeled Sickle Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 101 (12): 2730–40. <https://doi.org/10.1172/JCI2484>.
- Franco, Robert S. 2009. "The Measurement and Importance of Red Cell Survival." *American Journal of Hematology* 84 (2): 109–14. <https://doi.org/10.1002/ajh.21298>.
- . 2012. "Measurement of Red Cell Lifespan and Aging." *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie* 39 (5): 302–7. <https://doi.org/10.1159/000342232>.
- Franco, Robert S., Zahida Yasin, Joni M. Lohmann, Mary B. Palascak, Therese A. Nemeth, Murray Weiner, Clinton H. Joiner, and Donald L. Rucknagel. 2000. "The Survival Characteristics of Dense Sickle Cells." *Blood* 96 (10): 3610–17. https://doi.org/10.1182/blood.V96.10.3610.h8003610_3610_3617.
- Franco, Robert S., Zahida Yasin, Mary B. Palascak, Peter Ciralo, Clinton H. Joiner, and Donald L. Rucknagel. 2006. "The Effect of Fetal Hemoglobin on the Survival Characteristics of Sickle Cells." *Blood* 108 (3): 1073–76. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-008318>.
- Franklin Bunn, H. 1981. "Evaluation of Glycosylated Hemoglobin in Diabetic Patients." *Diabetes* 30 (7): 613–17. <https://doi.org/10.2337/diab.30.7.613>.
- Furne, Julie K., John R. Springfield, Samuel B. Ho, and Michael D. Levitt. 2003. "Simplification of the End-Alveolar Carbon Monoxide Technique to Assess Erythrocyte Survival." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 142 (1): 52–57. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(03\)00086-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(03)00086-6).
- Gabbay, Kenneth H., Jay M Sosenko, Grace A Banuchi, Michael J Mininsohn, and Rudolf Flückiger. 1979. "Glycosylated Hemoglobins: Increased Glycosylation of Hemoglobin A in Diabetic Patients." *Diabetes* 28 (4): 337–40. <https://doi.org/10.2337/diab.28.4.337>.
- Ganzoni, A. M., R. Oakes, and R. S. Hillman. 1971. "Red Cell Aging in Vivo." *Journal of Clinical Investigation* 50 (7): 1373–78.
- Garby, L., and P. L. Mollison. 1971. "Deduction of Mean Red-Cell Life-Span from ⁵¹Cr Survival Curves." *British Journal of Haematology* 20 (5): 527–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1971.tb07068.x>.
- Gartner, L. M., and I. M. Arias. 1969. "Formation, Transport, Metabolism and Excretion of Bilirubin." *The New England Journal of Medicine* 280 (24): 1339–45. <https://doi.org/10.1056/NEJM196906122802409>.
- Gould, Barry J., Sarah J. Davie, and John S. Yudkin. 1997. "Investigation of the Mechanism Underlying the Variability of Glycated Haemoglobin in Non-Diabetic Subjects Not Related to Glycaemia." *Clinica Chimica Acta* 260 (1): 49–64. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(96\)06508-4](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(96)06508-4).

- Grace, Rachael F., and Bertil Glader. 2018. "Red Blood Cell Enzyme Disorders." *Pediatric Clinics of North America* 65 (3): 579–95. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.02.005>.
- Green, Nancy S., Deepa Manwani, Mahvish Qureshi, Karen Ireland, Arpan Sinha, and Arlene M. Smaldone. 2016. "Decreased Fetal Hemoglobin over Time among Youth with Sickle Cell Disease on Hydroxyurea Is Associated with Higher Urgent Hospital Use: Green et Al." *Pediatric Blood & Cancer* 63 (12): 2146–53. <https://doi.org/10.1002/pbc.26161>.
- Grosso, Michela, Raffaele Sessa, Stella Puzone, Maria Rosaria, and Paola Izzo. 2012. "Molecular Basis of Thalassemia." In *Anemia*, edited by Donald Silverberg. InTech. <https://doi.org/10.5772/31362>.
- Gupta, Ritama, Khaled M. Musallam, Ali T. Taher, and Stefano Rivella. 2018. "Ineffective Erythropoiesis, Anemia and Iron Overload." *Hematology/Oncology Clinics of North America* 32 (2): 213–21. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.11.009>.
- Haney, D N, and H F Bunn. 1976. "Glycosylation of Hemoglobin in Vitro: Affinity Labeling of Hemoglobin by Glucose-6-Phosphate." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73 (10): 3534–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.10.3534>.
- Hebert, Nicolas, Marie Georgine Rakotoson, Gwellaouen Bodivit, Etienne Audureau, Laura Bencheikh, Laurent Kiger, Nadia Oubaya, et al. 2020. "Individual Red Blood Cell Fetal Hemoglobin Quantification Allows to Determine Protective Thresholds in Sickle Cell Disease." *American Journal of Hematology* 95 (11): 1235–45. <https://doi.org/10.1002/ajh.25937>.
- Hempe, James M, Ricardo Gomez, Robert J McCarter Jr, and Stuart A Chalew. 2002. "High and Low Hemoglobin Glycation Phenotypes in Type 1 Diabetes A Challenge for Interpretation of Glycemic Control." *Journal of Diabetes and Its Complications*.
- Higgins, P. J., and H. F. Bunn. 1981. "Kinetic Analysis of the Nonenzymatic Glycosylation of Hemoglobin." *The Journal of Biological Chemistry* 256 (10): 5204–8.
- Higgins, Tara, Melissa A. Menditto, Stephanie Katartzis, and Kelly L. Matson. 2022. "Advances in the Management of Sickle Cell Disease: New Concepts and Future Horizons." *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics: JPPT: The Official Journal of PPAG* 27 (3): 206–13. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-27.3.206>.
