

Thèse de Doctorat de l'Université Paris XII

Spécialité :

Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée par

Terkia MEDKOUR

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris XII

Sujet :

**Modélisation Mathématique et Simulation Numérique de
la Polymérisation de l'Hémoglobine Drépanocytaire**

Soutenance le 2 juillet 2008 devant le jury composé de :

Rapporteurs : Professeur Lionel LELIEVRE
Docteur Charles ROBERT

Examineurs : Professeur Frédéric GALACTEROS
Docteur Michael MARDEN
Docteur Ricardo GARAY
Docteur Alfredo HERNANDEZ
Docteur Patrick HANNAERT (Directeur de thèse)

Je dédie ce travail de thèse à la mémoire du Docteur Maria Ivanova
(Department of Physics, Drexel University, Philadelphia), qui m'a
toujours encouragée, en particulier avec cette phrase :
« we trust on you ».

Merci pour tout, Maria, et repose en paix.

Je tiens tout d'abord à remercier le directeur de cette thèse, Dr. Patrick HANNAERT, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais au début de ce travail en biologie -et en modélisation, puis pour m'avoir guidée, encouragée et conseillée tout au long de ces quatre années, à la fois difficiles et riches en rebondissements, en rencontres mûrissantes tant sur le plan personnel que sur le plan scientifique.

Mes remerciements vont également à Pr. Frédéric GALACTEROS pour la gentillesse et la patience qu'il a manifestées à mon égard durant cette thèse, pour son aide, pour ses conseils, et pour le temps qu'il a consacré à ce projet malgré ses nombreuses responsabilités, et aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de soutenance.

Mes vifs remerciements au Pr. Lionel LELIEVRE, directeur du laboratoire de Pharmacologie des transports ioniques membranaires, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et pour les conseils stimulants que j'ai eu la chance de recevoir de sa part, pour ses remarques pertinentes et aussi pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur et membre du jury de cette thèse

Je remercie Pr. Frank FERRONE, pour son aide précieuse, pour ses encouragements tout au long de ma thèse, pour sa gentillesse, pour son accueil chaleureux, pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour le bon déroulement de mon stage au sein de son laboratoire, et pour avoir contribué avec toute son équipe à faire de mon court séjour à Philadelphie un souvenir inoubliable.

Mes remerciements au Dr. Charles ROBERT, pour avoir accepté d'être Rapporteur de cette thèse, et je le remercie, de même que pour sa participation au Jury. Il a également contribué par ses nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je lui en suis très reconnaissante.

Les Docteurs Ricardo GARAY, Michael MARDEN, et Alfredo HERNANDEZ m'ont fait l'honneur de participer au Jury de soutenance; je les en remercie profondément.

Un grand merci au Pr. Gerard MAUCO, pour sa gentillesse et pour m'avoir si bien accueilli lors de mes passages dans son laboratoire.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue tout au long de ses presque quatre années, je pense plus particulièrement à mes quatre familles :

A mon père qui malgré la distance à toujours su être présent pour moi, merci papa pour ton amour, pour tes conseils, et pour ton soutien. Merci également à ma chère maman, à mes frères et sœurs en particulier ma sœur Fatiha qui m'a beaucoup supporté, et merci également à mes beau-frères.

Merci à ma famille Parisienne : Myriam, Albane mes précieux soutiens, Olivier, Sylvie, Delphine, Atimé et Jean- marc.

Merci à ma famille Poitevine : Charazede, Mathieu, François et toute l'équipe du Laboratoire "Ischémie-reperfusion en transplantation rénale"

Et Merci à ma famille américaine : Donna, Mikhail, Weijun, Zenghui et Alexy.

Table des matières

Remerciements

Table des matières

Avant propos

Chapitre I : L'hémoglobine et ses anomalies.....	1
I-1. L'OXYGENE ET LE SANG.....	2
I-1-A. SANG ET RESPIRATION.....	2
I-1-B. L'ERYTHROCYTE.....	3
I-2. L'HEMOGLOBINE.....	4
I-2-A. ORIGINE DES HEMOGLOBINES HUMAINES.....	4
I-2-B. LES DIFFERENTES HEMOGLOBINES HUMAINES.....	5
I-2-C. STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE.....	6
I-2-D. L'HEME.....	9
I-2-E. LES GENES DES GLOBINES.....	11
I-3. LES HEMOGLOBINOPATHIES.....	13
I-4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES & URL.....	15
Chapitre II : La drépanocytose, ou anémie falciforme.....	16
II-1. LA DREPANOCYTOSE.....	17
II-2. DREPANOCYTOSE ET HEMOGLOBINE S.....	21
II-3. LA CRISE VASOCLUSIVE.....	22
II-4. DESHYDRATATION ET TRANSPORT IONIQUE ERYTHROCYTAIRE.....	25
II-5. PATHOLOGIE VASCULAIRE ET ETIOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE...29	
II-6. TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE.....	35
II-7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	38
Chapitre III : Hémoglobine S et fibres polymères.....	43
III-1. LA STRUCTURE SPATIALE DE L'HEMOGLOBINE S.....	44
III-2. LES FORMES AGREGÉES DE L'HEMOGLOBINE S	45
III-3. LES FIBRES D'HEMOGLOBINE S	46
III-3-A. STRUCTURE DES FIBRES.....	46

III-3-B. INTERACTIONS MOLECULAIRE DANS LES FIBRES	47
III-4. PROCESSUS DE FORMATION DES FIBRES DE HbS	50
III-4-A. THERMODYNAMIQUE DE LA POLYMERISATION DE HbS.....	50
III-4-B. FACTEURS MODULATEURS DE LA POLYMERISATION DE HbS	56
III-4-C. EFFET DES AUTRES HEMOGLOBINES.....	61
III-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63
Chapitre IV : Rationnel et objectif : Modélisation de la polymérisation de HbS.....	68
IV-1. CINETIQUE DE POLYMERISATION DE L'HEMOGLOBINE S.....	69
IV-2. DETECTION EXPERIMENTAL DE LA FORMATION DES POLYMERES	69
IV-3. LE MODELE DE DOUBLE NUCLEATION.....	73
IV-4. APPROCHE CONCEPTUELLE ET OBJECTIF DE L'ETUDE.....	82
IV-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86
Chapitre V : Matériel et méthodes.....	90
V-1. PRESENTATION GENERALE DU MODELE DOUBLE NUCLEATION.....	91
V-1-A. DESCRIPTION MATHEMATIQUE DU MODELE INITIAL.....	91
V-1-B. LES EQUATIONS DU MODELE INITIAL.....	93
V-1-C. LES PARAMETRES DU MODELE INITIAL.....	99
V-2. CORRECTIONS ET MODIFICATIONS DU MODELE.....	100
V-3. ENVIRONNEMENT DE MODELISATION ET DE SIMULATION	104
V-4. ANALYSE DES COURBES DE POLYMERISATION ET COMPARAISON AUX COURBES EXPERIMENTALES.....	107
V-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	113
Chapitre VI : Résultats.....	115
VI-1. LE MODELE DE BASE.....	117
VI-1-A. CARACTERISTIQUES PRINCIPALES ET DYNAMIQUE.....	118
VI-1-B. EVALUATION DU MODELE DE BASE	125
VI-1-C. SENSIBILITE AUX PARAMETRES.....	127
VI-2. EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE LA NON IDEALITE.....	130
VI-2-A. EFFETS DE LA TEMPERATURE ET VITESSE HOMOGENE.....	130
VI-2-B. NON IDEALITE, VITESSE HOMOGENE ET VITESSE HETEROGENE....	133
VI-2-C. EVALUATION QUANTITATIVE.....	139

VI-3. AMELIORATION DE LA DESCRIPTION DE LA NON IDEALITE	146
VI-3-A. THEORIE ET APPLICATION.....	147
VI-3-B. EVALUATION DU MODELE III « NON- IDEALITE, CPT ».....	148
VI-3-C. PARAMETRES DU MODELE.....	148
VI-3-D. EVALUATION DE LA VERSION LINEAIRE.....	151
VI-3-E. ETUDE DU MODELE DYNAMIQUE INTEGRE.....	153
VI-4. LE MODELE « DOMAINES ».....	157
VI-4-A. DU MODELE III VERS LE MODELE IV : DEMARCHE.....	157
VI-4-B. LE MODELE « DOMAINES ».....	161
VI-4-C. EVALUATION DU MODELE « DOMAINES ».....	164
VI-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	169
Chapitre VII : Discussion.....	172
VII-1. PREAMBULE A LA DISCUSSION.....	173
VII-2. SYNOPSIS DE L'EVOLUTION DES MODELE I à IV.....	175
VII-3. MODELES I - III	177
VII-3-A. ANALYSE.....	178
VII-3-B. TRANSITION DU MODELE II AU III.....	181
VII-4. MODELE IV ET DOMAINES.....	185
VII-5. CONCLUSION.....	190
VII-6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	193
ANNEXE I	
ANNEXE II	
ANNEXE III	
ANNEXE IV	

Avant-propos

La drépanocytose, découverte par James Herrick en 1904, est une maladie héréditaire caractérisée par une mutation de l'hémoglobine. A ce jour, cette pathologie reste sans solution thérapeutique curative, ni même satisfaisante, malgré de nombreuses études et une accumulation considérable de connaissances -depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau physiologique et clinique.

La pathologie drépanocytaire résulte de la « simple » substitution d'un acide aminé positivement chargé (acide glutamique) par une valine -hydrophobe. Cette altération induit la formation, lorsque l'hémoglobine S est désoxygénée, de fibres polymères à sept doubles brins. Ces structures moléculaires réduisent la filtrabilité des globules rouges drépanocytaires (voire les déforment), entraînant le cas échéant l'obstruction des micro-vaisseaux. De nombreux facteurs modulent le processus de polymérisation : l'élévation de la concentration de l'hémoglobine S et de la température favorisent notamment la formation des polymères ; à l'inverse, la polymérisation est inhibée par la présence d'autres hémoglobines, principalement l'hémoglobine F (fœtale) –et par la réduction de la pression d'oxygène. Ces facteurs exercent leur influence de façon dynamique et en interactions mutuelles, ce qui rend le processus de polymérisation particulièrement complexe.

Le développement des outils informatiques dans le domaine de la Biologie, nous a conduit à concevoir un projet de modélisation intégrative de la polymérisation de l'hémoglobine S et de ses conséquences vasculaires. La seule description du processus de polymérisation de l'hémoglobine S s'avère être le modèle de F. Ferrone, Eaton et Hofrichter (1985), modèle dit de « double nucléation ». Contrairement à celui-ci, nous avons exploité dans notre travail la version complète et intégrée numériquement du modèle, ce qui était indispensable à nos objectifs.

La thèse présentée a été réalisée en trois ans et demi. Après implémentation -sous Simulink©, vérifications et corrections, puis mises à jour et évaluation quantitative, nous avons montré que le modèle restait incomplet, et non-adapté à la description de la dynamique de la polymérisation malgré l'intégration numérique complète. Avec pour objectif la reproduction aussi fidèle que possible des données expérimentales disponibles, nous avons consacré les deux dernières années de thèse à perfectionner le modèle. Les améliorations que nous avons apportées concernent des aspects numériques et mathématiques, thermodynamiques et cinétiques et, enfin, géométriques (« spatiaux ») du processus de polymérisation.

Nous sommes conscients que la première partie de ce travail est entremêlée à celui des créateurs du modèle initial. La raison en est double. D'une part, le projet est précisément construit sur la base de ce modèle; or, celui-ci, est incomplet et inapplicable dans une optique réaliste. Certes modifié au cours des années, mais de façon disparate et non globalisée –et toujours dans la version linéaire inadaptée à nos fins. Une partie importante de notre travail a donc été consacrée à la mise à jour du modèle. La spécificité et l'originalité de nos propres travaux émergent continûment au fur et à mesure que l'on progresse dans la section *Résultats*.

CHAPITRE I

L'hémoglobine et ses anomalies

I-1. L'OXYGENE ET LE SANG

I-1-A. SANG ET RESPIRATION

I-1-B. L'ERYTHROCYTE

I-2. L'HÉMOGLOBINE

I-2-A. ORIGINE DES HEMOGLOBINES HUMAINES

I-2-B. LES DIFFERENTES HEMOGLOBINES HUMAINES

I-2-C. STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE

I-2-D. L'HEME

I-2-E. LES GÈNES DES GLOBINES

I-3. LES HEMOGLOBINOPATHIES

I-4. REFERENCES

I-1. L'OXYGENE ET LE SANG

I-1-A. SANG ET RESPIRATION

Chez les organismes eukaryotes, dont les mammifères, l'oxygène moléculaire est utilisé pour produire l'essentiel de l'énergie nécessaire aux processus vitaux. Le couplage dynamique des mécanismes de respiration pulmonaire, de ventilation alvéolaire, de circulation sanguine et enfin de réaction-diffusion au sein même de la cellule, assure l'acheminement de l'oxygène atmosphérique jusqu'au niveau mitochondrial, et y maintient la pression requise pour la production d'ATP par la phosphorylation oxydative.

Chez l'homme, l'appareil circulatoire contient environ cinq litres de sang, ce qui représente environ 7% du poids corporel (70 kg). Le sang est un organe physiologique, constitué du plasma, liquide salin et tamponné, de couleur jaune clair, contenant entre autres électrolytes et protéines, dans lequel baignent les éléments figurés du sang (cf. Figures 1a et 1b): les érythrocytes, les leucocytes ou globules blancs (granulocytes, monocytes et lymphocytes) et les thrombocytes (plaquettes).

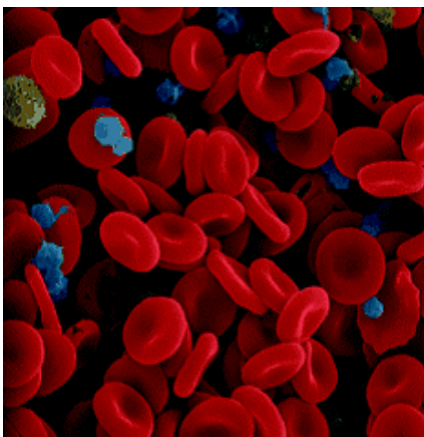


Figure 1a : Eléments figurés du sang humain (microscopie électronique)
url :pages.usherbrooke.ca/

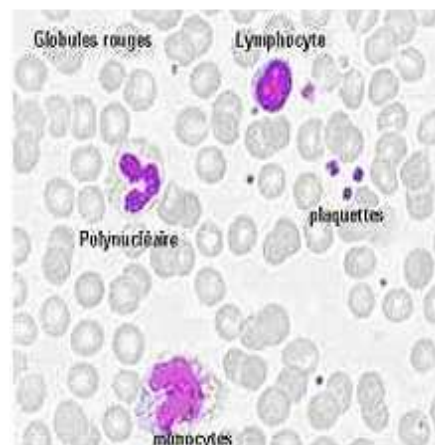


Figure 1b : Eléments figurés du sang humain (microscopie optique)
url :pages.usherbrooke.ca/

L'une des multiples fonctions du sang est le transport d'électrolytes et de substances nutritives (glucose, acides aminés,...) et des gaz respiratoires (O_2 , CO_2). Ce dernier est assuré en majeure partie par les érythrocytes et l'hémoglobine.

I-1-B. L'ERYTHROCYTE

L'érythrocyte, appelé aussi hématie, normocyte ou globule rouge, est une cellule très simplifiée, anucléée chez l'homme et les mammifères, produite essentiellement dans la moelle osseuse à partir de cellules mères, les érythroblastes médullaires (chez le fœtus, les érythrocytes sont également produits par la rate et le foie). L'érythrocyte se présente sous la forme d'un disque biconcave, d'un diamètre de 7 à 8 μm . Il est doué d'une grande déformabilité qui lui permet de franchir des capillaires d'un diamètre inférieur au sien. Ceci permet effectivement le transport d'oxygène depuis les poumons jusqu'aux cellules de l'organisme, mais cette spécialisation implique : une brève survie cellulaire (environ 120 jours), une orientation spécifique du métabolisme pour protéger le pigment respiratoire. De fait, la couleur rouge de l'érythrocyte provient de ce pigment, et constituant principal, à savoir l'hémoglobine. La figure 2 ci-dessous schématise la forme de l'érythrocyte (section sagittale) et résume les dimensions moyennes.

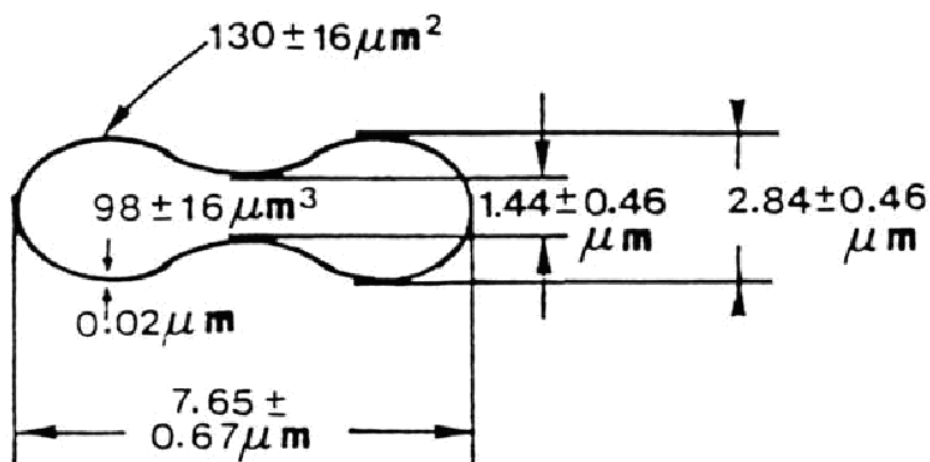


Figure 2 : Dimensions moyennes du globule rouge humain
guillaume.lenormand.free.fr/pdf/these.pdf

1-2. L'HÉMOGLOBINE

1-2-A. ORIGINE DES HEMOGLOBINES HUMAINES

L'origine de l'arbre phylogénique des hémoglobines remonte à près de 2 milliards d'années, précisément à l'époque où l'oxygène commençait à s'accumuler dans l'atmosphère terrestre. Les "hémoglobines" sont présentes chez presque toutes les espèces vivantes, qu'il s'agisse de micro-organismes, de plantes ou d'animaux. Toutes ces molécules ont en commun une même structure spatiale, caractérisée par le repliement d'une chaîne polypeptidique, constituée de 6 à 8 hélices, autour d'une cavité hydrophobe contenant une molécule d'hème.