- Hoban, Megan D., Stuart H. Orkin, and Daniel E. Bauer. 2016. "Genetic Treatment of a Molecular Disorder: Gene Therapy Approaches to Sickle Cell Disease." *Blood* 127 (7): 839–48. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-618587>.
- Hodge, John E. 1955. "The Amadori Rearrangement." In *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 10:169–205. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60392-6](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60392-6).
- Hudson, P. R., D. F. Child, H. Jones, and C. P. Williams. 1999. "Differences in Rates of Glycation (Glycation Index) May Significantly Affect Individual HbA1c Results in Type 1 Diabetes." *Annals of Clinical Biochemistry* 36 (Pt 4) (July): 451–59. <https://doi.org/10.1177/000456329903600408>.
- Huisjes, Rick, Anna Bogdanova, Wouter W. van Solinge, Raymond M. Schiffelers, Lars Kaestner, and Richard van Wijk. 2018. "Squeezing for Life – Properties of Red Blood Cell Deformability." *Frontiers in Physiology* 9 (June): 656. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00656>.
- Huisman, Titus H.J., and Andree M. Dozy. 1961. "Quantitative Determination of the Minor Hemoglobin Component Hb-A2 by DEAE-Cellulose Chromatography." *Analytical Biochemistry* 2 (4): 400–403. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(61\)90017-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(61)90017-3).
- Inusa, Baba P. D., Lewis L. Hsu, Neeraj Kohli, Anissa Patel, Kilali Ominu-Evbota, Kofi A. Anie, and Wale Atoyebi. 2019. "Sickle Cell Disease-Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment." *International Journal of Neonatal Screening* 5 (2): 20. <https://doi.org/10.3390/ijns5020020>.
- Iolascon, Achille, Immacolata Andolfo, and Roberta Russo. 2019. "Advances in Understanding the Pathogenesis of Red Cell Membrane Disorders." *British Journal of Haematology* 187 (1): 13–24. <https://doi.org/10.1111/bjh.16126>.
- John, W G. 1997. "Glycated Haemoglobin Analysis." *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 34 (1): 17–31. <https://doi.org/10.1177/000456329703400105>.
- John, W. Garry. 2003. "Haemoglobin A1c: Analysis and Standardisation." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41 (9). <https://doi.org/10.1515/CCLM.2003.184>.

- Kabytaev, Kuanysh, Shawn Connolly, Curt L. Rohlfing, David B. Sacks, Alexander V. Stoyanov, and Randie R. Little. 2016. "Higher Degree of Glycation of Hemoglobin S Compared to Hemoglobin A Measured by Mass Spectrometry: Potential Impact on HbA1c Testing." *Clinica Chimica Acta* 458 (July): 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.04.027>.
- Kaestner, Lars, and Anna Bogdanova. 2014. "Regulation of Red Cell Life-Span, Erythropoiesis, Senescence, and Clearance." *Frontiers in Physiology* 5 (July). <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00269>.
- Kaestner, Lars, and Giampaolo Minetti. 2017. "The Potential of Erythrocytes as Cellular Aging Models." *Cell Death and Differentiation* 24 (9): 1475–77. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.100>.
- Kato, Gregory J., Frédéric B. Piel, Clarice D. Reid, Marilyn H. Gaston, Kwaku Ohene-Frempong, Lakshmanan Krishnamurti, Wally R. Smith, et al. 2018. "Sickle Cell Disease." *Nature Reviews. Disease Primers* 4 (March): 18010. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10>.
- Kaufman, Daniel P., Jasmin Khattar, and Sarah L. Lappin. 2023. "Physiology, Fetal Hemoglobin." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500011/>.
- Khera, Paramjit K., Eric P. Smith, Christopher J. Lindsell, Mary Colleen Rogge, Shannon Haggerty, David A. Wagner, Mary B. Palascak, et al. 2015. "Use of an Oral Stable Isotope Label to Confirm Variation in Red Blood Cell Mean Age That Influences HbA1c Interpretation." *American Journal of Hematology* 90 (1): 50–55. <https://doi.org/10.1002/ajh.23866>.
- Koury, Mark J. 2016. "Tracking Erythroid Progenitor Cells in Times of Need and Times of Plenty." *Experimental Hematology* 44 (8): 653–63. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.10.007>.
- Koval, Dušan, Václav Kašička, and Hervé Cottet. 2011. "Analysis of Glycated Hemoglobin A1c by Capillary Electrophoresis and Capillary Isoelectric Focusing." *Analytical Biochemistry* 413 (1): 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.048>.
- Kueviakoe, Im, E Ayimba, L Feteke, J Padaro, and Ay Segbena. 2009. "Etude de La Densite Erythrocytaire Par La Methode Des Gradients de Phtalate Chez Les Patients Drepanocytaires Au Chu-Campus de Lome(Togo)." *Journal de La Recherche Scientifique de l'Universite de Lome* 7 (2). <https://doi.org/10.4314/jrsul.v7i2.47622>.
- Labie, D., and J. Elion. 2010. "[The problem of sickle cell disease in Africa]." *Medecine Tropicale: Revue Du Corps De Sante Colonial* 70 (5–6): 449–53.
- Lapolla, Annunziata, Pietro Traldi, and Domenico Fedele. 2005. "Importance of Measuring Products of Non-Enzymatic Glycation of Proteins." *Clinical Biochemistry* 38 (2): 103–15. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.09.007>.
- Lee, Jee-Soo, Sung Im Cho, Sung Sup Park, and Moon-Woo Seong. 2021. "Molecular Basis and Diagnosis of Thalassemia." *BLOOD RESEARCH* 56 (S1): S39–43. <https://doi.org/10.5045/br.2021.2020332>.