Il est probable que chez les organismes unicellulaires, les plantes et les petits invertébrés, chez qui la molécule d'hémoglobine présente une affinité considérable pour l'oxygène, la fonction principale de cette molécule n'était pas le transport d'oxygène, mais plutôt la protection contre les effets toxiques de l'O₂, du CO et du NO. Ce n'est que chez les espèces pluricellulaires, plus « évoluées », qu'est apparue la fonction de transport et de stockage d'oxygène que l'on considère comme la fonction physiologique majeure de cette molécule. Cette fonction est apparue il y a quelques 750 millions d'années et a conduit à trois grandes familles de « globines » :

- les myoglobines, qui servent au stockage de l'oxygène à proximité d'organes comme le muscle qui en font une consommation importante (ainsi qu'au transport intracellulaire),
- les hémoglobines, qui assurent le transport de l'oxygène depuis la périphérie (les organes respiratoires tels que les poumons) jusqu'aux tissus,
- les neuroglobines, apparues très tôt dans l'évolution, présentes dans le système nerveux central et dans la rétine. Elles auraient un rôle de protection contre l'anoxie dans ces zones particulièrement sensibles.

I-2-B. LES DIFFERENTES HEMOGLOBINES HUMAINES

Chez les vertébrés, à l'exception de la lamproie (poisson « primitif », de type agnathe), l'hémoglobine est un hétéro-tétramère constitué de deux types de sous-unités de structure voisine (structure générique : X_2Y_2): l'un appartient à la famille α et l'autre à la famille β .

Les différentes hémoglobines qui se succèdent ontologiquement se distinguent par la nature des sous-unités qui les constituent. Chez l'homme, il existe deux commutations (« switch »), l'un pour le passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale, et le second pour le passage de la vie fœtale à la vie adulte ([Steinberg 2006; Frenette and Atweh 2007]).

Durant la vie embryonnaire : A la place de la sous-unité α présente dans l'hémoglobine mature, on trouve la sous-unité ζ . De même, à la place de la sous-unité β se trouve la chaîne ε , spécifique de cette période initiale de la vie ; sont également présentes les chaînes γ (ou fœtales). La combinaison de ces sous-unités produit les trois hémoglobines de l'embryon, l'hémoglobine Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), l'hémoglobine Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) et l'hémoglobine Portland ($\zeta_2\gamma_2$).

L'hémoglobine F : HbF est détectable à partir de la 5^{ème} semaine, est le constituant hémoglobinique principal de cette période de la vie. L'hémoglobine F ($\alpha_2\gamma_2$) est produite dès les premiers stades de la gestation. Elle atteint entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine un taux de 90 % qui reste ensuite à peu près constant jusqu'à la naissance. Peu avant la naissance, entre la 32^{ème} et la 36^{ème} semaine de gestation, les chaînes γ sont progressivement remplacées par les chaînes polypeptidiques de globine adulte.

Hémoglobines de l'adulte : Le profil électrophorétique de l'hémoglobine caractéristique de l'adulte s'observe à partir de l'âge de six mois mais peut, de façon non-exceptionnelle, être retardé. L'hémoglobine A, représente alors plus de 95 % de la totalité des hémoglobines. Il existe en outre un constituant mineur, l'hémoglobine A2 ($\alpha_2\delta_2$), dont la synthèse débute dans la période néonatale et qui est exprimée à un taux d'environ 2,5 %. Chez

l'adulte normal, l'hémoglobine F ne subsiste plus qu'à l'état de traces inférieures à 1 % et reste limitée à une population cellulaire restreinte, les "cellules F". Ces dernières, dont le nombre semble génétiquement déterminé, représentent 1 à 7 % de l'ensemble des érythrocytes, et correspondraient à des hématies dont la différenciation est distincte de celle des cellules ne synthétisant que de l'hémoglobine A.

I-2-C. STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE

La molécule d'hémoglobine est un tétramère formé par l'association de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux-à-deux : deux chaînes α (α -globines, 141 acides aminés) et deux chaînes β (β -globines, 146 acides aminés). Chaque chaîne adopte une conformation spatiale lui conférant une forme globuleuse et ménageant une « poche superficielle » dans laquelle se trouve logé l'hème. La cohérence du tétramère $\alpha_2\beta_2$, ie. sa structure quaternaire, résulte principalement de liaisons « faibles », établies par les chaînes latérales hydrophobes des acides aminés situés à la périphérie des chaînes protéiques (cf. Figure 5).

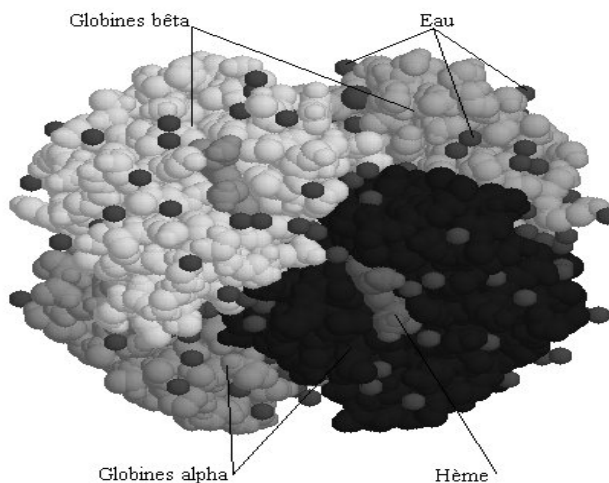


Figure 3 : Image 3D représentant la structure de la molécule de l'hémoglobine
url : www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/

La séquence primaire des chaînes α et β se présente comme suit (pour le codage des acides aminés, cf. Figure 5).

Chaîne α : V-L-S-P-A-D-K-T-N-V-K-A-A-W-G-K-V-G-A-H-A-G-E-Y-G-A-E-A-L-E-R-M-F-L-S-F-P-T-T-K-T-Y-F-P-H-F-D-L-S-H-G-S-A-Q-V-K-G-H-G-K-K-V-A-D-A-L-T-N-A-V-A-H-V-D-D-M-P-N-A-L-S-A-L-S-D-L-H-A-H-K-L-R-V-D-P-V-N-F-K-L-L-S-H-C-L-L-V-T-L-A-A-H-L-P-A-E-F-T-P-A-V-H-A-S-L-D-K-F-L-A-S-V-S-T-V-L-T-S-K-Y-R

Chaîne β : V-H-L-T-P-E-E-K-S-A-V-T-A-L-W-G-K-V-N-V-D-E-V-G-G-E-A-L-G-R-L-L-V-V-Y-P-W-T-Q-R-F-F-E-S-F-G-D-L-S-T-P-D-A-V-M-G-N-P-K-V-K-A-H-G-K-K-V-L-G-A-F-S-D-G-L-A-H-L-D-N-L-K-G-T-F-A-T-L-S-E-L-H-C-D-K-L-H-V-D-P-E-N-F-R-L-L-G-N-V-L-V-C-V-L-A-H-H-F-G-K-E-F-T-P-P-V-Q-A-A-Y-Q-K-V-V-A-G-V-A-N-A-L-A-H-K-Y-H

Une chaîne polypeptidique α (ou β) présente sept (ou huit) segments en forme d'hélice droite reliés par des segments comportant parfois des coudes. Bien que les chaînes α et β aient des séquences différentes, elles présentent des structures tertiaires très similaires.

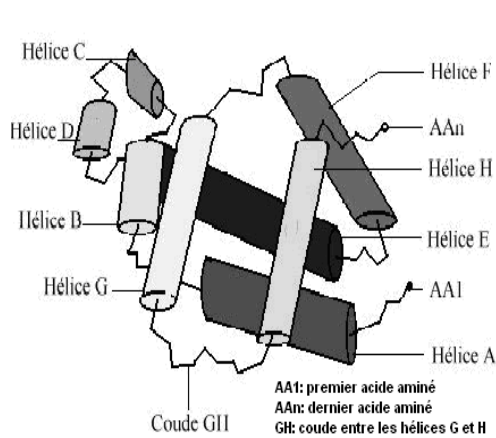
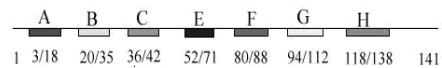


Figure 4a : Schéma de la globine β
[url :www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/](http://www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/)

Chaîne alpha : 141 acides aminés



Chaîne bêta : 146 acides aminés

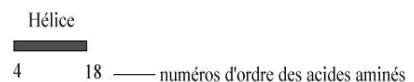
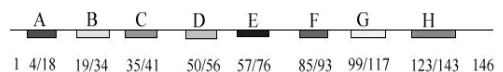


Figure 4b : Structure des chaînes α et β
[url :www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/](http://www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/)

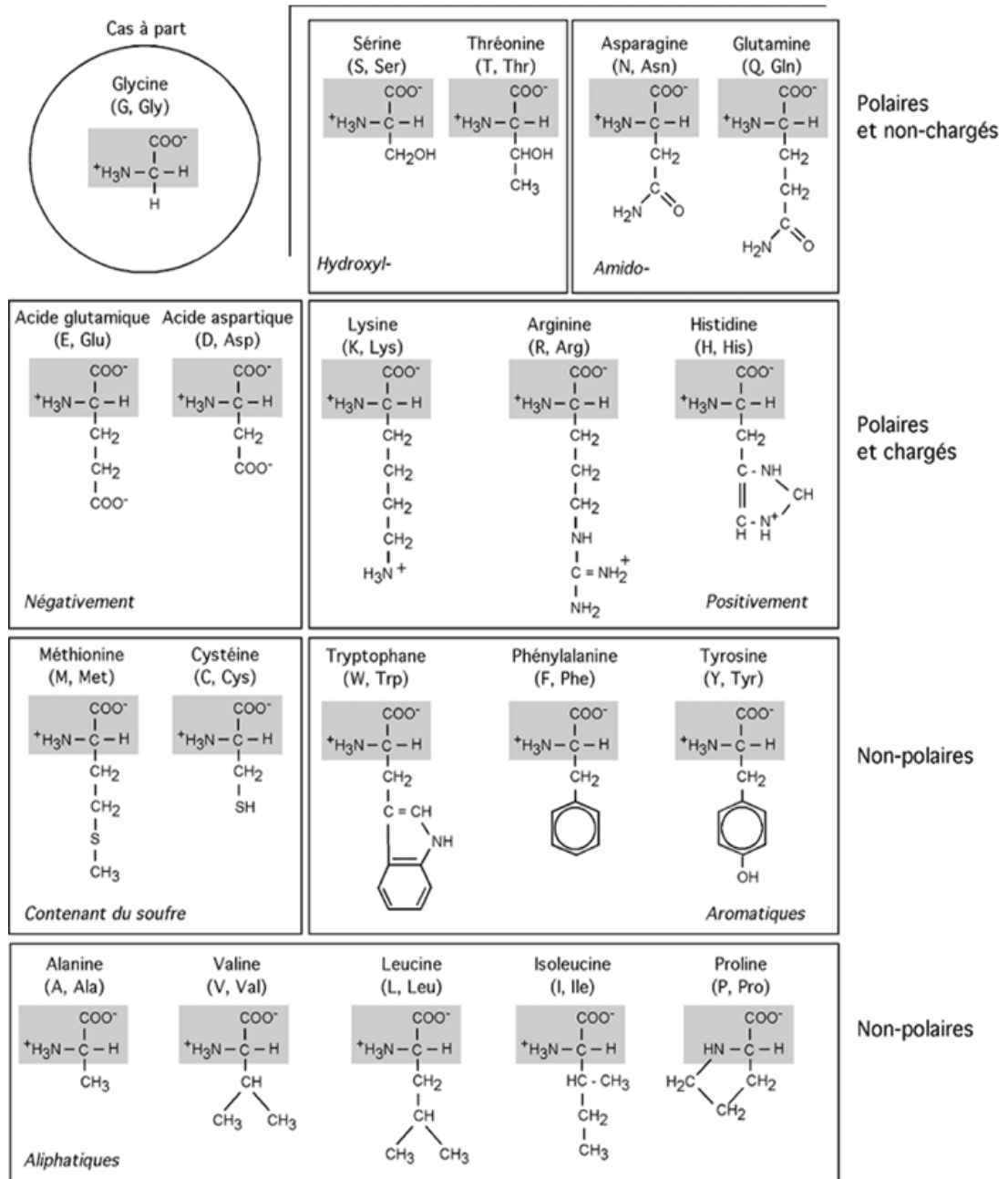


Figure 5 : Les acides aminés et leurs codes

[url :pages.usherbrooke.ca/](http://pages.usherbrooke.ca/)

La structure tétramérique de l'hémoglobine résulte de l'association de deux dimères fonctionnels : $\alpha 1-\beta 1$ et $\alpha 2-\beta 2$, disposés de façon à ce que la sous-unité $\alpha 1$ soit au contact de la sous-unité $\beta 2$ et $\alpha 2$ de $\beta 1$. La disposition des chaînes est telle que des rapports très étroits existent entre chaînes latérales de résidus appartenant aux sous-unités non homologues. A l'inverse, il n'existe qu'un faible nombre de contacts entre sous-unités identiques.

Trois zones de contact sont à distinguer :

- (i) contacts entre sous-unités d'un même dimère ($\alpha 1-\beta 1$ ou $\alpha 2-\beta 2$)
- (ii) contacts entre chaînes non-homologues de deux dimères différents ($\alpha 1-\beta 2$ ou $\alpha 2-\beta 1$) ; c'est au niveau de cette zone que s'effectuent les mouvements de glissement et de rotation qui accompagnent la modification de conformation de l'hémoglobine lors de la fixation de l'oxygène moléculaire. Les résidus en contact diffèrent pour chacune des configurations.
- (iii) contacts entre chaînes homologues : le plus important d'entre eux est établi entre les chaînes β , au niveau de la cavité centrale par l'intermédiaire d'une molécule de 2,3 diphosphoglycérate (2,3-DPG, métabolite spécifique de l'érythrocyte), qui stabilise la configuration désoxygénée.

Dans la désoxyhémoglobine, des interactions électrostatiques faisant intervenir l'ion Cl^- s'établissent également entre l'extrémité C-terminale d'une chaîne α et l'extrémité N-terminale de l'autre.

I-2-D. L'HEME

La molécule d'hème est une molécule plane, ou légèrement bombée, selon le groupe lié à sa sixième valence de coordination. Sa structure est connue depuis le début du siècle : elle est constituée par une protoporphyrine ayant en son centre un atome de fer. La protoporphyrine est formée de quatre cycles pyrroliques unis par l'intermédiaire de ponts méthényles ($-\text{CH}=\text{}$) et substitués par des groupes méthyle, propionate et vinyle. Que la molécule d'hémoglobine soit oxygénée (oxyhémoglobine) ou désoxygénée (désoxyhémoglobine), le fer reste sous sa forme réduite (Fe^{++}).

Dans l'oxyhémoglobine, l'atome de fer présente six liaisons de coordination : quatre d'entre elles interviennent dans la structure de l'hème, la cinquième amarre l'hème à la globine au niveau de l'histidine F8 (histidine proximale) et la sixième fixe l'oxygène appelé "ligand". Ce ligand est en rapport avec l'histidine E7 (histidine dite « distale »). Dans la désoxyhémoglobine, où aucun ligand n'occupe la face distale de l'hème, le fer est pentacoordiné. Par suite d'une distribution différente des électrons dans les couches périphériques, le volume de cet atome augmente. Ces changements de taille sont à la base même des mécanismes de modifications de configuration protéique accompagnant la fixation d'oxygène. Le rôle de la protéine entourant l'hème peut très schématiquement se résumer à :

- (i) une mise en position optimale de la molécule d'oxygène,
- (ii) une protection contre l'oxydation,
- (iii) une modulation de la fonction oxyphorique.

La fixation d'une molécule d'oxygène sur une sous-unité entraîne des modifications au niveau de la poche de l'hème, qui se répercutent sur l'extrémité C-terminale de la chaîne β et ainsi que sur les contacts entre sous-unités. Un mouvement de glissement et de rotation se produit ainsi au niveau de l'interface $\alpha_1\beta_2$. La conformation T (ou *Tense*) correspond à la forme désoxygénée et la conformation R (*Relaxed*) à la forme oxygénée. Lors de la transition de la configuration désoxygénée vers la configuration oxygénée, le 2,3-DPG est expulsé de la cavité centrale.

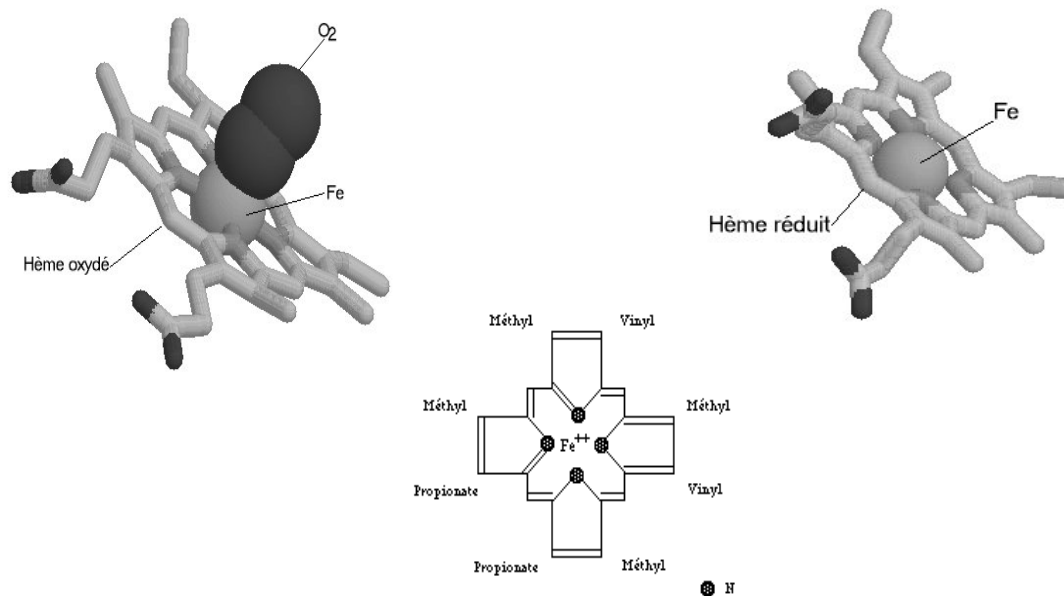


Figure 6 : Schémas de l'hème (protoporphyrine IX)
 url : www.inrp.fr/Acces/biotic/gpe/dossiers/drepanocytose/

1-2-E. LES GÈNES DES GLOBINES

Des études génétiques ont montrés que les mutants de la chaîne α sagréaient de façon indépendante de ceux des chaînes β ou δ , ce qui indiquait une localisation de ces gènes sur des chromosomes différents. Par ailleurs, quelques hémoglobines anormales (ex.: Hb Lepore), provenant de gènes de fusion (ex.: $\delta\beta$), ont apporté de précieux renseignements sur l'organisation séquentielle des gènes de globine sur le chromosome.