- Lettre, Guillaume, and Daniel E. Bauer. 2016. "Fetal Haemoglobin in Sickle-Cell Disease: From Genetic Epidemiology to New Therapeutic Strategies." *Lancet (London, England)* 387 (10037): 2554–64. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01341-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01341-0).
- Lin, Hua, and Jun Yi. 2017. "Current Status of HbA1c Biosensors." *Sensors* 17 (8): 1798. <https://doi.org/10.3390/s17081798>.
- Lindern, Marieke von, Stéphane Egée, Paola Bianchi, and Lars Kaestner. 2022. "The Function of Ion Channels and Membrane Potential in Red Blood Cells: Toward a Systematic Analysis of the Erythroid Channelome." *Frontiers in Physiology* 13 (February): 824478. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.824478>.
- Lizarralde Iragorri, María Alejandra, Sara El Hoss, Valentine Brousse, Sophie D. Lefevre, Michael Dussiot, Tieying Xu, Alexander Rodrigo Ferreira, et al. 2018. "A Microfluidic Approach to Study the Effect of Mechanical Stress on Erythrocytes in Sickle Cell Disease." *Lab on a Chip* 18 (19): 2975–84. <https://doi.org/10.1039/c8lc00637g>.
- Lutz, Hans U., and Anna Bogdanova. 2013. "Mechanisms Tagging Senescent Red Blood Cells for Clearance in Healthy Humans." *Frontiers in Physiology* 4 (December): 387. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00387>.
- Lux, Samuel E. 2016. "Anatomy of the Red Cell Membrane Skeleton: Unanswered Questions." *Blood* 127 (2): 187–99. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-512772>.
- Ma, Qinglin, Houming Liu, Guangxin Xiang, Wanshui Shan, and Wanli Xing. 2016. "Association between Glycated Hemoglobin A1c Levels with Age and Gender in Chinese Adults

- with No Prior Diagnosis of Diabetes Mellitus." *Biomedical Reports* 4 (6): 737–40. <https://doi.org/10.3892/br.2016.643>.
- Manning, James M., Lois R. Manning, Antoine Dumoulin, Julio C. Padovan, and Brian Chait. 2020. "Embryonic and Fetal Human Hemoglobins: Structures, Oxygen Binding, and Physiological Roles." In *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and Other Body Fluid Proteins*, edited by Ulrich Hoeger and J. Robin Harris, 94:275–96. Subcellular Biochemistry. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_11.
- Manning, Lois R., Anthony M. Popowicz, Julio C. Padovan, Brian T. Chait, and James M. Manning. 2017. "Gel Filtration of Dilute Human Embryonic Hemoglobins Reveals Basis for Their Increased Oxygen Binding." *Analytical Biochemistry* 519 (February): 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.008>.
- Mattioni, Sarah, Katia Stankovic Stojanovic, Robert Girot, and François Lionnet. 2016. "La drépanocytose en France." *Revue Francophone des Laboratoires, Les maladies de l'hémoglobine*, 2016 (481): 61–66. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(16\)30129-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(16)30129-0).
- MCCURDY, PAUL R. 1969. "32DFP and 51Cr for Measurement of Red Cell Life Span in Abnormal Hemoglobin Syndromes." *Blood* 33 (2): 214–24. <https://doi.org/10.1182/blood.V33.2.214.214>.
- McDonald, M.J., R. Shapiro, M. Bleichman, J. Solway, and H.F. Bunn. 1978. "Glycosylated Minor Components of Human Adult Hemoglobin. Purification, Identification, and Partial Structural Analysis." *Journal of Biological Chemistry* 253 (7): 2327–32. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38076-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38076-6).
- McGann, Patrick T., Omar Niss, Min Dong, Anu Marahatta, Thad A. Howard, Tomoyuki Mizuno, Adam Lane, et al. 2019. "Robust Clinical and Laboratory Response to Hydroxyurea Using Pharmacokinetically Guided Dosing for Young Children with Sickle Cell Anemia." *American Journal of Hematology* 94 (8): 871–79. <https://doi.org/10.1002/ajh.25510>.
- McGann, Patrick T, and Russell E Ware. 2015. "Hydroxyurea Therapy for Sickle Cell Anemia." *Expert Opinion on Drug Safety* 14 (11): 1749–58. <https://doi.org/10.1517/14740338.2015.1088827>.
- McGann, Patrick T., Thomas N. Williams, Peter Olupot-Olupot, George A. Tomlinson, Adam Lane, José Luís Reis da Fonseca, Robert Kitenge, et al. 2018. "Realizing Effectiveness across Continents with Hydroxyurea: Enrollment and Baseline Characteristics of the Multicenter REACH Study in Sub-Saharan Africa." *American Journal of Hematology* 93 (4): 537–45. <https://doi.org/10.1002/ajh.25034>.
- Miedema, Kor. 2005. "Standardization of HbA1c and Optimal Range of Monitoring." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 65 (sup240): 61–72. <https://doi.org/10.1080/00365510500236143>.
- Mitlyng, Benjamin L., Jasvinder A. Singh, Julie K. Furne, John Ruddy, and Michael D. Levitt. 2006. "Use of Breath Carbon Monoxide Measurements to Assess Erythrocyte Survival in Subjects with Chronic Diseases." *American Journal of Hematology* 81 (6): 432–38. <https://doi.org/10.1002/ajh.20644>.
- Mock, D. M., G. L. Lankford, J. A. Widness, L. F. Burmeister, D. Kahn, and R. G. Strauss. 1999. "Measurement of Circulating Red Cell Volume Using Biotin-Labeled Red Cells: Validation against 51Cr-Labeled Red Cells." *Transfusion* 39 (2): 149–55. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1999.39299154728.x>.
- Mock, Donald M., John A. Widness, Peter Veng-Pedersen, Ronald G. Strauss, Jose A. Cancelas, Robert M. Cohen, Christopher J. Lindsell, and Robert S. Franco. 2014. "Measurement of Posttransfusion Red Cell Survival With the Biotin Label." *Transfusion Medicine Reviews* 28 (3): 114–25. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2014.03.003>.
- Mohandas, Narla, and Patrick G. Gallagher. 2008. "Red Cell Membrane: Past, Present, and Future." *Blood* 112 (10): 3939–48. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>.
- Moras, Martina, Sophie D. Lefevre, and Mariano A. Ostuni. 2017. "From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals." *Frontiers in Physiology* 8: 1076. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01076>.
- Moreira, Juliane Almeida, Marília Rocha Laurentino, Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado, Maritza Cavalcante Barbosa, Ronaldo Pinheiro Gonçalves, Amanda de Menezes Mota, Lilianne Brito da Silva Rocha, et al. 2015. "Pattern of Hemolysis Parameters and

- Association with Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia Patients in Steady State." *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia* 37 (3): 167–71. <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.01.008>.
- Narla, J., and N. Mohandas. 2017. "Red Cell Membrane Disorders." *International Journal of Laboratory Hematology* 39 (May): 47–52. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12657>.
- Noguchi, C. T., G. P. Rodgers, and A. N. Schechter. 1989. "Intracellular Polymerization. Disease Severity and Therapeutic Predictions." *Annals of the New York Academy of Sciences* 565: 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb24152.x>.
- Noguchi, C. T., A. N. Schechter, and G. P. Rodgers. 1993. "Sickle Cell Disease Pathophysiology." *Bailliere's Clinical Haematology* 6 (1): 57–91. [https://doi.org/10.1016/s0950-3536\(05\)80066-6](https://doi.org/10.1016/s0950-3536(05)80066-6).
- Noguchi, Constance Tom, and Alan N. Schechter. 1981. "The Intracellular Polymerization of Sickle Hemoglobin and Its Relevance to Sickle Cell Disease." *Blood* 58 (6): 1057–68. <https://doi.org/10.1182/blood.V58.6.1057.1057>.
- Nourai, Mehdi, Janet S. Lee, Yingze Zhang, Tamir Kanias, Xuejun Zhao, Zeyu Xiong, Timothy B. Oriss, et al. 2013. "The Relationship between the Severity of Hemolysis, Clinical Manifestations and Risk of Death in 415 Patients with Sickle Cell Anemia in the US and Europe." *Haematologica* 98 (3): 464–72. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.068965>.
- Odièvre, Marie-Hélène, Emmanuelle Verger, Ana Cristina Silva-Pinto, and Jacques Elion. 2011. "Pathophysiological Insights in Sickle Cell Disease." *The Indian Journal of Medical Research* 134 (4): 532–37.
- Oudin-Doglioni, Damien, Marie-Claire Gay, Marie-Pierre Lehougre, Jean-Benoît Arlet, and Frédéric Galactéros. 2019. "Les représentations de la drépanocytose comme déterminants de l'observance thérapeutique." *Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique* 177 (6): 517–25. <https://doi.org/10.1016/j.amp.2017.10.024>.
- Ovchinnikova, Elina, Francesca Agliandolo, Marieke von Lindern, and Emile van den Akker. 2018. "The Shape Shifting Story of Reticulocyte Maturation." *Frontiers in Physiology* 9 (July): 829. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00829>.
- Paikari, Alireza, and Vivien A. Sheehan. 2018. "Fetal Haemoglobin Induction in Sickle Cell Disease." *British Journal of Haematology* 180 (2): 189–200. <https://doi.org/10.1111/bjh.15021>.
- Palis, James. 2014. "Primitive and Definitive Erythropoiesis in Mammals." *Frontiers in Physiology* 5 (January): 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00003>.
- Pani, Lydie Nkwimi, David Matthew Nathan, and Richard William Grant. 2008. "Clinical Predictors of Disease Progression and Medication Initiation in Untreated Patients With Type 2 Diabetes and A1C Less Than 7%." *Diabetes Care* 31 (3): 386–90. <https://doi.org/10.2337/dc07-1934>.
- Panzer, S., G. Kronik, K. Lechner, P. Bettelheim, E. Neumann, and R. Dudczak. 1982. "Glycosylated Hemoglobins (GHb): An Index of Red Cell Survival." *Blood* 59 (6): 1348–50.
- Paré, Guillaume, Daniel I. Chasman, Alexander N. Parker, David M. Nathan, Joseph P. Miletich, Robert Y. Zee, and Paul M. Ridker. 2008. "Novel Association of HK1 with Glycated Hemoglobin in a Non-Diabetic Population: A Genome-Wide Evaluation of 14,618 Participants in the Women's Genome Health Study." Edited by David B. Allison. *PLoS Genetics* 4 (12): e1000312. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000312>.
- Patel, Shivani, Julia H. Miao, Ekrem Yetiskul, Anya Anokhin, and Sapan H. Majmundar. 2022. "Physiology, Carbon Dioxide Retention." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482456/>.
- Peterson, K. P., J. G. Pavlovich, D. Goldstein, R. Little, J. England, and C. M. Peterson. 1998. "What Is Hemoglobin A1c? An Analysis of Glycated Hemoglobins by Electrospray Ionization Mass Spectrometry." *Clinical Chemistry* 44 (9): 1951–58.
- Piccin, Andrea, Ciaran Murphy, Elva Eakins, Maria Beatrice Rondinelli, Massimo Daves, Cinzia Vecchiato, Dominik Wolf, Corrina Mc Mahon, and Owen P. Smith. 2019. "Insight into the Complex Pathophysiology of Sickle Cell Anaemia and Possible Treatment." *European Journal of Haematology* 102 (4): 319–30. <https://doi.org/10.1111/ejh.13212>.