La localisation chromosomique de ces gènes a ultérieurement été déterminée de façon précise par les techniques de fusion cellulaire et d'hybridation. Les gènes de la famille α sont situés sur le chromosome 16 dans la région distale entre 16 p 12 et 16 p ter et ceux de la famille β sur le chromosome 11 dans la région 11 p 125 p128.

On connaît aujourd'hui la cartographie détaillée de ces deux groupes de gènes (cf. Figure 7, partie supérieure). La famille α comporte trois gènes fonctionnels (ζ , α_2 et α_1) et la

famille β cinq (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, β et δ). De plus, il existe des séquences assez similaires à celles des gènes mais ne codant pour aucune chaîne polypeptidique et de ce fait appelées pseudo-gènes ($\psi\zeta$, $\psi\alpha1$, $\psi\alpha2$ et $\psi\beta$). En 3' de la famille des gènes α , il existe un gène θ qui pourrait être actif dans les tissus érythroïdes primitifs de l'embryon. L'ordre séquentiel des gènes, de 5' en 3', sur le chromosome est le même que celui de leur expression au cours du développement.

Les séquences nucléotidiques des gènes de globine et de leur environnement sont aujourd'hui établies (cf. Figure 7, partie inférieure). Les gènes de globine comportent trois zones codantes (ou exons) séparées par deux zones non-codantes (introns ou IVS). Il existe également des zones non codantes situées en 3' et 5' du gène (*flanking regions*). Les introns (IVS) débutent classiquement par une séquence GT et se terminent par une séquence AG (loi de Chambon).

Les gènes α , β et ζ diffèrent considérablement par la taille des introns. Un promoteur est situé en 5' de la région transcrite du gène. Cette zone, impliqué dans la fixation de l'ARN polymérase comporte la séquence ATA qui se situe à une trentaine de nucléotides du site codant pour la coiffe, la séquence "CCAAT...", localisée entre les nucléotides -70 à -80, et une séquence plus variable, "CACC...", située entre les nucléotides -80 et -100. Le gène γ possède entre les séquences -170 et -190 une région de séquence GATA fixant des facteurs de régulation érythroïde spécifique.

Il existe également des séquences activatrices (*enhancers*) et inhibitrices (*silencers*) régulant le niveau d'expression des gènes au cours de l'évolution. La séquence AATAA, en 3' serait le signal de terminaison pour la polymérase ou un site de reconnaissance pour la polyadénylation. Des séquences de spécificité tissulaire, appelées LCR (*Locus Control Region*) sont situées en 5' à distance du complexe β et α . Elles permettent une expression efficace et coordonnée des gènes qu'elles contrôlent (cf. [Frenette and Atweh 2007]).

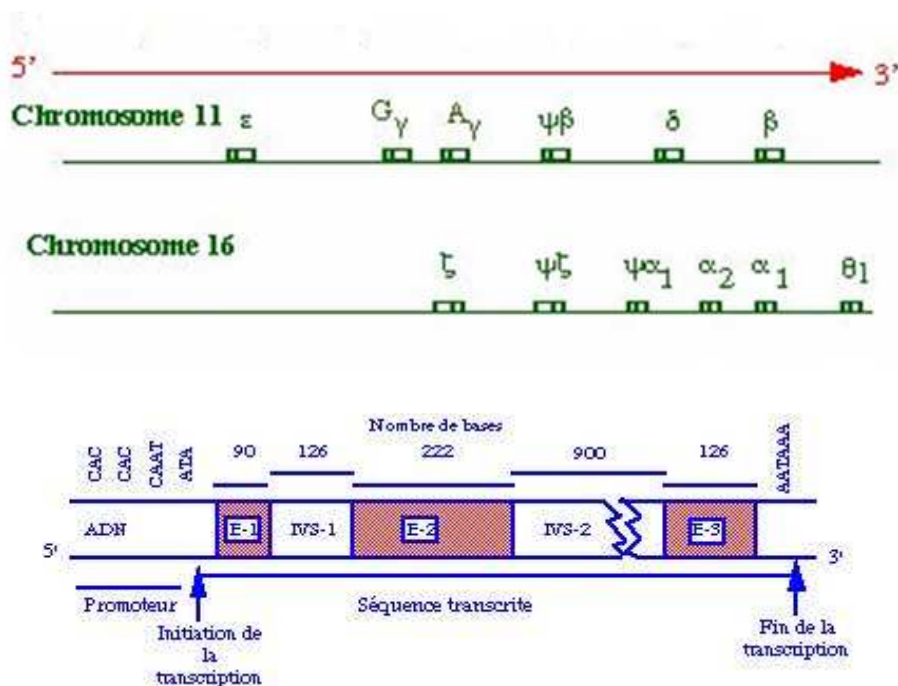


Figure 7: Les gènes des globines α et β
url: rbc.gs-im3.fr

I-3. LES HEMOGLOBINOPATHIES

Les hémoglobinopathies se subdivisent en deux groupes. Le premier correspond à la présence d'une hémoglobine de structure anormale et le second à un défaut de synthèse, partiel ou total, de l'une des sous-unités d'hémoglobine (thalassémies). Il existe en réalité un certain chevauchement entre ces deux catégories puisque, notamment, certaines hémoglobines de structure anormale se comportent comme des mutants thalassémiques.

Le groupe des hémoglobinopathies à « hémoglobines anormales », auquel appartient la drépanocytose, représente plus de 900 variants d'hémoglobine répertoriés -et ce nombre augmente régulièrement. Ces hémoglobines variantes peuvent être classifiées comme suit (cf. [Lubin et coll. 1991; Kutlar 2007]) :

- Le premier groupe comporte les mutants qui sont à l'origine de problèmes de santé publique majeurs. HbS dans les populations d'origine africaine, et HbE dans les populations du Sud Est Asiatique en sont des exemples. Dans ces populations, où la prévalence de ces

hémoglobinopathies est forte, ces mutants doivent être diagnostiqués pour permettre un conseil génétique efficace.

- Le second groupe comporte des variants plus rares, mais présent dans les populations où l'HbS a une forte prévalence. C'est le cas des Hb's C, O-Arab ou D-Punjab, qui par elles-mêmes n'ont qu'un effet pathologique minime mais qui, associées à HbS, conduisent à des syndromes drépanocytaires majeurs.
- Un troisième groupe est constitué par ces variants rares à l'origine de désordres hématologiques variés. Il comporte les hémoglobines instables qui sont la cause d'anémies hémolytiques chroniques, les hémoglobines à forte affinité pour l'oxygène responsables de polyglobulies, d'hémoglobines à faible affinité pour l'oxygène responsables d'anémies avec cyanose ou encore des hémoglobines M, causes de méthémoglobinémies. Les hémoglobines instables peuvent également interagir avec des traits thalassémiques. Ainsi des mutants instables de la chaîne β peuvent conduire à des tableaux de thalassémie intermédiaire, et ceux de la chaîne α à des hémoglobinoses H.
- Un dernier groupe de variants comporte des polymorphismes souvent utiles comme marqueurs de population. Parfois il s'agit de mutations privées propre à un petit nombre d'individus ou de familles. Ces mutants sont habituellement totalement silencieux sur le plan clinique. Un certain nombre d'entre-eux ont été découverts lors d'études systématiques de populations à la recherche des hémoglobinopathies majeures. D'autres ont été découvertes parce qu'elles interféraient avec d'autres tests biologiques. Ces mutants doivent être caractérisés et rapportés dans les banques de données pour éviter qu'ils ne soient confondus avec des mutants aux conséquences cliniques sévères.

I.4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES & URL's

Frenette, P. S. and G. F. Atweh (2007). "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." J Clin Invest **117**(4): 850-8.

Kutlar, A. (2007). "Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder." Hemoglobin **31**(2): 209-24.

Lubin, B. H., H. E. Witkowska and K. Kleman (1991). "Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies." Clin Biochem **24**(4): 363-74.

Steinberg, M. H. (2006). "Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease." Trends Pharmacol Sci **27**(4): 204-10.

URL's :

<http://pages.usherbrooke.ca>

<http://guillaume.lenormand.free.fr/pdf/these.pdf>

http://rbc.gs-im3.fr/DATA/VFHW_CD/VFgeneglob.html

<http://pages.usherbrooke.ca/bcm-514-bl/1a.html>

<http://ednes.com/gds/po5.htm>

CHAPITRE II

La drépanocytose, ou anémie falciforme

II-1 LA DREPANOCYTOSE

II-2 DRÉPANOCYTOSE ET HEMOGLOBINE S

II-3 LA CRISE VASOCLUSIVE

II-4 DESHYDRATATION ET TRANSPORT IONIQUE ERYTHROCYTAIRES

II-5 PATHOLOGIE VASCULAIRE ET ETIOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE

II-6 TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE

II-7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

II-1 LA DREPANOCYTOSE

La drépanocytose, ou anémie falciforme (*sickle cell disease*), est une maladie systémique dont la cause est une mutation de l'une des chaînes de l'hémoglobine. Ses principales manifestations cliniques aiguës sont des épisodes vasooclusifs, douloureux et récurrents, priapisme et « syndrome thoracique aigu », ainsi que des accidents vasculaires, cérébraux ou cardiaques. Les conséquences chroniques sont une anémie de type hémolytique, des dommages aux organes, dont une insuffisance rénale, et une réduction de l'espérance de vie.

La drépanocytose est particulièrement répandue en Afrique, où ses dénominations populaires sont : « SS » (région Bantou) et « les hématies » (Afrique de l'ouest ; [Galactéros 2000]). Il s'agit d'une maladie génétique autosomique, dont le gène anormal est porté par un chromosome non-sexuel. Elle est dite « récessive » car la présence des deux gènes anormaux est requise pour que la maladie s'exprime. Ainsi, seuls les individus homozygotes sont malades. Les hétérozygotes sont dits porteurs du « trait drépanocytaire » (ou porteurs sains).

La mutation qui produit HbS, comme les autres anomalies de l'hémoglobine portées par le gène β , est transmise selon le mode mendélien codominant. Lorsque l'un des parents est normal et l'autre hétérozygote pour l'HbS, la moitié des enfants seront hétérozygotes. Lorsque les deux parents sont hétérozygotes, 50% des enfants seront hétérozygotes, 25% seront homozygotes et 25% normaux (cf. figure 8).

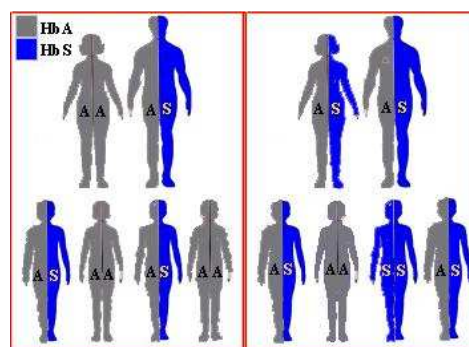


Figure 8 : Transmission de l'HbS
url : <http://rbc.gs-im3.fr/>

La drépanocytose est due à une mutation unique, ponctuelle, du gène β -globine situé sur le chromosome 11 (*locus* 11p 11-5 ; le 11 indique la 11^{ème} paire de chromosome, le *p* indique qu'il se situe sur le bras court du chromosome et 11-5 révèle la position exacte du *locus*). La mutation du 6^{ème} codon de l'exon I (GAG → GTG) entraîne le remplacement de l'acide glutamique N6 présent dans l'hémoglobine A par une valine (cf. section suivante). L'hémoglobine qui en résulte est dite hémoglobine S, ou HbS. Il a été observé sous certaines conditions que les globules rouges drépanocytaires peuvent adopter une forme de *faux* (cf. figure 10), d'où le nom d'anémie falciforme ou drépanocytose [***drépano** : du grec *drepanon* [drépano-], faux faucille; * **cyto** : du grec *kutos* [cyto-, -cyte, -cylie], cellule ; * **ose** : du grec *-ôsis* [-ose], suffixe désignant des maladies non-inflammatoires ou/et des états chroniques (*url* : <http://georges.dolisi.free.fr/Terminologie/D/drepano.htm>)].

Le trait drépanocytaire est largement répandu (cf. figure 8). C'est dans certaines régions d'Afrique que sa prévalence est la plus élevée, mais on le rencontre aussi dans des populations originaires d'Afrique équatoriale, du bassin de la Méditerranée et de l'Arabie saoudite. En Afrique, les taux de prévalence les plus élevés du trait drépanocytaire sont enregistrés entre le 15^{ème} parallèle nord et le 20^{ème} parallèle sud, atteignant entre 10 et 40% de la population dans certaines régions. Ces taux sont plus faibles ailleurs, se situant entre 1 et 2% en Afrique du nord, et en dessous de 1% en Afrique australe. Dans des pays comme le Cameroun, la République du Congo, le Gabon, le Ghana et le Nigeria, l'incidence varie entre 20 et 30%, tandis que dans certaines régions de l'Ouganda, elle atteint 45%. Dans les pays où la prévalence du trait drépanocytaire est supérieure à 20%, la maladie affecte environ 2% de la population.

Il est intéressant de noter que la répartition géographique du trait drépanocytaire est très similaire à celle du paludisme. De fait, le trait drépanocytaire a un effet protecteur partiel contre le paludisme et ceci peut expliquer pourquoi il s'est maintenu à de tels niveaux élevés

de prévalence en Afrique tropicale. Les enfants qui héritent du gène des deux parents, ne bénéficient pas de cette protection. Ils souffrent, en outre, d'effets graves de la drépanocytose et beaucoup d'entre eux décèdent avant d'atteindre l'âge de la procréation (Rapport OMS, 2006).

Les migrations de population post-coloniales ont fait apparaître les hémoglobinopathies au rang des maladies génétiques fréquentes dans les métropoles européennes. En France métropolitaine, le dépistage néonatal met en évidence de fortes disparités régionales avec des prévalences chez les populations à risque de 0,05% dans le Nord et le Sud et 0,2% en Ile-de-France. De 220 à 250 sujets drépanocytaires naissent chaque année en France. La population totale des patients est de plus de 5 000, dont 3 000 en Ile-de-France, et 2 000 dans les territoires d'Outre-Mer. A la fin des années 80, l'espérance de vie médiane était de l'ordre de 46 ans [Galactéros 2000].

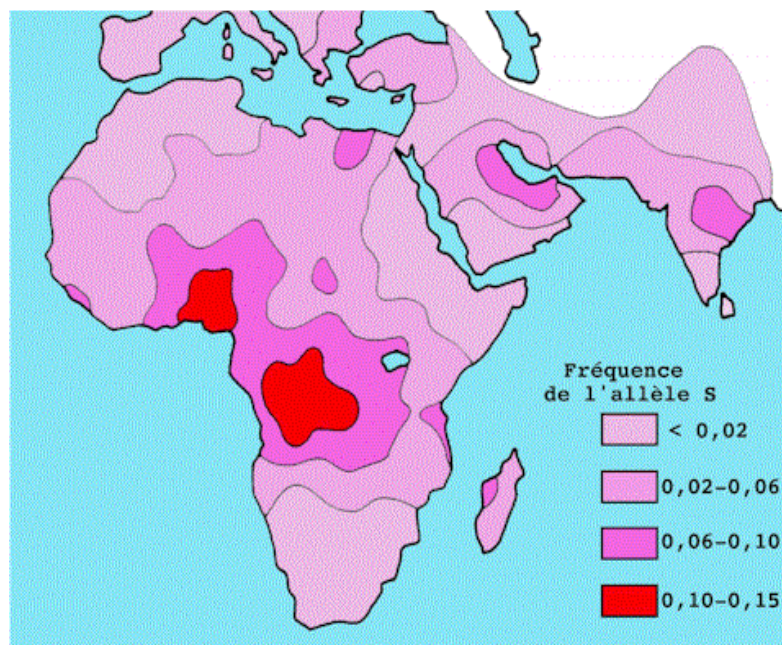


Figure 9 : Distribution géographique de la drépanocytose
url : http://genet.univ-tours.fr/gen001700_fichiers/htm

Du point de vue clinique, les syndromes drépanocytaires appartiennent à la famille des anémies hémolytiques (elles englobent différents types d'anémie où les globules rouges sont détruits prématurément dans le sang) chroniques qui exposent les patients à toute la palette des complications communes à ce type de pathologie: épisodes d'anémie aiguë, troubles nutritionnels secondaires, hypersplénisme (activité excessive de la rate) aiguë et chronique, complications lithiasiques (formation de calculs) des voies biliaires, troubles du métabolisme du fer, effets secondaires des transfusions. Par ailleurs, on observe également une large palette de symptômes et troubles, dont:

- un risque infectieux bactérien fortement majoré;
- des accidents vasoobstructifs, dont la forme la plus fréquente sont la crise algique osseuse ; la crise algique affecte le rachis, le thorax ou les membres et entraîne une invalidité temporaire complète;
- des atteintes vasculaires évolutives : rétinopathie, artériopathie cérébrale, néphropathie ischémique, myocardiopathie, ulcère des jambes ([Schnog et coll. 2004]);
- les séquelles de nécroses antérieures dont prédominent les atteintes osseuses aseptiques des fémurs et humérus, les syndromes restrictifs pulmonaires, les surdités, les impuissances, les déficits moteurs.