- Piel, Frédéric B., Martin H. Steinberg, and David C. Rees. 2017. "Sickle Cell Disease." *New England Journal of Medicine* 376 (16): 1561–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865>.

- Piomelli, S., G. Lurinsky, and L. R. Wasserman. 1967. "The Mechanism of Red Cell Aging. I. Relationship between Cell Age and Specific Gravity Evaluated by Ultracentrifugation in a Discontinuous Density Gradient." *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 69 (4): 659–74.
- Platt, O. S., D. J. Brambilla, W. F. Rosse, P. F. Milner, O. Castro, M. H. Steinberg, and P. P. Klug. 1994. "Mortality in Sickle Cell Disease. Life Expectancy and Risk Factors for Early Death." *The New England Journal of Medicine* 330 (23): 1639–44. <https://doi.org/10.1056/NEJM199406093302303>.
- Platt, Orah S. 2008. "Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia." *The New England Journal of Medicine* 358 (13): 1362–69. <https://doi.org/10.1056/NEJMct0708272>.
- Poillon, W N, B C Kim, G P Rodgers, C T Noguchi, and A N Schechter. 1993. "Sparing Effect of Hemoglobin F and Hemoglobin A2 on the Polymerization of Hemoglobin S at Physiologic Ligand Saturations." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (11): 5039–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5039>.
- Poitevin, Martine. n.d. "Contribution au développement d'un microsystème pour la séparation bidimensionnelle de protéines par électrophorèse."
- Powars, D. R., J. N. Weiss, L. S. Chan, and W. A. Schroeder. 1984. "Is There a Threshold Level of Fetal Hemoglobin That Ameliorates Morbidity in Sickle Cell Anemia?" *Blood* 63 (4): 921–26.
- Pretini, Virginia, Mischa H. Koenen, Lars Kaestner, Marcel H. A. M. Fens, Raymond M. Schiffelers, Marije Bartels, and Richard Van Wijk. 2019. "Red Blood Cells: Chasing Interactions." *Frontiers in Physiology* 10 (July): 945. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>.
- Pretorius, Etheresia, Jeanette N. du Plooy, and Janette Bester. 2014. "A Comprehensive Review on Eryptosis." *Cellular Physiology and Biochemistry* 39 (5): 1977–2000. <https://doi.org/10.1159/000447895>.
- Pundir, Chandra Shekhar, and Sheetal Chawla. 2014. "Determination of Glycated Hemoglobin with Special Emphasis on Biosensing Methods." *Analytical Biochemistry* 444 (January): 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.023>.
- Rahbar, Samuel, Olga Blumenfeld, and Helen M. Ranney. 1969. "Studies of an Unusual Hemoglobin in Patients with Diabetes Mellitus." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 36 (5): 838–43. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90685-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90685-8).
- Repsold, Lisa, and Anna Margaretha Joubert. 2018. "Eryptosis: An Erythrocyte's Suicidal Type of Cell Death." *BioMed Research International* 2018: 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/9405617>.
- Rhea, Jeanne M., and Ross Molinaro. 2014. "Pathology Consultation on HbA1c Methods and Interferences." *American Journal of Clinical Pathology* 141 (1): 5–16. <https://doi.org/10.1309/AJCPQ23GTTMLAEVL>.
- Rhodes, Melissa M., Stephen T. Koury, Prapaporn Kopsombut, Catherine E. Alford, James O. Price, and Mark J. Koury. 2016. "Stress Reticulocytes Lose Transferrin Receptors by an Extrinsic Process Involving Spleen and Macrophages: Maturation of Stress Reticulocytes." *American Journal of Hematology* 91 (9): 875–82. <https://doi.org/10.1002/ajh.24421>.
- Ricketts, C., I. Cavill, and J. A. Napier. 1977. "The Measurement of Red Cell Lifespan Using ⁵⁹Fe." *British Journal of Haematology* 37 (3): 403–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1977.tb01011.x>.
- Roberts, Norman B, Brian N Green, and Michael Morris. 1997. "Potential of Electrospray Mass Spectrometry for Quantifying Glycohemoglobin." *Clinical Chemistry* 43 (5): 771–78. <https://doi.org/10.1093/clinchem/43.5.771>.
- Rohlfing, Curt L., Shawn M. Connolly, Jack D. England, Steven E. Hanson, Christina M. Moellering, Janielle R. Bachelder, and Randie R. Little. 2008. "The Effect of Elevated Fetal Hemoglobin on Hemoglobin A_{1c} Results: Five Common Hemoglobin A_{1c} Methods Compared With the IFCC Reference Method." *American Journal of Clinical Pathology* 129 (5): 811–14. <https://doi.org/10.1309/YFVTUD0GHJF7D16H>.
- Roussel, Nicolas. 2018. "Rheological Requirements for Printable Concretes." *Cement and Concrete Research*, SI: Digital concrete 2018, 112 (October): 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2018.04.005>.

- Russo, V., R. Barker-Gear, R. Gates, and R. Franco. 1992. "Studies with Biotinylated RBC: (1) Use of Flow Cytometry to Determine Posttransfusion Survival and (2) Isolation Using Streptavidin Conjugated Magnetic Beads." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 326: 101–7. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3030-5_12.
- Salinas Cisneros, Gabriel, and Swee L. Thein. 2020. "Recent Advances in the Treatment of Sickle Cell Disease." *Frontiers in Physiology* 11: 435. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00435>.
- Salvo, G., P. Caprari, P. Samoggia, G. Mariani, and A. M. Salvati. 1982. "Human Erythrocyte Separation According to Age on a Discontinuous 'Percoll' Density Gradient." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 122 (2): 293–300. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(82\)90290-x](https://doi.org/10.1016/0009-8981(82)90290-x).
- Samanta, Saptadip. 2020. "Glycated Hemoglobin and Subsequent Risk of Microvascular and Macrovascular Complications." *Indian Journal of Medical Sciences* 73 (October): 230–38. https://doi.org/10.25259/IJMS_16_2020.
- Schechter, Alan N. 2008. "Hemoglobin Research and the Origins of Molecular Medicine." *Blood* 112 (10): 3927–38. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>.
- Seaman, Carol, Sonja Wyss, and Sergio Piomelli. 1980. "The Decline in Energetic Metabolism with Aging of the Erythrocyte and Its Relationship to Cell Death." *American Journal of Hematology* 8 (1): 31–42. <https://doi.org/10.1002/ajh.2830080105>.
- Seltzer, W. K., T. C. Abshire, P. A. Lane, J. S. Roloff, and J. H. Githed. 1992. "Molecular Genetic Studies in Black Families with Sickle Cell Anemia and Unusually High Levels of Fetal Hemoglobin." *Hemoglobin* 16 (5): 363–77. <https://doi.org/10.3109/03630269209005688>.
- Sen, Subhrojit, Manoj Kar, Anjana Roy, and Abhay Sankar Chakraborti. 2005. "Effect of Nonenzymatic Glycation on Functional and Structural Properties of Hemoglobin." *Biophysical Chemistry* 113 (3): 289–98. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.05.005>.
- Sepulchre, E, L Lutteri, E Cavalier, B Guerci, and R P Radermecker. n.d. "A PROPOS DE L'HÉMOGLOBINE GLYQUÉE :." *Rev Med Liège*.
- Shemin, D., and D. Rittenberg. 1946. "The Life Span of the Human Red Blood Cell." *The Journal of Biological Chemistry* 166 (2): 627–36.
- Shinozuka, T. 1994. "Changes in Human Red Blood Cells during Aging in Vivo." *The Keio Journal of Medicine* 43 (3): 155–63. <https://doi.org/10.2302/kjm.43.155>.
- Singh, Kalpana, Bhawna Mahajan, Shweta Singh, and Abbas Ali Mahdi. 2017. "Labile Hemoglobin A1c: A Factor Affecting the Estimation of Glycated Hemoglobin." *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 8 (4). <https://doi.org/10.5799/jcei.382433>.
- Snieder, Harold, Pamela A. Sawtell, Lesley Ross, James Walker, Tim D. Spector, and R. David Graham Leslie. 2001. "HbA1c Levels Are Genetically Determined Even in Type 1 Diabetes." *Diabetes* 50 (12): 2858–63. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.12.2858>.
- Sommet, Julie, Corinne Alberti, Nathalie Couque, Suzanne Verlhac, Zinedine Haouari, Damir Mohamed, Martine François, et al. 2016. "Clinical and Haematological Risk Factors for Cerebral Macrovasculopathy in a Sickle Cell Disease Newborn Cohort: A Prospective Study." *British Journal of Haematology* 172 (6): 966–77. <https://doi.org/10.1111/bjh.13916>.
- Sommet, Julie, Enora Le Roux, Bérengère Koehl, Zinedine Haouari, Damir Mohamed, André Baruchel, Malika Benkerrou, and Corinne Alberti. 2021. "Variability of Prognostic Results Based on Biological Parameters in Sickle Cell Disease Cohort Studies in Children: What Should Clinicians Know?" *Children (Basel, Switzerland)* 8 (2): 143. <https://doi.org/10.3390/children8020143>.
- Sosenko, Jay M, Rudolf Flückiger, Oran S Platt, and Kenneth H Gabbay. 1980. "Glycosylation of Variant Hemoglobins in Normal and Diabetic Subjects." *Diabetes Care* 3 (5): 590–93. <https://doi.org/10.2337/diacare.3.5.590>.
- Steinberg, M. H., and G. P. Rodgers. 2001. "Pathophysiology of Sickle Cell Disease: Role of Cellular and Genetic Modifiers." *Seminars in Hematology* 38 (4): 299–306. [https://doi.org/10.1016/s0037-1963\(01\)90023-x](https://doi.org/10.1016/s0037-1963(01)90023-x).
- Steinberg, Martin H. 2008. "Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches." *TheScientificWorldJournal* 8 (December): 1295–1324. <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.157>.

- . 2020. "Fetal Hemoglobin in Sickle Hemoglobinopathies: High HbF Genotypes and Phenotypes." *Journal of Clinical Medicine* 9 (11): 3782. <https://doi.org/10.3390/jcm9113782>.
- Steinberg, Martin H., David H. K. Chui, George J. Dover, Paola Sebastiani, and Abdulrahman Alsultan. 2014. "Fetal Hemoglobin in Sickle Cell Anemia: A Glass Half Full?" *Blood* 123 (4): 481–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-528067>.
- Stevens-Hernandez, Christian J., Joanna F. Flatt, Sabine Kupzig, and Lesley J. Bruce. 2022. "Reticulocyte Maturation and Variant Red Blood Cells." *Frontiers in Physiology* 13 (March): 834463. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.834463>.
- Sundd, Prithu, Mark T. Gladwin, and Enrico M. Novelli. 2019. "Pathophysiology of Sickle Cell Disease." *Annual Review of Pathology* 14 (January): 263–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838>.
- Suzuki, T., and G. L. Dale. 1987. "Biotinylated Erythrocytes: In Vivo Survival and in Vitro Recovery." *Blood* 70 (3): 791–95.
- Szwergold, Benjamin S., Scott Howell, and Paul J. Beisswenger. 2001. "Human Fructosamine-3-Kinase." *Diabetes* 50 (9): 2139–47. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.9.2139>.