Il faut ajouter que certains traitements, et en particulier l'administration d'hydroxyurée (cf. sections II-5 et II-6), occasionnent des effets secondaires qui ne peuvent être négligés [Galactéros 2000]. Enfin, les multiples souffrances, menant le cas échéant à des cas de dépendance aux antalgiques, alimentent une psychopathologie qui peut prendre le pas sur les circonstances qui la génèrent.

II-2 DRÉPANOCYTOSE ET HEMOGLOBINE S

Des observations concernant une maladie avec des atteintes articulaires, osseuses et des crises hyperalgiques chez des sujets d'origine africaine et remontant au 19^{ème} siècle peuvent être retracées dans la littérature médicale occidentale. La première observation établissant un lien entre de telles manifestations cliniques et une anomalie érythrocytaire est due à James Herrick, un médecin de Chicago. En 1910, celui-ci a observé, dans le sang d'un de ses étudiants, originaire de Grenade, la présence de globules rouges « allongés » et qui avaient une forme comparable à celle de la "lame de la faux d'un fermier", *sickle* en anglais.

En 1927 apparaît une notion majeure: la déformation des globules rouges ne se produit qu'à basse tension d'oxygène et elle est généralement réversible. Dans la foulée, on distingue des sujets chez qui la falciformation est massive et accompagne une maladie sérieuse, par opposition à leurs parents chez qui l'anomalie est un trait sans manifestation pathologique.

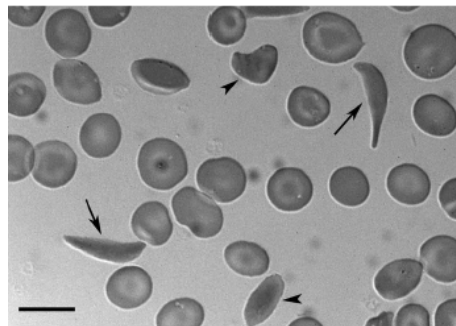
La découverte clef qui unifiera toutes ces observations est faite en 1949 par Pauling, Itano, Singer et Wells qui mettent en évidence une différence de mobilité électrophorétique entre l'hémoglobine « S » et l'hémoglobine « A », normale (HbA ; [Pauling et coll. 1949]). L'HbS portait une charge positive supplémentaire (le remplacement de β -Glu 6 par une Val, représente effectivement une perte nette d'une charge négative).

Il s'agissait de la première démonstration qu'une protéine anormale était à l'origine d'une pathologie : la notion de « maladie moléculaire » venait de faire son entrée en médecine. Chez les sujets malades (homozygotes), seule l'hémoglobine S existe tandis que chez les porteurs du trait (hétérozygotes), les deux hémoglobines HbA et HbS sont exprimées, cette dernière dans une proportion d'environ 40 %. Il s'agit donc d'une maladie héréditaire à expression codominante.

La démonstration initiale de mobilité différentielle a été réalisée en électrophorèse sur veine liquide, technique particulièrement délicate qui, dans les années suivantes, a été remplacée par l'électrophorèse de zone -sur papier, sur gel d'amidon ou sur acétate de cellulose. Ces méthodes, de pratique beaucoup plus simple, ont permis la mise en évidence de la plupart des autres mutants de l'hémoglobine.

Dans les années 1956-1959, Ingram identifie la différence de structure primaire (ie. de séquence) entre l'hémoglobine A et l'hémoglobine S [Ingram 1958; Hunt and Ingram 1958; Ingram 1959]. A l'aide de la technique du "fingerprint" (empreinte) d'un hydrolysate tryptique, où les peptides sont séparés sur une feuille de papier dans une dimension selon leur charge et dans l'autre selon leur hydrophobicité, Ingram et coll. ont observé le déplacement d'une tache unique par rapport à un échantillon normal : il s'agissait du premier peptide de la chaîne β où l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une valine. Plus tard, le déchiffrement de l'ADN a mené à l'identification de la mutation au niveau du gène β -globine ([url :http://rbc.gs-im3.fr/DATA](http://rbc.gs-im3.fr/DATA)).

Figure 10 : Image en microscopie optique montrant la forme en faucille prise par certaines hématies drépanocytaires (Frenette and Atweh, 2007)



II-3 LA CRISE VASOCLUSIVE

Le déclenchement de crises vasoocclusives, associées à des douleurs intenses, constitue le symptôme le plus handicapant chez les patients drépanocytaires. Certains signes cliniques peuvent précéder -ou accompagner l'apparition des crises: infections, déshydratation, fatigue

physique, traumatisme, stress psychologique [Thomas et coll. 1984]. Bien qu'il n'ait pas été formellement prouvé que ces événements soient en relation causale avec les crises douloureuses, dans certains cas au moins, il y a une forte évidence clinique en faveur des mécanismes impliqués. Ainsi, par exemple, les basses pressions d'oxygène à hautes altitudes, ou une dépression dans un avion, peuvent entraîner une hypoxémie et le déclenchement d'une crise. Dans d'autres cas, les arguments sont d'origine expérimentale. Il est possible, par exemple, d'induire des crises douloureuses par acidose due à l'administration i.v. de solutions modifiant le pH cellulaire [Greenberg and Kass 1958]. L'exposition au froid des bébés entraîne une dactylite -inflammation des doigts [Marsden and Shah 1964] (NB : ce type d' « expériences », éthiquement inacceptable, est illégal de nos jours).

Fabry et coll. ont démontré que la fraction sanguine de globules rouges « denses » ($d > 1.095$, $HbS > 6 \text{ mM}$ ou $MCHC > 42\text{g/l}$) diminue significativement durant les crises [Fabry et coll. 1984]. Cette découverte a permis la première association d'une variable biologique à la survenue des crises. Peu après, les observations de Kaul et coll. [Kaul et coll. 1989; Kaul et coll. 1995; Kaul et coll. 1996] ont montré que des cellules drépanocytaires (cellules « SS ») sont retenues dans des espaces pavoisés veinulaires par un mécanisme d'adhérence à l'endothélium [Mohandas and Evans 1985; Frenette and Atweh 2007]. Ballas et coll., aidés par les observations sur les patients en premiers stades de crises, ont confirmé l'augmentation des cellules SS denses juste avant et au début des crises, et observé immédiatement après cette étape, une réduction de cette même fraction [Ballas and Smith 1992].

La cause de la forte présence des cellules SS denses avant et pendant le stade primaire des crises reste non-résolue, mais elle pourrait être liée à une hyperosmolarité locale (telle qu'au niveau médullaire rénal, et/ou temporaire) ou à la faible présence des cellules non-denses qui adhèrent de manière brusque à l'endothélium vasculaire. Le phénomène de rétention des cellules SS denses observés par Kaul et coll., et le phénomène d'adhérence des

cellules non-denses à l'endothélium qui peut expliquer les observations de Ballas et coll., peuvent se produire simultanément ou séquentiellement avec prédominance de l'un ou de l'autre selon le patient et les circonstances de la crise [Kaul et coll. 1989 ; Ballas and Smith 1992; Kaul et coll. 1995; Kaul et coll. 1996]. Malgré l'existence de deux mécanismes d'initiation, c'est une anomalie propre aux cellules SS qui est à l'origine de la vasoocclusion.

En ce qui concerne l'artériole précapillaire, des expériences en vidéo-microscopie ont mis en évidence une accumulation préférentielle, localisée au niveau du sphincter et de la portion initiale, de cellules SS irréversiblement falciformées de type ISC (« irreversibly sickled SS cells »), une sous-classe de cellules denses qui, en sus d'être déshydratées, sont figées dans une forme caractéristique de banane ([Kaul et coll. 1995]). Dans le second cas, c.a.d obstruction au niveau veinulaire, l'adhésion à l'endothélium vasculaire de réticulocytes (jeunes cellules, non-denses et déformables) précède et potentialise le piégeage subséquent des cellules denses, dont les cellules ISC. Ce mécanisme, mis en évidence par marquage cellulaire et vidéo-observation concomitante, est prédominant dans les petites veinules où l'adhésion est maximale -cf. figure 11, ci-après; [Kaul et coll. 1995; Frenette and Atweh 2007].

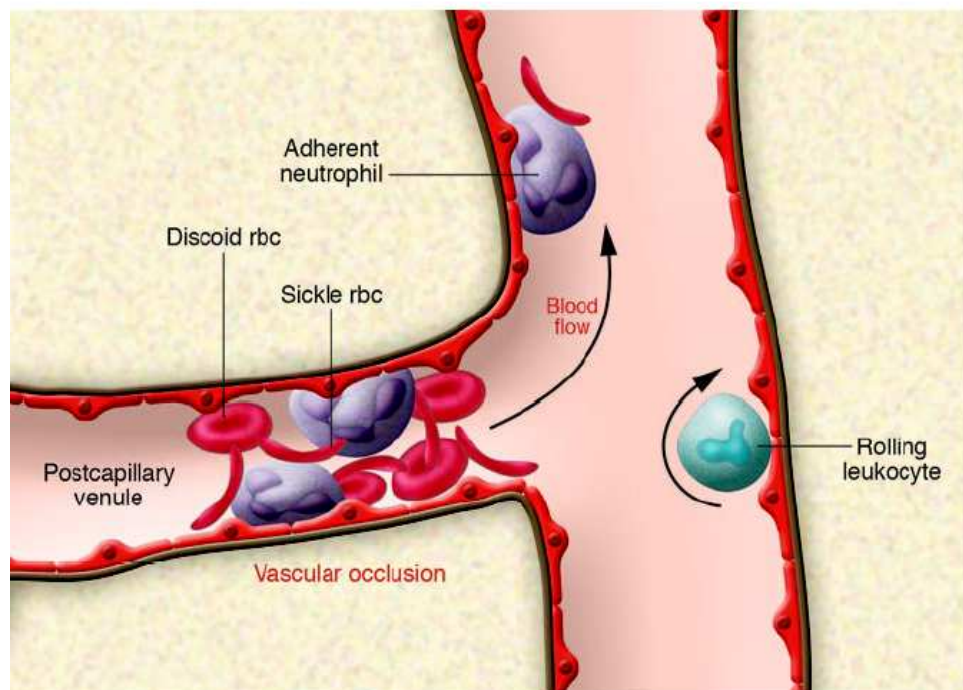


Figure 11 : Mécanismes de la vaso-occlusion
(Frenette and Atweh, 2007)

II-4 DESHYDRATATION ET TRANSPORT IONIQUE ERYTHROCYTAIRES

Outre leur tendance accrue à l'hémolyse -et à l'élimination réticulo-endothéliale, deux caractéristiques importantes des érythrocytes drépanocytaires sont (i) leur état de déshydratation, et (ii) l'existence de sous-populations et le profil de densité associé, la plupart des patients présentant une fraction de cellules « denses » augmentées [Hebbel 1991; Kaul et coll. 1996; Ellory et coll. 1998; Lew and Bookchin 2005]. Si l'on se réfère à la polymérisation de HbS, sujet de ce travail, l'importance de ces caractéristiques hématologiques est en premier lieu que la vitesse de ce processus est directement proportionnelle à la concentration de HbS, élevée à la puissance 30-50 (cf. Chap IV) ! Etant donné que la concentration dépend de l'eau érythrocytaire, le profil hématologique de densité revêt une importance toute particulière.

Transport ionique membranaire et déshydratation érythrocytaire : La fraction d'hématies denses déshydratées, avec une nette augmentation de la concentration cellulaire de l'hémoglobine (40-50 g/dl comparé à une norme de l'ordre de 33 g/dl), contient également le pourcentage le plus important de cellules déformées d'une manière irréversible (ISC, cf. section précédente; [Lew et coll. 2002; Lew and Bookchin 2005]). Cette déshydratation est secondaire à une perte du potassium cellulaire [Lew and Bookchin 2005].

En effet, Tosteson et coll. ont montré que sous désoxygénation, les hématies SS présentent un gain de Na^+ et une perte de K^+ . Inversement, sous réoxygénation, les hématies SS présentent un gain de K^+ et une perte de Na^+ , ce qui indique que les effets de la désoxygénation sont réversibles [Tosteson et coll. 1952; Tosteson et coll. 1955].

Le canal potassique activé par le calcium libre cytosolique (responsable de l'effet dit *Gardos*) des cellules SS joue un rôle majeur dans la déshydratation cellulaire, soit seul, soit en conjonction avec le co-transport K^+-Cl^- [Brugnara 1995; Lew and Bookchin 2005]. *In vitro*, la déshydratation des érythrocytes SS dépend du Ca^{2+} [Lew et coll. 2002] externe et elle peut être prévenue par les inhibiteurs du canal Gardos (par exemple, le clotrimazole : [Brugnara 1995]).

L'âge cellulaire est un déterminant important de l'activité du co-transport K^+-Cl^- dans l'érythrocyte humain. Le système est en effet très actif dans le réticulocyte, et beaucoup moins dans l'érythrocyte mature (pour références, cf. revue [Lew and Bookchin 2005]). Un autre déterminant de l'activité de ce système est la présence d'hémoglobines positivement chargées. Les études des différents variants de l'hémoglobine indiquent que la sur-activation du cotransport K^+-Cl^- n'est pas un facteur commun à toutes les hémoglobines positivement chargées, mais qu'elle est limitée aux variants positivement chargés en positions β_6 et β_7 . L'activation du cotransport K^+-Cl^- est également observée dans les β -thalassémies intermédiaires (formes atténuées de la β -thalassémie homozygote).

Trois phénomènes additionnels peuvent contribuer à la perte potassique -et à la déshydratation qui en résulte, mais leur effet est mineur comparativement aux deux phénomènes précédents. Ce sont : (i) l'activation de la pompe Na^+/K^+ par la désoxygénation, (ii) les dommages oxydatifs accélérés de l'HbS, ainsi que, (iii) la déposition/accumulation membranaire d'hémoglobine dénaturée, de ferritine, d'hème libre et de fer compartimentalisés (ex : « Heinz bodies »; [Hebbel 1991; Lew and Bookchin 2005]).

Variabilité érythrocytaire et profil de densité : Une attention particulière doit être portée à l'existence de sous-populations érythrocytaires et à leur distribution de densité.

La figure 5 (extraite de Lew et Bookchin, 2005) schématise le profil de distribution des érythrocytes drépanocytaires (chez un *Patient* « type », traits noirs, en comparaison à un sujet *Témoin*, trait gris). On observe que, par opposition à la distribution *Témoin* qui est homogène (gaussienne, centrée sur $d=1,09$)¹, la distribution drépanocytaire est très hétérogène, comprenant :

- des réticulocytes², et jeunes érythrocytes ($d \approx 1,06-1,09$), fraction SS1,
- des discocytes « légers » ($d \approx 1,08-1,10$), fraction SS2
- des discocytes denses ($d \approx 1,10-1,15$), fraction SS3
- des érythrocytes hyperdenses, fraction SS4, essentiellement constitués d'érythrocytes irréversiblement modifiés (« sickled »³), ou ISC.

¹ Ni les réticulocytes (<5%), ni les « F-cells » (<1 %) du *Témoin* ne sont représentés ici

² Réticulocytes : cellules érythroïdes énucléées, qui mûrissent en érythrocyte en quelques jours dans la circulation (par perte exosomale de matériel RNA, protéique, etc)

³ Les ISC, « irreversibly sickled cells », ne présentent pas tous une morphologie falciforme (cf. Chap IV)

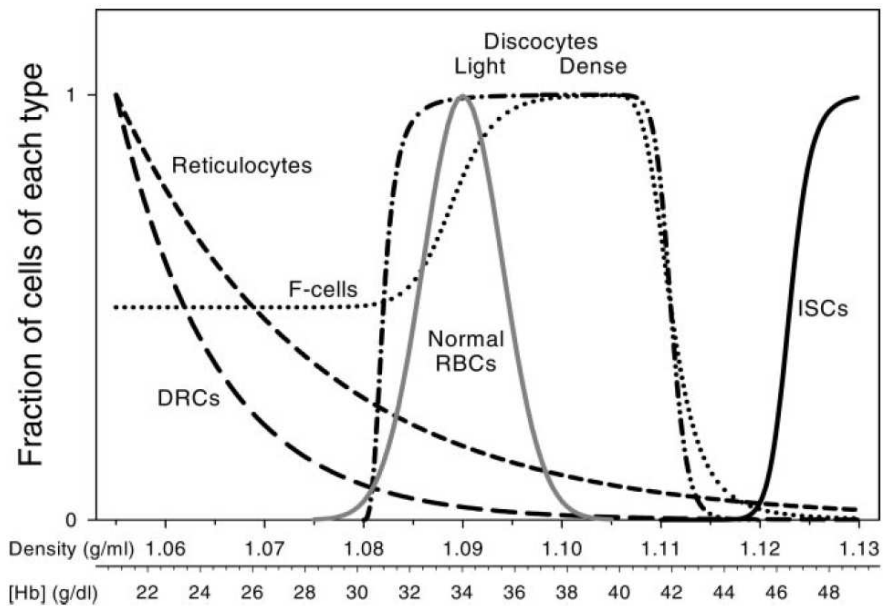


Figure 12 : Profil-type de distribution de densité des érythrocytes drépanocytaires
(Lew et Bookchin, 2005)

La fraction « ISC » présente, par définition, la caractéristique de ne pas reprendre une forme discoïde après ré-oxygénation, alors même que les polymères peuvent être totalement re-dissociés en monomères solubles de HbS, ce qui implique des modifications (irréversibles) du cytosquelette membranaire (pour références, cf. [Lew and Bookchin 2005]).