- Tamimi, W., S. Aljasser, R. Kanan, R. Dafterdar, N. Aldegaither, M. Alrwali, A. Elfatah, W. Alsaeed, F. Q. Alenzi, and R. Hasanato. 2015. "Effects of Hemoglobin S Variants on the Measurement of Glycosylated Hemoglobin A1c by Four Analytical Methods." *International Journal of Diabetes in Developing Countries* 35 (4): 392–99. <https://doi.org/10.1007/s13410-014-0257-0>.
- Taniguchi, Naoyuki, Motoko Takahashi, Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Vladimir V. Shuvaev, Tomomi Ookawara, and Akiko Furuta. 2016. "Glycation vs. Glycosylation: A Tale of Two Different Chemistries and Biology in Alzheimer's Disease." *Glycoconjugate Journal* 33 (4): 487–97. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9690-2>.
- Tebbi, Cameron K. 2022. "Sickle Cell Disease, a Review." *Hemato* 3 (2): 341–66. <https://doi.org/10.3390/hemato3020024>.
- Tegos, C., and E. Beutler. 1980. "Glycosylated Hemoglobin A2 Components." *Blood* 56 (3): 571–72.
- Telen, Marilyn J., Punam Malik, and Gregory M. Vercellotti. 2019. "Therapeutic Strategies for Sickle Cell Disease: Towards a Multi-Agent Approach." *Nature Reviews. Drug Discovery* 18 (2): 139–58. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0003-2>.
- Thiagarajan, Perumal, Charles J. Parker, and Josef T. Prchal. 2021. "How Do Red Blood Cells Die?" *Frontiers in Physiology* 12 (March): 655393. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.655393>.
- Thomas, Caroline, and Andrew B Lumb. 2012. "Physiology of Haemoglobin." *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 12 (5): 251–56. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mks025>.
- Unnikrishnan, Ranjit, Ranjit Mohan Anjana, and Viswanathan Mohan. 2012. "Drugs Affecting HbA1c Levels." *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16 (4): 528. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.98004>.
- Van Schaffingen, Emile, François Collard, Elsa Wiame, and Maria Veiga-da-Cunha. 2012. "Enzymatic Repair of Amadori Products." *Amino Acids* 42 (4): 1143–50. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0780-3>.
- Vegt, S. G. van der, A. M. Ruben, J. M. Werre, D. M. Palsma, C. W. Verhoef, J. de Gier, and G. E. Staal. 1985. "Counterflow Centrifugation of Red Cell Populations: A Cell Age Related Separation Technique." *British Journal of Haematology* 61 (3): 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1985.tb02843.x>.
- Vittori, Daniela, Daiana Vota, and Alcira Nesse. 2012. "Erythrocyte: Programmed Cell Death." In *Anemia*, edited by Donald Silverberg. InTech. <https://doi.org/10.5772/30238>.
- Ware, Russell E., Jenny M. Despotovic, Nicole A. Mortier, Jonathan M. Flanagan, Jin He, Matthew P. Smeltzer, Amy C. Kimble, et al. 2011. "Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics of Hydroxyurea Treatment for Children with Sickle Cell Anemia." *Blood* 118 (18): 4985–91. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-364190>.
- Webb, Kevin L., Paolo B. Dominelli, Sarah E. Baker, Stephen A. Klassen, Michael J. Joyner, Jonathon W. Senefeld, and Chad C. Wiggins. 2022. "Influence of High Hemoglobin-

- Oxygen Affinity on Humans During Hypoxia." *Frontiers in Physiology* 12 (January): 763933. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.763933>.
- Welsh, Kerry J., M. Sue Kirkman, and David B. Sacks. 2016. "Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions." *Diabetes Care* 39 (8): 1299–1306. <https://doi.org/10.2337/dc15-2727>.
- Weykamp, Cas. 2013. "HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects." *Annals of Laboratory Medicine* 33 (6): 393–400. <https://doi.org/10.3343/alm.2013.33.6.393>.
- Weykamp, Cas, W. Garry John, and Andrea Mosca. 2009. "A Review of the Challenge in Measuring Hemoglobin A1c." *Journal of Diabetes Science and Technology* 3 (3): 439–45. <https://doi.org/10.1177/193229680900300306>.
- White, Shanna L., Kevyn Hart, and Donald B. Kohn. 2023. "Diverse Approaches to Gene Therapy of Sickle Cell Disease." *Annual Review of Medicine* 74 (1): 473–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042921-021707>.
- Wijk, Richard van, and Wouter W. van Solinge. 2005. "The Energy-Less Red Blood Cell Is Lost: Erythrocyte Enzyme Abnormalities of Glycolysis." *Blood* 106 (13): 4034–42. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1622>.
- Xu, Anping, Yajun Wang, Jie Li, Guiping Liu, Xiaofeng Li, Weidong Chen, and Ling Ji. 2019. "Evaluation of MALDI-TOF MS for the Measurement of Glycated Hemoglobin." *Clinica Chimica Acta* 498 (November): 154–60. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.08.025>.
- Yasin, Zahida, Scott Witting, Mary B. Palascak, Clinton H. Joiner, Donald L. Rucknagel, and Robert S. Franco. 2003. "Phosphatidylserine Externalization in Sickle Red Blood Cells: Associations with Cell Age, Density, and Hemoglobin F." *Blood* 102 (1): 365–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3416>.
- Yazdanpanah, Sara, Mohammad Rabiee, Mohammadreza Tahriri, Mojgan Abdolrahim, and Lobat Tayebi. 2015. "Glycated Hemoglobin-Detection Methods Based on Electrochemical Biosensors." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 72 (October): 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.019>.
- Ye, Lei, Yongqiang Ji, Cong Zhou, Junfeng Luo, Li Zhang, Liping Jing, Xin Zhao, et al. 2021. "Comparison of LEVITT's CO Breath Test and the ¹⁵N -glycine Labeling Technique for Measuring the Lifespan of Human Red Blood Cells." *American Journal of Hematology* 96 (10): 1232–40. <https://doi.org/10.1002/ajh.26290>.