A ces populations cellulaires, il faut ajouter :

- des cellules contenant de l'hémoglobine F (non-compétente pour la polymérisation), « F-cells », majoritaires parmi les discocytes denses (et les réticulocytes),
- une sous-population récemment identifiée, DRC (« Dehydration Resistant Cells » ; 10-60%, selon les patients, de la fraction « légère », riche en réticulocytes), résistante à la déshydratation, qui est vraisemblablement le résultat de la sénescence d'ISC (et d'autres érythrocytes drépanocytaires denses), par perméabilisation aux cations, avec un gain de Na^+ supérieur à la perte de K^+ entraînant un gonflement osmotiquement obligé et une réduction de densité.

Enfin, les sous-populations érythrocytaires peuvent différer considérablement en termes de ([Castro 1980; Lachant et coll. 1983; Shartava et coll. 2000; Lew and Bookchin 2005; Amer et coll. 2006]) :

- contenu en polymères, organisation des polymères, morphologie et déformabilité (filtrabilité, viscosité),
- activité des transporteurs membranaires et composition ionique,
- nombre de vésicules intracytosoliques et contenu en calcium,
- contenu en HbS dénaturée et en corps de Heinz,
- métabolisme énergétique et rédox (ex : de 2,3-DPG↑, GSH et NADH ↓)
- capacité d'adhérence à l'endothélium.

II-5 PATHOLOGIE VASCULAIRE ET ETIOLOGIE DE LA DREPANOCYTOSE

Hétérogénéité drépanocytaire : La drépanocytose est une maladie objectivement « monogénique », résultant de la mutation ponctuelle Val->Glu, en position β -6, définissant ainsi un génotype « simple » (cf. sections *II-1* et *II-2*). Néanmoins, les patients drépanocytaires présentent un tableau de variabilité phénotypique et clinique impressionnant, et cela même si l'on restreint l'analyse aux patients homozygotes. Un exemple de cette variabilité est issu de plusieurs études montrant que la sévérité clinique varie très notablement, entre des patients dont la concentration sanguine de HbS est par ailleurs identique (pour références, cf. [Vekilov 2007]). Alors que tous les patients présentent la même mutation de l'hémoglobine (c.a.d $\alpha_2\beta_2^S$), l'expression et la sévérité de cette maladie sont extrêmement variables d'un patient à l'autre, allant de formes graves et incapacitantes à des formes bénignes, voire silencieuses [Redding-Lallinger and Knoll 2006 ; Kutlar 2007].

De plus, l'hétérogénéité clinique s'accompagne d'une forte hétérogénéité cellulaire (cf. section précédente): chez un même patient, différents érythrocytes présentent

des comportements très différents, liés entre autre à un taux de polymérisation différent, à un nombre de domaines différents [Noguchi et coll. 1983 ; Mickols et coll. 1985; Ballas et coll. 1988; Mickols et coll. 1988 ; Corbett et coll. 1995]). Enfin, la réponse thérapeutique, par exemple à l'hydroxyurée, est, elle aussi, très hétérogène [de Montalembert et coll. 1997 ; Maier-Redelsperger et coll. 1998 ; Wang 2007; Platt 2008].

La notion de variabilité, perçue depuis la fin des années 60 (au moins pour les aspects érythrocytaires, cf. [Bertles and Milner 1968]), est promue depuis les années 80. S'il ne rentre pas dans le cadre de ce travail de détailler tous les aspects liés à la variabilité drépanocytaire, on peut schématiquement, subdiviser les patients en deux phénotypes cliniques, présentant d'ailleurs un large degré de recouvrement (pour revues, cf. [Steinberg 2006; Kato et coll. 2007]):

- (i) un phénotype *vasoocclusif* (« vasoocclusive-viscosity phenotype »), plutôt dominant et plutôt associé aux altérations rhéologiques (microcirculatoires et/ou érythrocytaires), et dont les manifestations cliniques sont préférentiellement les crises vasoocclusives, l'ostéonécrose et le syndrome thoracique aigu (« acute chest syndrome »);
- (ii) un phénotype *hémolytique*, lié à la libération hémolytique intravasculaire d'hémoglobine (« hemolytic phenotype ») et au déséquilibre qui en découle de la balance NO^o (oxyde nitrique, facteur endothélial vasorelaxant et anti-inflammatoire), et dont les manifestations cliniques marquantes sont l'hypertension pulmonaire, le priapisme, les ulcérations des jambes, et surtout l'infarctus cérébral.

Le croisement de nombreux travaux expérimentaux et cliniques permet d'établir une liste des facteurs de la variabilité interindividuelle et clinique de la drépanocytose. Le tableau 1 reprend les principaux d'entre eux et renvoie aux références appropriées.

Tableau 1. Les principaux facteurs responsables de la variabilité drépanocytaire

Facteurs -évènements	Observations	Références
Facteurs "érythrocytaires"		
Fibres polymères de HbS, gel, domaines	Forte présence dans les cellules denses (& présence dans les érythrocytes/versant artériel)	Vekilov, 2007 ; Christov et al., 2004 ; Poillon et al., 1998 ; Ballas et al., 1988
Fractions d'érythrocytes SS « denses » ; ISC	Cellules denses plus nombreuses ; ISC pas directement corrélés à crise	Lew et Bookchin, 2005
Déséquilibres ionique et osmotique	Homéostasie Na, K, Ca réduite (perte d'eau conséquente)	Lew et Bookchin, 2005; Hebbel, 1991
Variabilité morphologique et nombre de domaines	Comportements différentiels	Obata et al., 2006; Christov et al., 2004 ; Huang et al., 2003
Déformabilité/Viscosité érythrocytaires	Réduite/Augmentée	Huang et al., 2003 Lande et al., 1988
Présence (native) d'HbF (et autres Hb non-compétentes pour la polymérisation)	HbF inhibe la polymérisation, et réduit les crises (mais très variable !)	Aprelev et al., 2005
Dénaturation de HbS; statut rédox	Association à la membrane ; Stress oxydatif (fer compartimentalisé)	Hebbel, 1990
Altérations de la membrane et/ou du cytosquelette érythrocytaire	Rigidification membranaire/cytosquelette Peroxydation lipidique	Hebbel, 1991
Protéines membranaires	Sites possibles de nucléation « hétérogène » (ex : fragment N-terminal de AE1)	Aprelev et al., 2005 Hebbel, 1991
Facteurs "microcirculatoires"		
Dynamique du cycle d'oxygénation/désoxygénation	Transit microcirculatoire (local) - Transit dans le versant veineux (systémique)	Obata et al., 2006; Steinberg, 2005; Wun et al., 1997
pH sanguin/local	Acidification ↑ polymérisation	
Augmentation de la viscosité sanguine	Due à : Hématocrite ↑, ISC ↑, reticulocytes ↑ (<= anémie, ischémie) Leucocytes ↑ (inflammation)	Kaul et Liu, 1999 Hiruma et al., 1995
NO° et statut contractile de la microcirculatoire	NO° consommé par HbS intravasculaire hémolytique	Kato et al., 2007 ; Wood et al., 2006 ; Labie et Elion, 1998
Activation de l'endothélium	Due à : Niveau de NO° ↓ Activation leucocytaire/plaquettaire Production d'espèces réactives de l'oxygène	Okpala et al., 2004 Hebbel et al., 2004 Labie et Elion, 1998 Hebbel et Verceletti, 1997
Adhésion des leucocytes à l'endothélium	Site endothélial // site leucocyte: - ICAM 1,2,3//CD11a (M,N,L) - ICAM-1//CD11b (N, M, L) - ICAM-1, 2, 3//CD18 (N, M, L) - CD31//CD31 (N, M) - TSP, Collagène//CD36 (M) -GlyCAM-1;CD162//CD62L (N, M, L) -CD62L (P,E,Lk)//CD162 (N, M)	Telen, 2007 Okpala et al., 2004 Labie et Elion, 1998 Hebbel et Verceletti, 1997
Adhésion des cellules SS à l'endothélium (ou sous-endothélium) (avec Expression/exposition érythrocytaire de molécules d'adhésion)	Site endothélial // site cellule SS : -Intégrine α ₄ β ₁ //VCAM1, fibronectine -CD 36// TSP ; CD 47//Intégr. α ₅ β ₃ -Phosphatidyl-sérine//Intégrine α ₅ β ₃	Telen, 2007 Okpala et al., 2004 ; Hebbel et Verceletti, 1997
Interactions hétérotypiques	Formation de complexes entre : érythrocytes //leucocytes // plaquettes // endothélium	Okpala et al., 2004 Embury et al., 2004
Activation plaquettaire et/ou de l'hémostasie	État pro-thrombogénique et pro-inflammatoire	Wood et al., 2006 ; Embury et al., 2004 ; Frenette, 2002
Facteurs environnementaux		
Température corporelle/externe, activité, pression d'oxygène ambiante	Fièvre, exercice, altitude => déclenchement de crises vasoocclusives	Embury, 2004
Traitement (pharmacologique, ...)	Ex : HbF induite par traitement	
Facteurs psycho-sociaux	Prise en charge, soutien familial, image de soi	

Légende : SS, érythrocyte drépanocytaire (homozygote) ; N, Neutrophile ; M, Monocyte ; L, Lymphocyte ; Gp, glycoprotéine ; CD, complément domaine ; ICAM, intercellular adhesion molecule ; GlyCAM, glycoprotéine cell adhesion molecule ; PECAM-1 (CD31), platelet endothelial cell adhesion molecule-1 ; PSGL-1 (CD162), platelet selectin glycoprotéine ligand-1 ; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1 ; BCAM, basal cell adhesion molecule (Lutheran antigen) ; TSP, Thrombospondin ; CD36 (Platelet Gp IV) ; CD11a (intégrine aL) ; CD11b (intégrine aM) ; CD18 (intégrine b2) ; CD36 (Platelet Gp IV) ; CD47 (Integrin associated protein) ; CD62L (sélectine L) ; AE1, Anion Exchanger.

Polymérisation de HbS et étiologie drépanocytaire : Une source additionnelle de confusion - et de complexité- réside dans ce qui a pu être présenté comme un « dogme », à savoir que l'étiologie drépanocytaire reposerait uniquement sur la séquence d'évènements suivants :

HbS => Désoxygénation de HbS => Polymérisation et fibres => Déformation érythrocytaire => Vasooclusion => Troubles et symptômes cliniques

Selon Embury, on peut attribuer la persistance du déterminisme supposé [falciformation ↔ crise drépanocytaire] aux observations initiales de J. Herrick, à savoir la *présence* de cellules « en faucilles » dans le sang drépanocytaire (pour références, revue et commentaire « historique », cf. [Embury 2004]). Nous reprenons ici une citation extraite de cette même revue⁴ :

La doctrine « polymérisation-occlusion » remonte à l'hypothèse posée en 1910 par Herrick, selon laquelle les symptômes de ce premier patient reconnu comme tel, étaient dus à la forme « en faucille » des érythrocytes de celui-ci. Elle a été canonisée en 1940 par Ham et Castle au travers de leur postulat de « cercle vicieux de l'érythrocytose », où désoxygénation séquentielle, falciformation, et rigidification des érythrocytes drépanocytaires, stase et acidification sanguines microvasculaires, induisant une facliformation additionnelle et menant aux épisodes, douloureux, vasocclusifs.

C'est à la fin des années 70 qu'a émergé le fait que l'occurrence d'une crise était en réalité un phénomène non-déterministe et imprévisible, de gravité, durée, conséquences -et sensibilité, extrêmement variables. Des nombreux travaux, abordent cet apparent paradoxe que constitue la variabilité clinique drépanocytaire face à la « simple » mutation HbA->HbS.

⁴ Citation originale: The polymerization-sickling doctrine began with the 1910 assumption by Herrick that the symptoms of his first-reported patient were due to the sickle-shaped erythrocytes in the patient's blood. It was canonized in the 1940 description by Ham and Castle of a "vicious cycle of erythrocytosis," in which sequential deoxygenation, sickling, and rigidification of sickle red blood cells, stasis of microvascular blood flow, acidification of the blood, and additional sickling led to painful microvascular occlusion.

Dans son exhaustive revue de 1991, Hebbel ré-analyse de façon critique les éléments en faveur et en défaveur de la causalité « polymérisation-vasoocclusion », et il en identifie les incomplétudes et interprétations excessives [Hebbel 1991] ; en 2004, Embury reprend et actualise en détail cette réflexion [Embury 2004]. Ce qui ressort de ces analyses critiques tient en termes généraux dans la proposition suivante [Hebbel 1991] : la drépanocytose n'est pas réduite à un tableau étio-pathologique unique. En ce qui concerne la polymérisation de HbS *per se*, il n'est pas pertinent de lui attribuer *tous* les évènements vasoocclusifs.

Il est vraisemblable que les relatifs échecs dans la quête d'un traitement pharmacologique, efficace et toléré, soient en partie dus à la nature monofactorielle de l'hypothèse selon laquelle la réduction des polymères d'HbS *devrait* entraîner la réduction des symptômes (par exemple, grâce à l'HbF induite par l'hydroxyurée ; cf. section suivante).

In fine, il apparaît que la polymérisation de HbS -et ses conséquences étio-pathologiques sont amplement modulées par de multiples facteurs et évènements interconnectés. Ceux-ci s'avèrent précisément être, pour l'essentiel, les facteurs identifiés de la variabilité drépanocytaire, et ils interviennent à tous les niveaux (plusieurs de ces aspects sont développés dans les chapitres III et IV, consacré à la polymérisation et au modèle de double nucléation qui est à la base de ce travail):

- ***moléculaire***

- concentration de HbS, température, pH
- présence de HbF et autres hémoglobines, hybridation

- ***cellulaire***

- transport ionique, équilibre osmotique et densité érythrocytaire
- type de sous-population érythrocytaire
- métabolismes rédox et énergétique, 2,3-DPG, GSH

- nucléation membranaire, présence de polymères provenant des cycles circulatoires antécédents
- ***vasculaire et tissulaire***
 - oxygénation tissulaire et cycle d'échange de l'oxygène
 - interactions de l'érythrocyte et des leucocytes avec l'endothélium
 - débit sanguin et autres facteurs hémodynamiques
 - influences humorales et vaso-régulatoires
 - NO° (interactions avec l'hémoglobine, ...)
 - Statut pro-inflammatoire et pro-hémostatique de l'endothélium
- ***hématologique, individuel et environnemental***
 - HbF native, réponse au traitement
 - balance hydro-électrolytique
 - fièvre, exercice physique.

En résumé, des facteurs pléiotropiques (c.a.d effets phénotypiques différentiels pour un seul gène muté) et des facteurs épistatiques (c.a.d l'action d'autres gènes que celui de la β -globine) interviennent dans l'étiologie drépanocytaire [Kaul et coll. 1996]. Et dans cette optique, les polymorphismes associés aux éléments et/ou fonctions modulateurs jouent très vraisemblablement un rôle clef ; pour exemples, cf. [Brousseau et coll. 2007; Hoppe et coll. 2007; Kutlar 2007]. Ceci place la pharmacogénomique dans le futur proche de la prise en charge de la drépanocytose (par exemple, cf. [Ma et coll. 2007])

Il reste que c'est bien l'anomalie moléculaire de l'Hb qui constitue le *primum movens* drépanocytaire ; autrement dit, seuls les sujets présentant l'anomalie génétique présentent les symptômes. Ce point est largement confirmé (/étayé) par de très nombreuses études cliniques (expérimentales) [Serjeant et coll. 1973; Hofrichter et coll. 1974; Noguchi and Schechter

1981; Nishio et coll. 1983; Embury 2004; Vekilov 2007]. Enfin, le développement, relativement récent d'un modèle animal, en l'occurrence de souris transgéniques drépanocytaires (par ex. cf. [Rubin et coll. 1988; Beuzard 1996]), a permis de démontrer que l'inhibition de la polymérisation réduit fortement la fraction des cellules falciformes ainsi que la sévérité des crises douloureuses (pour exemple, cf. [Pawliuk et coll. 2001]).

II-6 TRAITEMENT DE LA DREPANOCYTOSE

Depuis sa caractérisation, la drépanocytose fait l'objet de nombreuses recherches visant à en développer un traitement. Plusieurs méthodes de traitement ont été mises au point et sont utilisées, mais aucune thérapeutique ne s'avère parfaitement efficace, ni parfaitement tolérée, ni universelle. Les principaux traitements utilisés sont la transfusion sanguine, la greffe de moelle osseuse, et les traitements pharmacologiques.

La transfusion sanguine, pratiquée en chronique ou en aigü, permet en général de corriger l'anémie, de réduire le pourcentage de cellules anormales (ainsi que la fraction sanguine de HbS), d'améliorer l'oxygénation, et de réduire les crises (vasoocclusives, syndrome thoracique) et les douleurs [Riddington and Wang 2002; Redding-Lallinger and Knoll 2006].

La greffe de moelle osseuse (ou « greffe » de cellules souches hématopoïétiques) présente un pourcentage d'efficacité supérieur à 80% (pour références, cf. [Redding-Lallinger and Knoll 2006]), mais elle ne peut être réalisée que dans un petit nombre de cas (ex. entre jumeaux). Une alternative serait la thérapie génique, qu'elle vise à la manipulation directe du gène de l'hémoglobine ou le contrôle de sa synthèse (par exemple pour accroître la fraction d'hémoglobine non-pathogène type HbF ; cf. [Frenette and Atweh 2007]), ou encore qu'elle cherche à modifier le génome de cellules hématopoïétiques, avant leur transplantation. Néanmoins, malgré des résultats positifs avec les modèles de souris drépanocytaires (ex.

exprimant HbS humaine ; cf. [Pawliuk et coll. 2001; Kaul et coll. 2006]), la transposition à l'homme reste à réaliser [Sadelain et coll. 2004]. Il est d'ailleurs à noter qu'à ce jour aucun modèle de souris transgénique de la drépanocytose n'en reproduit fidèlement la pathologie humaine.

Les traitements pharmacologiques sont les plus fréquemment appliqués, pour des raisons « logistiques » en premier lieu. Choisis selon le patient (âge, en particulier) et son profil phénotypique et clinique, ils se subdivisent en trois catégories principales, selon leur objectif et/ou la cible thérapeutique [Steinberg 2006], comme suit :

1. **Induction d'HbF** (hémoglobine non-polymérisante) :

- Hydroxyurée, HU ; si cette option thérapeutique représente le traitement de choix en première intention, pour les enfants et les patients homozygotes, la tolérance à long terme reste à assurer [Mellouli and Bejaoui 2008]; NB : il est admis aujourd'hui que HU exerce ses effets bénéfiques au travers de plusieurs mécanismes, en sus de l'induction de HbF, dont la production de NO°, une capacité antioxydante, et des effets anti-adhésions cellulaires [Haynes et coll. 2008],
- 5-Azacytidine ; décitabine -éventuellement utilisés en cas d'échec de l'induction de HbF avec HU, [Steinberg 2006];

2. **Modulation de la densité des érythrocytes** et inhibition de la déshydratation (cf. également [Lew and Bookchin 2005]) :

- Inhibition du cotransport K^+ - Cl^- (magnésium oral ; [De Franceschi et coll. 1997]), et/ou du canal Gardos (clotrimazole : [Mueller and Brugnara 2001]),

- Inhibition de la perméabilité anionique ; Inhibition des flux induits par la désoxygénation [Steinberg 2006];

3. *Traitements visant la circulation et la microcirculation :*

- Anti-adhésions cellulaires (cf. [Telen 2007] ; voir aussi Tableau 1),
- Thérapie(s) antioxydante et/ou anti-inflammatoire (cf. [Redding-Lallinger and Knoll 2006]),
- NO° et donneurs de NO° (cf. [Steinberg 2006]).

En résumé, les études moléculaires et cellulaires, portant sur les inhibiteurs potentiels des interactions intermoléculaires impliquées dans la polymérisation de HbS, sur la déshydratation des érythrocytes SS, et sur les propriétés différentielles des populations cellulaires SS, ainsi que les recherches portant sur les facteurs tissulaires et circulatoires contribuant à l'hémolyse et/ou à l'obstruction vasculaire, ont fourni quantité d'éléments assurant une compréhension accrue de la pathologie drépanocytaire, sans toutefois mener à un traitement pharmacologique « universellement toléré et efficace ».

II-7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amer, J., H. Ghoti, E. Rachmilewitz, A. Koren, C. Levin and E. Fibach (2006). "Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants." Br J Haematol 132(1): 108-13.
- Ballas, S. K., J. Larner, E. D. Smith, S. Surrey, E. Schwartz and E. F. Rappaport (1988). "Rheologic predictors of the severity of the painful sickle cell crisis." Blood 72(4): 1216-23.
- Ballas, S. K. and E. D. Smith (1992). "Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis." Blood 79(8): 2154-63.
- Bertles, J. F. and P. F. Milner (1968). "Irreversibly sickled erythrocytes: a consequence of the heterogeneous distribution of hemoglobin types in sickle-cell anemia." J Clin Invest 47(8): 1731-41.
- Beuzard, Y. (1996). "Towards gene therapy of hemoglobinopathies." Semin Hematol 33(1): 43-52.
- Brousseau, D. C., D. G. McCarver, A. L. Drendel, K. Divakaran and J. A. Panepinto (2007). "The effect of CYP2D6 polymorphisms on the response to pain treatment for pediatric sickle cell pain crisis." J Pediatr 150(6): 623-6.
- Brugnara, C. (1995). "Erythrocyte dehydration in pathophysiology and treatment of sickle cell disease." Curr Opin Hematol 2(2): 132-8.
- Castro, O. (1980). "Viability and function of stored sickle erythrocytes." Transfusion 20(6): 695-703.
- Corbett, J. D., W. E. Mickols and M. F. Maestre (1995). "Effect of hemoglobin concentration on nucleation and polymer formation in sickle red blood cells." J Biol Chem 270(6): 2708-15.
- De Franceschi, L., D. Bachir, F. Galacteros, G. Tchernia, T. Cynober, S. Alper, O. Platt, Y. Beuzard and C. Brugnara (1997). "Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease." J Clin Invest 100(7): 1847-52.
- de Montalembert, M., M. Belloy, F. Bernaudin, F. Gouraud, R. Capdeville, R. Mardini, N. Philippe, J. P. Jais, J. Bardakdjian, R. Ducrocq, M. Maier-Redelsperger, J. Elion, D. Labie and R. Girot (1997). "Three-year follow-up of hydroxyurea treatment in severely ill children with sickle cell disease. The French Study Group on Sickle Cell Disease." J Pediatr Hematol Oncol 19(4): 313-8.

- Ellory, J. C., J. S. Gibson and G. W. Stewart (1998). "Pathophysiology of abnormal cell volume in human red cells." Contrib Nephrol 123: 220-39.
- Embury, S. H. (2004). "The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion." Microcirculation 11(2): 101-13.
- Fabry, M. E., L. Benjamin, C. Lawrence and R. L. Nagel (1984). "An objective sign in painful crisis in sickle cell anemia: the concomitant reduction of high density red cells." Blood 64(2): 559-63.
- Frenette, P. S. and G. F. Atweh (2007). "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." J Clin Invest 117(4): 850-8.
- Galactéros, F. (2000). "Drépanocytose." Encyclopédie Orphanet(Février).
- Greenberg, M. S. and E. H. Kass (1958). "Studies on the destruction of red blood cells. XIII. Observations on the role of pH in the pathogenesis and treatment of painful crisis in sickle-cell disease." AMA Arch Intern Med 101(2): 355-63.
- Haynes, J., Jr., B. Obiako, R. B. Hester, B. S. Baliga and T. Stevens (2008). "Hydroxyurea attenuates activated neutrophil-mediated sickle erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure and adhesion to pulmonary vascular endothelium." Am J Physiol Heart Circ Physiol 294(1): H379-85.
- Hebbel, R. P. (1991). "Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology." Blood 77(2): 214-37.
- Hofrichter, J., P. D. Ross and W. A. Eaton (1974). "Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease." Proc Natl Acad Sci U S A 71(12): 4864-8.
- Hoppe, C., W. Klitz, K. D'Harlingue, S. Cheng, M. Grow, L. Steiner, J. Noble, R. Adams and L. Styles (2007). "Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia." Stroke 38(8): 2241-6.
- Hunt, J. A. and V. M. Ingram (1958). "Abnormal human haemoglobins. II. The chymotryptic digestion of the trypsin-resistant core of haemoglobins A and S." Biochim Biophys Acta 28(3): 546-9.
- Ingram, V. M. (1958). "Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by fingerprinting." Biochim Biophys Acta 28(3): 539-45.
- Ingram, V. M. (1959). "Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins." Biochim Biophys Acta 36: 402-11.

- Kato, G. J., M. T. Gladwin and M. H. Steinberg (2007). "Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes." Blood Rev 21(1): 37-47.
- Kaul, D. K., M. E. Fabry, F. Costantini, E. M. Rubin and R. L. Nagel (1995). "In vivo demonstration of red cell-endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse." J Clin Invest 96(6): 2845-53.
- Kaul, D. K., M. E. Fabry and R. L. Nagel (1989). "Microvascular sites and characteristics of sickle cell adhesion to vascular endothelium in shear flow conditions: pathophysiological implications." Proc Natl Acad Sci U S A 86(9): 3356-60.
- Kaul, D. K., M. E. Fabry and R. L. Nagel (1996). "The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes." Blood Rev 10(1): 29-44.
- Kaul, D. K., R. Kollander, H. Mahaseth, X. D. Liu, A. Solovey, J. Belcher, R. J. Kelm, Jr., G. M. Vercellotti and R. P. Hebbel (2006). "Robust vascular protective effect of hydroxamic acid derivatives in a sickle mouse model of inflammation." Microcirculation 13(6): 489-97.
- Kutlar, A. (2007). "Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder." Hemoglobin 31(2): 209-24.
- Lachant, N. A., W. D. Davidson and K. R. Tanaka (1983). "Impaired pentose phosphate shunt function in sickle cell disease: a potential mechanism for increased Heinz body formation and membrane lipid peroxidation." Am J Hematol 15(1): 1-13.
- Lew, V. L. and R. M. Bookchin (2005). "Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration." Physiol Rev 85(1): 179-200.
- Lew, V. L., Z. Etzion and R. M. Bookchin (2002). "Dehydration response of sickle cells to sickling-induced Ca(++) permeabilization." Blood 99(7): 2578-85.
- Ma, Q., D. F. Wyszynski, J. J. Farrell, A. Kutlar, L. A. Farrer, C. T. Baldwin and M. H. Steinberg (2007). "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea." Pharmacogenomics J 7(6): 386-94.
- Maier-Redelsperger, M., M. de Montalembert, A. Flahault, M. G. Neonato, R. Ducrocq, M. P. Masson, R. Girot and J. Elion (1998). "Fetal hemoglobin and F-cell responses to long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. The French Study Group on Sickle Cell Disease." Blood 91(12): 4472-9.
- Marsden, P. D. and K. K. Shah (1964). "Artificially Induced Oedema in Sickle Cell Anaemia." J Trop Med Hyg 67: 31-4.
- Mellouli, F. and M. Bejaoui (2008). "[The use of hydroxyurea in severe forms of sickle cell disease: study of 47 Tunisian paediatric cases]." Arch Pediatr 15(1): 24-8.

- Mickols, W., M. F. Maestre, I. Tinoco, Jr. and S. H. Embury (1985). "Visualization of oriented hemoglobin S in individual erythrocytes by differential extinction of polarized light." Proc Natl Acad Sci U S A 82(19): 6527-31.
- Mickols, W. E., J. D. Corbett, M. F. Maestre, I. Tinoco, Jr., J. Kropp and S. H. Embury (1988). "The effect of speed of deoxygenation on the percentage of aligned hemoglobin in sickle cells. Application of differential polarization microscopy." J Biol Chem 263(9): 4338-46.
- Mohandas, N. and E. Evans (1985). "Sickle erythrocyte adherence to vascular endothelium. Morphologic correlates and the requirement for divalent cations and collagen-binding plasma proteins." J Clin Invest 76(4): 1605-12.
- Mueller, B. U. and C. Brugnara (2001). "Prevention of red cell dehydration: a possible new treatment for sickle cell disease." Pediatr Pathol Mol Med 20(1): 15-25.
- Nishio, I., T. Tanaka, S. T. Sun, Y. Imanishi and S. T. Ohnishi (1983). "Hemoglobin aggregation in single red blood cells of sickle cell anemia." Science 220(4602): 1173-5.
- Noguchi, C. T. and A. N. Schechter (1981). "The intracellular polymerization of sickle hemoglobin and its relevance to sickle cell disease." Blood 58(6): 1057-68.
- Noguchi, C. T., D. A. Torchia and A. N. Schechter (1983). "Intracellular polymerization of sickle hemoglobin. Effects of cell heterogeneity." J Clin Invest 72(3): 846-52.
- Pauling, L., H. A. Itano and et al. (1949). "Sickle cell anemia, a molecular disease." Science 109(2835): 443.
- Pawliuk, R., K. A. Westerman, M. E. Fabry, E. Payen, R. Tighe, E. E. Bouhassira, S. A. Acharya, J. Ellis, I. M. London, C. J. Eaves, R. K. Humphries, Y. Beuzard, R. L. Nagel and P. Leboulch (2001). "Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy." Science 294(5550): 2368-71.
- Platt, O. S. (2008). "Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia." N Engl J Med 358(13): 1362-9.
- Redding-Lallinger, R. and C. Knoll (2006). "Sickle cell disease--pathophysiology and treatment." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 36(10): 346-76.
- Riddington, C. and W. Wang (2002). "Blood transfusion for preventing stroke in people with sickle cell disease." Cochrane Database Syst Rev(1): CD003146.
- Rubin, E. M., R. H. Lu, S. Cooper, N. Mohandas and Y. W. Kan (1988). "Introduction and expression of the human β -globin gene in transgenic mice." Am J Hum Genet 42(4): 585-91.

- Sadelain, M., S. Rivella, L. Lisowski, S. Samakoglu and I. Riviere (2004). "Globin gene transfer for treatment of the beta-thalassemias and sickle cell disease." Best Pract Res Clin Haematol 17(3): 517-34.
- Schnog, J. B., A. J. Duits, F. A. Muskiet, H. ten Cate, R. A. Rojer and D. P. Brandjes (2004). "Sickle cell disease; a general overview." Neth J Med 62(10): 364-74.
- Serjeant, G. R., M. C. Petch and B. E. Serjeant (1973). "The in vivo sickle phenomenon: a reappraisal." J Lab Clin Med 81(6): 850-6.
- Shartava, A., J. McIntyre, A. K. Shah and S. R. Goodman (2000). "The Gardos channel is responsible for CDNB-induced dense sickle cell formation." Am J Hematol 64(3): 184-9.
- Steinberg, M. H. (2006). "Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease." Trends Pharmacol Sci 27(4): 204-10.
- Telen, M. J. (2007). "Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease." Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007: 84-90.
- Thomas, J. E., M. Koshy, L. Patterson, L. Dorn and K. Thomas (1984). "Management of pain in sickle cell disease using biofeedback therapy: a preliminary study." Biofeedback Self Regul 9(4): 413-20.
- Tosteson, D. C., E. Carlsen and E. T. Dunham (1955). "The effects of sickling on ion transport. I. Effect of sickling on potassium transport." J Gen Physiol 39(1): 31-53.
- Tosteson, D. C., E. Shea and R. C. Darling (1952). "Potassium and sodium of red blood cells in sickle cell anemia." J Clin Invest 31(4): 406-11.
- Vekilov, P. G. (2007). "Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?" Br J Haematol 139(2): 173-84.
- Wang, W. C. (2007). "The pathophysiology, prevention, and treatment of stroke in sickle cell disease." Curr Opin Hematol 14(3): 191-7.

CHAPITRE III

Hémoglobine S et fibres polymères

III-1. LA STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE S

III-2. LES FORMES AGREGÉES DE L'HEMOGLOBINE S

III-3. LES FIBRES D'HEMOGLOBINE S

III-3-A STRUCTURE DES FIBRES

III-3-B INTERACTIONS MOLÉCULAIRES AU SEIN DES FIBRES

III-4. PROCESSUS DE FORMATION DES FIBRES D'HbS : LA POLYMERISATION

III-4-A THERMODYNAMIQUE DE LA POLYMERISATION D'HbS

III-4-B FACTEURS MODULATEURS DE LA POLYMERISATION

III-4-C EFFET DES AUTRES HEMOGLOBINES

III-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

III-1. LA STRUCTURE SPATIALE DE L'HEMOGLOBINE S

La résolution de la structure tridimensionnelle de la méthémoglobine de cheval a montré que la glutamine en position β_6 est située à la surface moléculaire. Cette observation suggère que la substitution de la glutamine par une valine à cette position n'a pas d'effet significatif sur la conformation protéique ([Perutz and Lehmann 1968]), et que les deux tétramères d'hémoglobine, HbA et HbS, possèdent des structures spatiales très similaires. Ceci est largement confirmé, à quelques exceptions près, comme nous le détaillons ci-après.

Les études comparatives des cristaux de désoxyHbS et de désoxyHbA, plus précisément sur deux molécules d'hémoglobines en contact dans le cristal, ont établi les éléments suivants ([Padlan and Love 1985a; Padlan and Love 1985b]).

Pour la compréhension de cette organisation moléculaire posons les règles ci après : les huit sous-unités constituant les deux molécules sont respectivement notées $1\alpha_1$, $1\alpha_2$, $1\beta_1$, $1\beta_2$, $2\alpha_1$, $2\alpha_2$, $2\beta_1$, $2\beta_2$ (le premier nombre désigne la molécule 1 ou 2 ; l'indice désigne la sous-unité 1 ou 2).

- La modification structurelle la plus importante concerne le déplacement, dans un mouvement de bascule, des hélices A de deux des quatre sous-unités β de la désoxyHbS. Ce mouvement résulte du déplacement de 5 Å des carbones α de la valine N-terminale et du rétrécissement de la poche de liaison du 2,3-diphosphoglycérate (« β -cleft »). Ce changement se produit dans les sous-unités $1\beta_2$ et $2\beta_2$. La valine de ces dernières forme un contact intermoléculaire avec les hélices E et F des sous-unités β de la molécule voisine (soit $2\beta_1$ et $1\beta_1$ respectivement).
- Un changement important de conformation est observé au niveau de l'Asp-73 de la sous-unité $2\beta_1$. Elle est plus intimement impliquée dans le contact intermoléculaire que Asp-73 de la sous unité $1\beta_1$. Ce déplacement résulte probablement de l'établissement des contacts intermoléculaires dans le cristal, mais il n'est pas le résultat direct de la

substitution de la valine β_6 . Par ailleurs, la comparaison des structures des sous-unités $1\beta_1$ et $2\beta_1$ avec les mêmes sous-unités de la désoxyHbA n'indique pas de différence. Hormis la modification de la région de contact autour de la valine β_6 , il n'y a pas ou peu de modifications des coordonnées atomiques entre les désoxyHbA et S.

La comparaison des propriétés fonctionnelles des hémoglobines S et A met en évidence non seulement des affinités identiques pour l'O₂, mais également des effets identiques du pH, du 2,3-diphosphoglycérate (DPG) et du CO₂ sur l'affinité apparente pour O₂ ([Allen and Wyman 1954; Bunn 1972; Rossi-Bernardi et coll. 1975; Gill et coll. 1979]). De plus, les cinétiques d'association et de dissociation des ligands ont été soigneusement comparées et elles ne diffèrent pas (cf. [Eaton and Hofrichter 1990]). Enfin, les vitesses de dissociation des tétramères en dimères sont similaires pour les hémoglobines A et S ([Ip et coll. 1976]).

Une différence est à noter néanmoins: la précipitation des complexes O₂ ou CO de l'HbS est beaucoup plus rapide que celle des complexes homologues de l'HbA ([Asakura et coll. 1973; Asakura et coll. 1974; Roth et coll. 1975]).