- Yudkin, J. S., R. D. Forrest, C. A. Jackson, A. J. Ryle, S. Davie, and B. J. Gould. 1990. "Unexplained Variability of Glycated Haemoglobin in Non-Diabetic Subjects Not Related to Glycaemia." *Diabetologia* 33 (4): 208–15. <https://doi.org/10.1007/BF00404798>.
- Zhang, Hou-De, Yong-Jian Ma, Qi-Fa Liu, Tie-Zhen Ye, Fan-Yi Meng, Yi-Wen Zhou, Guo-Pan Yu, et al. 2018. "Human Erythrocyte Lifespan Measured by Levitt's CO Breath Test with Newly Developed Automatic Instrument." *Journal of Breath Research* 12 (3): 036003. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aaacf1>.
- Zivot, Andrea, Jeffrey M. Lipton, Anupama Narla, and Lionel Blanc. 2018. "Erythropoiesis: Insights into Pathophysiology and Treatments in 2017." *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 24 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>.

Résumé. Introduction. La drépanocytose causée par une hémoglobine anormale (HbS) est caractérisée par une anémie hémolytique chronique. Celle-ci est induite par une élimination prématurée des globules rouges (GR). La durée de vie des GR drépanocytaires (GR SS) est estimée à 20 jours contre 120 jours chez le sujet sain. L'hémoglobine fœtale (HbF), modulateur de la sévérité de la drépanocytose en inhibant la polymérisation de l'HbS, a un effet positif sur la durée de vie des GR SS. L'effet de l'HbF dépend de sa quantité dans les cellules et de sa distribution, variable d'un GR à l'autre. La quantification précise du lien entre la quantité d'HbF par GR et la durée de vie des GR SS est limitée par l'absence d'un moyen de mesure rapide de cette durée de vie à l'échelle de la cellule. L'Hb glyquée (GHb ou HbA1c), formée progressivement tout au long de la vie des GR par un processus non enzymatique irréversible, est un indicateur du vieillissement des GR. **Objectifs.** Notre objectif est de développer une nouvelle méthode basée sur la mesure de la GHb dans chaque GR par cytométrie en flux afin i) d'évaluer l'âge relatif des GR et, ii) d'estimer l'allongement de la survie des GR SS en fonction de la quantité d'HbF par cellule. **Méthodes.** La GHb et l'HbF ont été quantifiées par cytométrie en flux respectivement avec des anticorps anti-HbA1c et anti-HbF fluorescents chez des donneurs sains (AA) et des patients SS non diabétiques. Chez les patients SS transfusés, un anticorps anti-HbS fluorescent a été utilisé pour discriminer entre GR-SS autologues et GR-AA transfusés. La quantité de la GHb dans les sous-populations de GR définies par la distribution de l'HbF (GR à faible et à forte teneur en HbF) a été également évaluée chez les patients SS. **Résultats.** Par notre méthode capable de suivre plusieurs populations de GR chez le même individu, nous avons confirmé que : i) la durée de vie des GR SS est drastiquement réduite par rapport aux GR AA, ii) les GR SS de patients traités par hydroxyurée survivent plus longtemps que les GR de patients non traités, iii) les GR SS contenant plus d'HbF ont une durée de vie plus importante que les GR SS à faible teneur en HbF et iv) la fraction de GR SS denses comporte des GR jeunes contenant peu d'HbF et des GR plus âgés protégés par des teneurs élevées en HbF. **Conclusion.** L'Hb glyquée mesurée par cytométrie en flux constitue un marqueur de choix pour évaluer l'âge relatif des GR.

Abstract. Introduction. Sickle cell disease caused by abnormal hemoglobin (HbS) is characterized by chronic hemolytic anemia. This is induced by premature elimination of red blood cells (RBCs). The lifespan of sickle cell RBCs (SS RBCs) is estimated at 20 days, compared with 120 days in healthy subjects. Fetal hemoglobin (HbF), a modulator of sickle cell disease severity by inhibiting HbS polymerization, has a positive effect on the lifespan of SS RBCs. The effect of HbF depends on its quantity in the cells and its distribution, which varies from one RBC to another. Precise quantification of the link between the amount of HbF per RBC and the lifespan of SS RBCs is limited by the absence of a rapid cell-by-cell means of measuring this lifespan. Glycated Hb (GHb or HbA1c), formed progressively throughout the life of RBCs by an irreversible non-enzymatic process, is an index of RBC aging. **Objectives.** Our aim is to develop a new method based on the measurement of GHb in each RBC by flow cytometry in order to i) assess the relative age of RBCs and, ii) estimate the prolongation of survival of SS RBCs as a function of the amount of HbF per cell. **Methods.** GHb and HbF were quantified by flow cytometry with fluorescent anti-HbA1c and anti-HbF antibodies, respectively, in healthy donors (AA) and non-diabetic SS patients. In transfused SS patients, a fluorescent anti-HbS antibody was used to discriminate between autologous GR-SS and transfused GR-AA. The amount of GHb in RBC subpopulations defined by HbF distribution (low- and high-HbF RBCs) was also assessed in SS patients. **Results.** Using our method capable of tracking multiple RBC populations in the same individual, we confirmed that: i) the lifespan of SS RBCs is drastically reduced compared with AA RBCs, ii) SS RBCs from hydroxyurea (HU)-treated patients survive longer than RBCs from untreated patients, iii) SS RBCs containing more HbF have a longer lifespan than SS RBCs with low HbF content, and iv) dense SS RBCs contain young RBCs containing little HbF and older RBCs protected by high HbF contents. **Conclusion.** Glycated Hb measured by flow cytometry is a marker of choice for assessing the relative age of RBCs.