III-2. LES FORMES AGREGÉES DE L'HEMOGLOBINE S

L'hémoglobine S peut s'agréger en différentes formes macroscopiques, cristal, gel, fibres, domaines, fibres alignées (cf. [Eaton and Hofrichter 1990]). Le gel est l'une des formes pertinentes, d'un point de vue physiopathologique, car il présente les caractéristiques structurales du matériau qui se forme à l'intérieur du globule rouge drépanocytaire. Il s'agit d'un matériau semi-solide et hautement visqueux, obtenu par désoxygénation d'une solution concentrée d'HbS pré-ligandée, ou en réchauffant une solution préalablement désoxygénée, en l'absence d'agitation (Eaton and Hofrichter, 1990).

Deux autres formes agrégées d'HbS ont joué un rôle majeur dans l'analyse et la résolution de la structure tridimensionnelle des fibres. La première est le monocristal tridimensionnel obtenu par refroidissement, à partir duquel la structure de l'hémoglobine S a été déterminée. La seconde est la « nappe de fibres », forme para-cristalline (obtenue par agitation des solutions d'HbS) qui a permis l'obtention d'images en microscopie électronique de haute résolution ([Pumphrey and Steinhardt 1976]).

III-3. LES FIBRES D'HEMOGLOBINE S

Il est démontré que l'hémoglobine S s'agrège pour former une variété de structures. Malgré cette hétérogénéité apparente, une structure polymérique, prédominante, se forme dans la cellule, dans le gel, et -au moins initialement, dans les solutions agitées. Il s'agit de la fibre solide ([Edelstein 1983; Briehl et coll. 1990]).

III-3-A STRUCTURE DES FIBRES

La fibre « solide » peut être décrite comme un empilement de plateaux identiques de 6,4 nm d'épaisseur, composés de 14 molécules de HbS, avec une rotation de 7° de chaque disque relativement au plateau précédent. De section pseudo-elliptique, elle a un diamètre moyen de 21 nm ($a = 20$ nm, $b = 24$ nm ; Eaton and Hofrichter, 1990). La structure de base de cette fibre, déterminée par microscopie électronique et reconstruction d'image est constituée de 14 brins hélicoïdaux de molécules d'HbS, soit 4 brins internes, entourés par 10 brins externes [Dykes et coll. 1978; Dykes et coll. 1979].

Les études sur fibres incomplètes (auxquelles manquent des brins) montrent que la fibre de référence (14 brins) est organisée en 7 doubles brins (Dykes et al., 1979), avec un arrangement de molécules dans chaque double brin similaire à celui du cristal d'HbS ([Wishner et coll. 1975; Mu et coll. 1998]). Les quatre doubles brins les plus externes ont une

polarité opposée (en terme d'empilement) à celle des trois autres doubles brins ; à l'exception du brin central, les six autres doubles brins sont symétriquement liés ([Cretegy and Edelstein 1993; Mirchev and Ferrone 1997]).

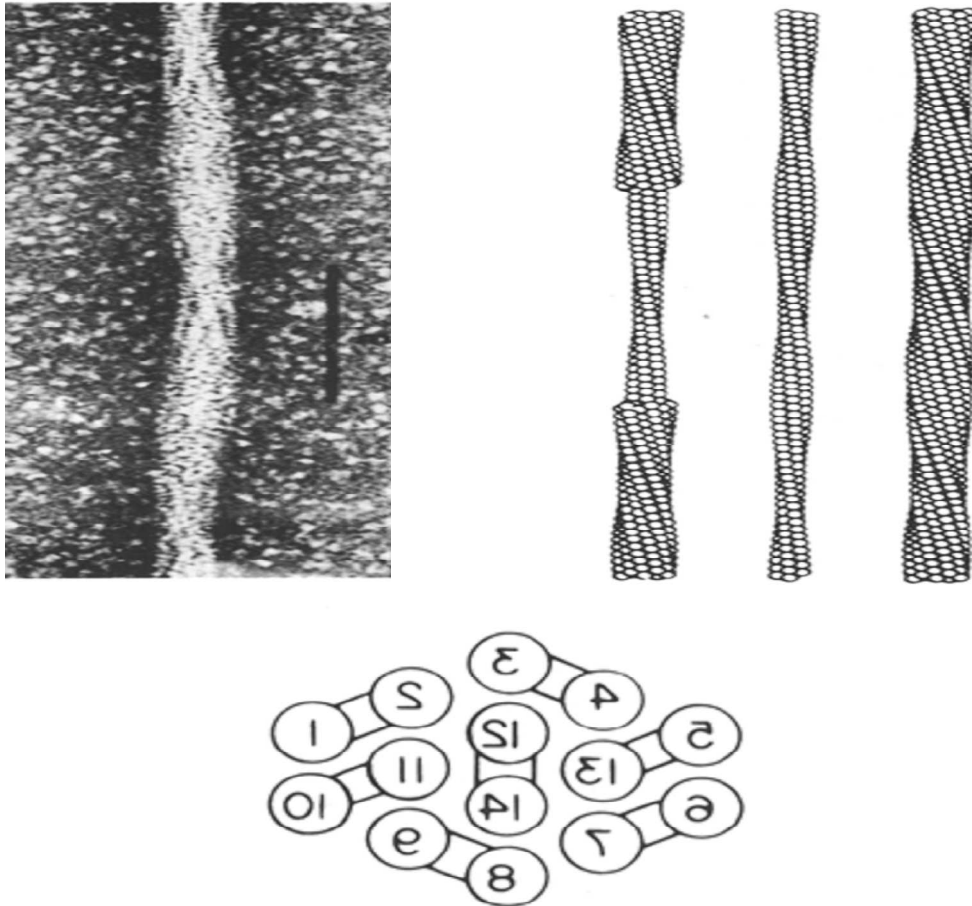


Figure 13 : Structure des fibres d'HbS
(Dykes, *Nature* 1978; JMB 1979 ; Crepeau, *PNAS* 1981)

III-3-B. INTERACTIONS MOLÉCULAIRES DANS LES FIBRES

La fibre solide d'HbS présente une structure très similaire aux doubles brins de désoxyhémoglobine S dans le monocristal (cf. Mu et al., 1998). Cette observation est essentielle car elle précise les détails des contacts intermoléculaires, y compris le contact clef impliquant la valine $\beta 6$. Or, celui-ci est supposé être quelque peu différent de celui existant

dans la fibre à 14 brins (Eaton and Hofrichter, 1990). Il existe trois types de contacts moléculaires dans le cristal de désoxyHbS :

- les contacts *axiaux* entre tétramères d'un même brin ;
- les contacts *latéraux entre deux brins* du même double brin ;
- les contacts *latéraux entre doubles brins*, au sein de la fibre ; ceux-ci se subdivisent en contacts entre doubles brins (i) parallèles et (ii) anti-parallèles.

Les interactions sont principalement du type van der Waal's, avec un petit nombre de liaisons hydrogène, ou ioniques ([Padlan and Love 1985a; Padlan and Love 1985b]).

Les modèles de doubles brins hélicoïdaux sont construits par transformation géométrique du double brin de cristal en double brin de fibre ([Mu et coll. 1998]). Ils montrent que dans le contact *axial* au sein d'un brin: le coude GH de la sous-unité α_1 et les résidus des hélices A et G, ainsi que le coude GH de la sous-unité β_1 d'une molécule, forment un contact avec le coude GH de la sous-unité α_2 et l'hélice G et le coude GH de la sous-unité β_2 de la molécule adjacente (cf. [Mu et coll. 1998]).

En ce qui concerne les deux *contacts latéraux entre deux brins*, l'hélice A de la sous-unité β_2 de l'un des brins forme un contact avec les hélices E et F et le coude EF, et l'hème. Dans les contacts latéraux, les résidus de l'hélice H et le coude GH de la sous-unité β_2 sont parfois impliqués. De plus, dans le contact latéral $2\beta_2/1\beta_1$, la valine β_6 de la $2\beta_2$ interagit principalement avec Ala70, Phe85 de la sous unité $1\beta_1$. Alors que dans le contact latéral $1\beta_2/2\beta_1$, la valine β_6 interagit principalement avec Ala70, Leu 88, et Asp73. L'interaction avec le carboxylate, négativement chargé, d'Asp 73 est intéressante car, dans l'hémoglobine A, ce contact latéral potentiel est supposé être déstabilisé par la répulsion électrostatique du carboxylate de l'acide glutamique β_6 (Eaton and Hofrichter, 1990).

Enfin, les études de copolymérisation suggèrent que les contacts entre doubles brins sont substantiellement différents de ceux du cristal. Ces études ont montré que parmi les huit mutants de la chaîne α qui affectent la polymérisation, seuls trois présentent un effet inhibiteur sur des sites de contact inter-doubles brins dans le cristal. De plus, les trois mutants de la chaîne β sur les sites qui participent aux contacts inter-doubles brins (dans le cristal) n'affectent pas la polymérisation ([Himanen et coll. 1996; Rao et coll. 2000; Li et coll. 2002]).

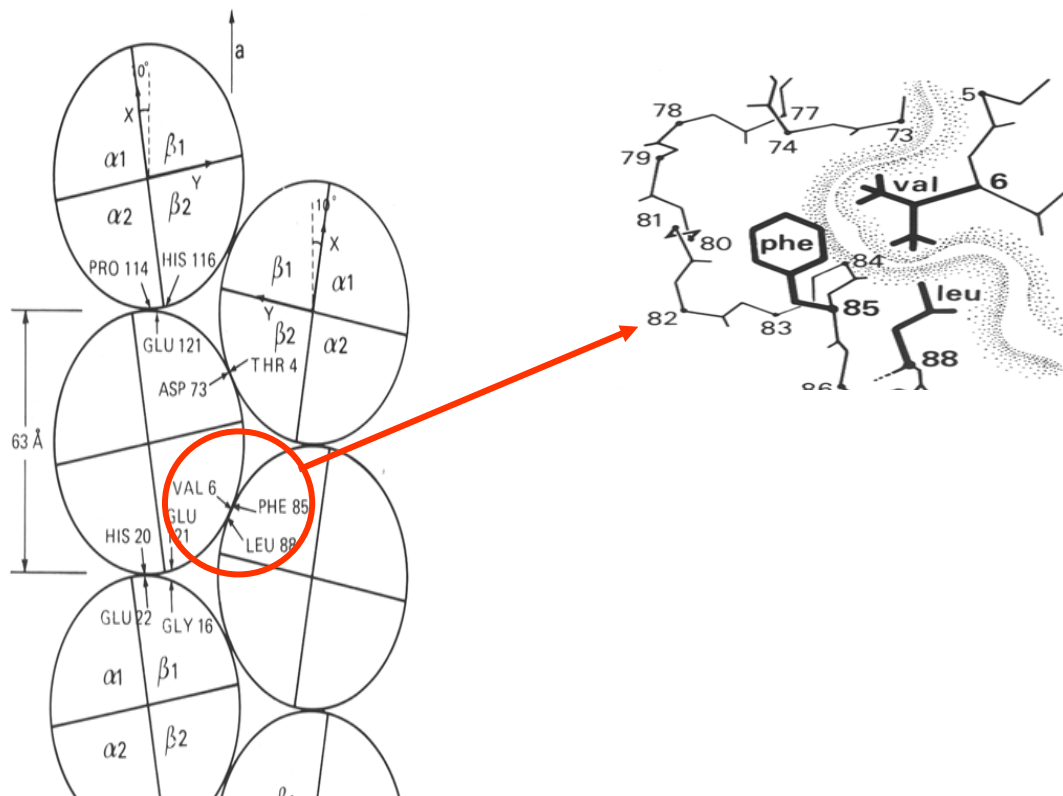


Figure 14 : Interaction impliquant la valine $\beta 6$ dans les fibres d'HbS
(Wishner, 1975)

III-4. PROCESSUS DE FORMATION DES FIBRES DE HbS : LA POLYMERISATION

La polymérisation de HbS est sans doute le mieux compris des processus d'auto-assemblage protéique. D'un point de vue biochimique la polymérisation est « simple », impliquant l'agrégation réversible de molécules d'hémoglobine. Mais de nombreux facteurs, physico-chimiques et physiologiques, tels que la concentration en HbS, la température, le degré et la dynamique d'oxygénation/désoxygénation, ou la présence d'autres hémoglobines, favorisent ou entravent, ce processus. *Ces éléments* influencent la thermodynamique et/ou la cinétique de polymérisation. De plus, ces facteurs interagissent et font de la polymérisation de HbS un processus d'autant plus complexe.

Nota bene : dans le contexte de la thermodynamique de la polymérisation de HbS, les hétérotétramères d'hémoglobine (64 kDa) sont considérés comme les « monomères ».

III-4-A. THERMODYNAMIQUE DE LA POLYMERISATION DE HbS

La polymérisation des protéines, également appelée « gélation », est un processus physicochimique, fondé sur des interactions non-covalentes régies par des facteurs d'ordre cinétique (cf. ci dessous) et thermodynamique.

Au premier ordre, la description thermodynamique du gel de HbS stipule qu'il est constitué de deux composants, l'hémoglobine et le solvant (l'eau), et que la phase *polymère* se comporte comme un cristal en équilibre avec phase *solution* des monomères. Ci-après, nous présentons successivement la notion de non-idéalité des solutions aqueuses (y compris des solutions protéiques), la notion de coefficient d'activité, la définition et les caractéristiques de la solubilité de HbS, et enfin l'application de ces notions aux solutions d'hémoglobine.

1. Non-idéalité des solutions : De façon générale, chaque particule en solution aqueuse est solvatée par des molécules d'eau. En effet, la molécule d' H_2O , bien que globalement neutre, est polarisée : la distribution électronique est telle que l'atome d'oxygène porte une charge partielle négative, tandis que les deux atomes d'hydrogène portent chacun une charge partielle positive. Ainsi, l'eau est-elle en mesure de solvater les cations comme les anions, mais également les macromolécules telles que les protéines (qui présentent à leur surface une population importante de résidus amino-acides chargés).

Dans le cas « simple », d'une solution d'ions monoatomiques, ceux-ci se trouvent isolés les uns des autres et leur comportement est indépendant de leur source (par exemple, l'ion Cl^- a un comportement propre, qu'il provienne de dissolution de NaCl ou de HCl).

En conséquent, il faut distinguer deux situations :

- dans le cas d'une solution très diluée, il existe suffisamment de molécules d'eau pour entourer complètement chaque ion. Il y a solvation complète. La concentration d'ions est faible, la distance entre un ion donné et son plus proche voisin est relativement grande. Chaque ion peut être considéré comme une entité séparée, qui se comporte indépendamment des ions présents. On dit que le comportement est *idéal* (une situation, hypothétique, analogue est décrite pour les gaz dans la théorie des gaz parfaits)
- à l'inverse, en solution concentrée :
 - (i) le nombre de molécules d'eau est insuffisant pour solvater complètement chaque ion. Un ion ne peut plus être complètement isolé de ses voisins ;
 - (ii) Les ions sont plus nombreux, donc plus proches les uns des autres, et des forces d'attraction (répulsion) s'exercent entre les ions de charges opposées (identiques). Le comportement individuel de chaque ion est influencé par la présence des autres. Un ion de charge donnée est entouré d'une atmosphère

ionique de charge opposée et cet arrangement évolue dynamiquement. Les propriétés de ces solutions sont modifiées avec la concentration. On dit le comportement de ces solutions est *non-idéal*.

Dans le cadre des solutions ioniques aqueuses « concentrées » (> 0,1 M), **Debye et Huckel** ont développé, au début du siècle dernier, une théorie physico-chimique intégrant l'influence de la distance moyenne entre les particules et celle de leur charge individuelle, menant à la notion d'*activité*.

2. L'activité et le coefficient d'activité : Les solutions ioniques, comme les solutions protéiques sont affectées par le degré de non-idéalité. Les diverses mesures faites sur celles-ci, telles que la détermination de l'osmolalité, ou des coefficients de diffusion, sont très différentes de celle attendues *a priori*, c'est-à-dire dans l'hypothèse *idéale*. Ainsi, en tout particulier, les solutions protéiques se comportent-elles comme si leur concentration était différente de la concentration nominale. La concentration effective qui en découle, ou « concentration efficace », est appelée *activité* et notée « a ». Il s'agit d'une grandeur de comportement qui prend en compte les interactions entre les différents constituants d'une solution. L'activité « a » d'un composé X est reliée à sa concentration « C » par la relation $a = \gamma \cdot C$, où γ , le *coefficient d'activité*, est un terme positif.

3. Solubilité de HbS : Les expériences de sédimentation ont révélé l'une des caractéristiques principales des solutions d'hémoglobine S. Deux types d'expériences ont été utilisés. Le premier consiste à centrifuger un gel de désoxy-HbS à grande vitesse, causant ainsi la sédimentation des polymères en un agrégat compact, et à séparer ensuite l'agrégat de la solution ([Allison 1957; Bertles et coll. 1970 ; Hofrichter et coll. 1976; Magdoff-Fairchild

et coll. 1976]). Ces expériences ont pour but de définir les caractéristiques de l'équilibre entre la phase solution et la phase solide (polymères). Les résultats de ces mesures de la concentration totale d'HbS montrent que la concentration de l'hémoglobine du surnageant à l'équilibre définit la solubilité.

Le fait que la solubilité soit la concentration totale étaye la pertinence du modèle à deux composants : la polymérisation dépend du seul équilibre entre cristal et solution de monomères. Pour qu'une certaine quantité de polymères, fût-elle minime, puisse se former, la phase solution doit être saturée avec les monomères, point au-delà duquel tout monomère de désoxy-HbS additionnel entre dans la phase polymère. A ce propos, il faut noter que, même à haute vitesse de sédimentation, les mesures de solubilité manquent de précision, car une fraction significative du volume de l'agrégat est occupée par la phase solution. Par ailleurs, les mesures de solubilité –et de concentration d'HbS dans le polymère, sont également entachées d'une imprécision liée au volume d'eau contenu dans les anfractuosités du polymères : ce volume d'eau interne au polymère, inaccessible aux monomères libres de HbS en solution, est appelé « Polymer Water Compartment » (PWC), et il en représente 60% v/w (ml/g; cf.[Lew and Bookchin 1991] [Bookchin et coll. 1994; Bookchin et coll. 1999]

Un deuxième type d'expérience de sédimentation a été mis au point (Briehl et Ewert, 1973; Briehl, 1978). Elle consiste à réaliser une centrifugation à grande vitesse, immédiatement suivie d'une centrifugation à faible vitesse, cette seconde phase permettant aux monomères libres « autour » de l'agrégat de diffuser. Ceci se traduirait par une meilleure séparation des phases solides et liquides.

La solubilité, d'un point de vue thermodynamique, représente un facteur clé dans le processus de polymérisation, d'une part elle ne dépend pas de la concentration totale, mais d'autre part dépend de la température (Ross and Minton, 1977). Elle conditionne l'étendue -

ou plus précisément la limite - du processus de polymérisation, et elle a permis de mettre en place une définition du coefficient d'activité du monomère d'HbS en phase *solution*.

4. Solutions d'hémoglobines et encombrement moléculaire : Les différents aspects évoqués ci-dessus, s'appliquent aux solutions d'hémoglobine et ils sont tous liés au concept d'encombrement macromoléculaire (« macromolecular crowding »).

De façon générale, les « solutions » protéiques présentent un comportement largement *non-idéal*, avec des particularités liées aux protéines et à leur nature [Hall and Minton 2002; Hall and Minton 2004; Minton 2006] :

- les protéines sont hautement concentrées dans leur environnement physiologique ; dans l'érythrocyte, la concentration d'hémoglobine est 4-6 mM en moyenne (soit 270-400 g/l) ;

- la taille des protéines est très significativement supérieure à celle du solvant (l'eau), de sorte que leur volume propre ne peut être négligé ; l'hémoglobine est approximativement 70 fois plus grande (linéairement) que la molécule d'eau (env. 1 vs 55 Å), ce qui se traduit par un volume de l'ordre de 125 000 Å³ ; un érythrocyte-type contient approximativement 300 millions de molécules d'hémoglobine (5 mM Hb, MCV « mean corpuscular volume » 90 fl) ;

L'une des conséquences de ces deux aspects est que la distance moyenne entre deux molécules d'hémoglobine *in situ* est de l'ordre de la taille de celles-ci (env 60 Å).

Comme nous l'avons rappelé plus haut, l'hémoglobine, HbA ou HbS, est une protéine dont les dimensions moléculaires sont très largement supérieures à celle de son solvant biologique (approx. 65 x 50 x 55 Å). La taille des molécules et les volumes qu'elles occupent en solution exercent une influence marquée sur l'expression analytique et donc sur la valeur

numérique des coefficients d'activité. En pratique, le coefficient d'activité de l'hémoglobine (HbS, HbA, HbF,...) augmente de $\approx 4^1$ à la solubilité (soit 2,5 mM) à près de 200 !

Les conséquences de l'encombrement macromoléculaire font l'objet de nombreuses études expérimentales et théoriques. Ainsi, la théorie du « macromolecular crowding » permet de traduire l'effet du volume des macromolécules sur les coefficients d'activité, *via* le volume exclu (« excluded volume non-ideality ») et la fraction du volume de solution effectivement occupé par ces macromolécules (pour plus de détails, voir la section *Résultats*). A cet égard, nous exploiterons dans notre travail deux théories « complémentaires », la SPT et la CPT ([Ross and Minton 1977; Ross et coll. 1978; Guttman et coll. 1995] ; pour revue récente, cf . [Minton 2005; Minton 2006]).

La théorie *SPT* (« Scaled Particle Theory ») traite les (macro) molécules telles que Hb comme des particules solides (« hard spheres »), non-interpénétrables et non-interagissantes donc au potentiel d'interaction nul. Traitant au premier ordre le solvant comme un *continuum*, la SPT a été proposée par Ross et Minton pour calculer les variations de solubilité de HbS en fonction de protéines « inertes » additionnelles (MSPT, Minton's ou Mean-field –SPT ; [Ross and Minton 1977; Guttman et coll. 1995]).

La théorie *CPT* (« Convex Particle Theory »), est applicable *a priori* à toute forme de particule, pour autant qu'elle soit convexe. Cette approche permet de calculer le coefficient d'activité de chaque partenaire macromoléculaire en solution, au travers du volume qui lui est effectivement disponible) [Minton 1998; Hall and Minton 2003]. L'utilisation de la théorie « CPT » à la description détaillée et dynamique de la non-idéalité des solutions de HbS polymérisante (monomères + fibres) constitue l'un des aspects originaux et apports notoires de notre travail.

¹ Autrement dit, Hb se comporte à la solubilité comme si sa concentration était 4 fois supérieure à sa valeur réelle ($\approx 2,5$ mM)

III-4-B. FACTEURS « MODULATEURS » DE LA POLYMERISATION DE HbS

Comme nous l'avons déjà précisé, de nombreux facteurs physico-chimiques modulent la polymérisation de HbS (cf. Eaton et Hofrichter, 1990). Parmi les plus déterminants se trouvent :

- la concentration de l'HbS,
- la température et le pH de la solution,
- les modulateurs allostériques de l'équilibre R-T du tétramère d'hémoglobine², tels que l'oxygène et le diphosphoglycérate (2,3-DPG).

Enfin, la présence d'autres hémoglobines (non-HbS) modifie notablement la polymérisation. Il a même été évoqué la possibilité que l'urée (molécule dénaturante des protéines) puisse influencer la polymérisation d'HbS ([Allison 1957; Elbaum and Herskovits 1974; Ross and Minton 1977]) : les résultats expérimentaux indiquent une certaine dépendance à l'urée, mais elle est négligeable.

1. Oxygénation/désoxygénation de HbS : L'oxygène représente la variable physiologique à laquelle la polymérisation de HbS est la plus sensible, la raison en étant que « seule » la conformation T (*Tense*, totalement désoxygénée) s'avère compétente pour la polymérisation (voir également la sous-section consacrée au 2,3-DPG). Rappelons que les ligands de Hb/HbS, peuvent s'y substituer, tels que le monoxyde de carbone, CO.

Il a été observé expérimentalement que la fraction de polymères formés diminue sensiblement avec l'augmentation du pourcentage de saturation en oxygène ([Noguchi et coll. 1980]). Les données de solubilité à différentes saturations d'oxygène montrent qu'à haute saturation en oxygène (supérieure à 20%), la solubilité augmente fortement pour atteindre 0,4

² (dont le pH fait partie)

g/cm^3 à 90% de saturation ([Rossi et coll. 1975; Sunshine et coll. 1982]). La solubilité des solutions saturées de carbomonoxyhémoglobine S (HbS lié par CO) est supérieure à $0,5 \text{ g/cm}^3$ ([Briehl and Ewert 1974] ; pour revue cf. Eaton et Hofrichter, 1990).

L'équation phénoménologique, construite à partir de ces sources expérimentales, reliant la solubilité à la fraction de saturation de la solution en oxygène, et à la température, est la suivante :

$$C_s (\text{g} / \text{cm}^3) = 0.321 - 0.00883T + 0.000125T^2 + 0.0924y_s + 0.0980y_s^3 + 0.235y_s^{15} \quad (\text{éq. III-1})$$

où y_s est la fraction de saturation de la phase solution en oxygène, et où T représente la température en °C (Eaton and Hofrichter, 1990).

Les courbes d'affinité à l'oxygène des solutions d'HbS et d'HbA, ont été comparées. A faibles concentrations en hémoglobine³, les résultats obtenus avec HbS et HbA sont identiques ([Gill et coll. 1979]). Pour les solutions à fortes concentrations en hémoglobine (5-7 mM) et saturées en oxygène –où aucun polymère ne peut se former - les courbes sont également identiques ([Gill et coll. 1979; Pumphrey et coll. 1979]). Ces résultats montrent que la phase solution du gel de HbS présente une affinité normale à l'oxygène. Qu'en est-il des courbes d'affinité à l'oxygène de la solution et du polymère de HbS ? Le polymère présente une plus faible affinité à l'oxygène que les molécules d'HbS en phase solution. Contrairement à la phase solution, le polymère lie l'oxygène de manière non coopérative jusqu'à une saturation d'environ 14% en oxygène ([Eaton and Hofrichter 1990; Abdu et coll. 2008]).

L'analyse des différentes données expérimentales conduit à un modèle à deux phases, dans lequel le gel consiste en une phase *solution* contenant des monomères d'hémoglobine S

³ inférieures à la solubilité pour éviter la polymérisation d'HbS

avec une affinité normale à l'oxygène et une phase *polymère* avec une affinité plus faible, avec une concentration totale d'hémoglobine dans le polymère constante de $0,69\text{g/cm}^3$ ([Sunshine et coll. 1979]).

Une étude moléculaire a apporté une réponse plus précise à la sensibilité du processus de polymérisation à l'oxygène en se basant sur les différents ligands d'hémoglobine présents en solution. En 1965, Monod et coll., se sont intéressés à la transition conformationnelle de l'état T (*Tense*, désoxygéné) à l'état R (*Relaxed*, oxygéné), et *vice-versa*, du tétramère d'hémoglobine. Ils ont ainsi développé un modèle dit « allostérique » pour décrire ces transitions. Dans ce modèle, la forme T est la forme à faible affinité pour l'oxygène, et la forme R celle à forte affinité. Lors de la transition T→R (ou R→T), des formes intermédiaires apparaissent, « partiellement ligandés » ([Monod et coll. 1965; Marden et coll. 1988; Marden et coll. 1998]). La figure 15 représente le passage de la forme R (à gauche) à la forme T (à droite). NB: cette illustration, très schématique, néglige entre autre les formes "intermédiaires" de type "R non ligandées" (sans oxygène) aussi bien que les formes "T ligandées".

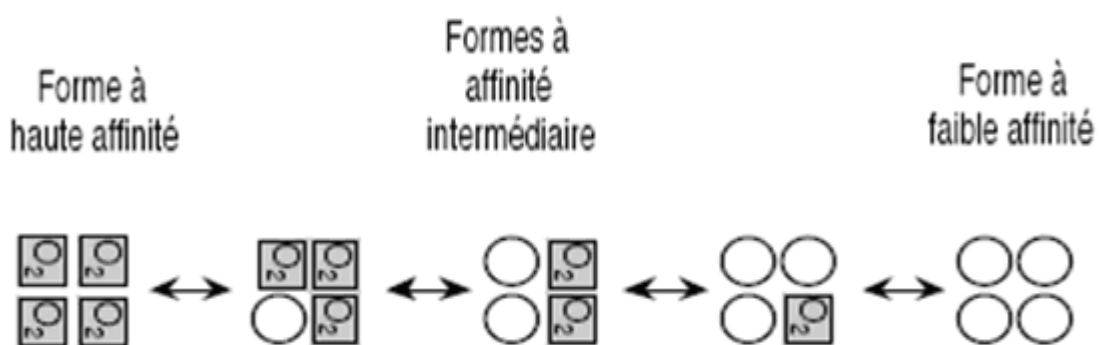


Figure 15 : Schémas de passage de l'hémoglobine de la forme R à la forme T
(<http://www.webbioch.net>)

Un modèle conceptuel simple de l'effet de l'oxygène sur la polymérisation, se fonde sur le modèle allostérique de Monod, Wyman et Changeux, en relation avec les données expérimentales ([Sunshine et coll. 1982]). Ce modèle explique la sensibilité de la polymérisation à l'oxygène par le fait que les molécules en conformation R ne peuvent polymériser. Par contre, toutes les molécules à l'état T, indépendamment du nombre de molécules d'oxygène liées, polymérisent avec la même probabilité ([Sunshine et coll. 1982] ; voir également [Eaton and Hofrichter 1990]).

2. Concentration de HbS et température. Selon les études expérimentales sur la formation du gel d'HbS, le gel se forme en chauffant une solution d'HbS liquide à une concentration appropriée. Ceci illustre la dépendance du processus de polymérisation vis-à-vis de la concentration et de la température (Eaton et Hofrichter, 1990). La dépendance vis à vis de la concentration se manifeste au travers de l'activité, ainsi que nous l'avons évoqué dans la section précédente -et que nous le développerons tout au long du chapitre *Résultats*.

Les expériences de sédimentation ont montré que la quantité de polymères formée croît avec la concentration d'HbS ([Corbett et coll. 1995]).

La dépendance entre polymérisation de HbS et la température se manifeste au travers de la relation solubilité/température ([Ross et coll. 1977; Ross et coll. 1978]). Par ailleurs, les données thermodynamiques montrent que l'énergie libre liée au processus est relativement constante, diminuant seulement de 0,6 kcal/mole quand la température augmente de 15°C à 45°C. Néanmoins, il existe une forte diminution de l'enthalpie et de l'entropie (7-11 kcal/mole), résultant de la réduction de capacité calorifique accompagnant la polymérisation. Le changement négatif d'enthalpie et d'entropie, et le changement négatif de la capacité calorifique, lors de la formation des polymères sont des caractéristiques de l'agrégation des protéines induite par les interactions hydrophobes ([Ross and Subramanian 1981; Baldwin

1986 ; Spolar et coll. 1989]). Cette observation indique que les contacts intermoléculaires dans les polymères sont composés majoritairement d'interactions dites « faibles », de type liaisons de Van der Waals, plutôt que de liaisons hydrogènes ou, *a fortiori* d'interactions ioniques. Les données structurales vont dans le sens de cette interprétation : dans le cristal de désoxyhémoglobine S, où les contacts *latéral* et *axial* dans le double brin sont très similaires à ceux présents dans le polymère, les interactions intermoléculaires sont principalement du type *Van der Waals* ([Padlan and Love 1985b] ; [Mu et coll. 1998]).

3. Effets du pH. L'effet du pH sur la polymérisation d'HbS s'exerce au travers de son effet sur la solubilité. Les premières expérimentations ont montré que, dans les conditions physiologiques ou proches (pH 6,9-7,2), la dépendance de la solubilité vis-à-vis du pH est quasi-linéaire ([Hofrichter et coll. 1976 ; Ross and Minton 1977; Ross et coll. 1977; Poillon and Kim 1990]). En ce qui concerne les pHs non-physiologiques, (i) dans la gamme 6,0-6,8, la solubilité de HbS ne dépend du pH, par contre (ii) aux pHs supérieurs à 7,3 une nette augmentation de la solubilité est observée, ainsi qu'une réduction de la nucléation ([Poillon and Kim 1990 ; Manno et coll. 2004] ; la *nucléation* sera présentée en détail dans le chapitre suivant). Ceci reflète le changement rapide de la charge nette de la molécule de désoxy-HbS dû à la titration progressive des chaînes *histidine latérales*. Parmi les dix résidus *histidine* de la chaîne α et les neuf résidus analogues de la chaîne β de l'HbS, un total de dix résidus intervient dans les contacts intermoléculaires du polymère. Il apparaît que la plupart des groupements imidazoles des histidines individuelles commencent à se déprotoner à un pH > 7,0, déstabilisant le polymère et inhibant ainsi la polymérisation ([Manno et coll. 2004]). Ces derniers auteurs attribuent les modifications induites à pH > 7,2 à la forte perturbation des configurations de l'« hydratation hydrophobe » (ie. organisation des molécules d'eau autour

des résidus hydrophobes, tels que la valine), et à l'énergie libre liée aux charges électriques impliquées ([Manno et coll. 2004]).

4. Effets du DPG. Le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) facilite la polymérisation de l'HbS, un effet qui s'exerce *via* la solubilité ([Poillon and Kim 1990; Garel et coll. 1994; Xu et coll. 1999]). La base moléculaire de cet effet est le déplacement de l'équilibre allostérique depuis la structure quaternaire oxygénée (c.a.d conformation « R » des sous-unités α et β) vers la forme désoxygénée « T ». Cette transition se produit quand le 2,3-DPG se lie à la fente (« β -cleft ») qui existe, au niveau du tétramère, entre les chaînes β . La modification de conformation se traduit par un rapprochement de $\approx 0,2$ nm entre les hélices A de la chaîne β . Ceci facilite la polymérisation en altérant la disposition spatiale des deux résidus valine β_6 , de sorte que le contact intermoléculaire crucial (de type *latéral*) de « 1 Val β_2 » avec « 2 Phe $85\beta_1$ » soit renforcé, stabilisant ainsi le polymère ([Poillon and Kim 1990] ; cf. également [Mirchev and Ferrone 1997; Mu et coll. 1998 ; Ferrone 2004]).

III-4-C EFFET DES AUTRES HEMOGLOBINES

La fraction d'hémoglobine S dans les globules rouges varie considérablement entre les différentes formes hétérozygotes et homozygotes. La situation la plus commune concernant le trait drépanocytaire est l'état hétérozygote bénin dans lequel il y a 30-40% d'hémoglobine S et 60-70% d'hémoglobine A ([Wells and Itano 1951; Brittenham 1977; Huisman 1977; Serjeant 1985]). Une rare, mais importante, condition homozygote est l'état pathogène avec une persistance de l'hémoglobine fœtale, dans lequel les globules rouges contiennent 20-35% d'hémoglobine F et 65-80% d'hémoglobine S ([Weatherall and Clegg 1972; Serjeant 1985]), pour atténuer les symptômes drépanocytaires, l'une des pistes thérapeutiques actuelles consiste précisément en l'élévation du taux de l'hémoglobine fœtale. En effet, celle-ci inhibe

la polymérisation ([Ma et coll. 2007; Mellouli and Bejaoui 2008; Haynes et coll. 2008]). L'hémoglobine A₂ possède également cette propriété, mais HbF présente un effet inhibiteur nettement plus élevé que HbA₂ ([Poillon et coll. 1993]).

De fait, ces hémoglobines « non-HbS » affectent la polymérisation d'HbS de trois manières :

- (i) en augmentant les coefficients d'activité (« non-idéalité due au volume exclus », cf. section III-4-A),
- (ii) en co-polymérisant,
- (iii) en formant des hybrides (exemple avec HbA: $\alpha_2^A \beta^A \beta^S$), qui peuvent agir selon le premier et/ou le second mécanisme(s).

Le coefficient d'activité -qui dépend de la concentration d'hémoglobine, dérive des données de sédimentation et de pression osmotique (cf. [Ross et coll. 1978 ; Eaton and Hofrichter 1990]). La formation des hybrides peut être obtenue en mélangeant les hémoglobines, en l'absence de l'oxygène. Cependant, les déterminations de l'ampleur de la co-polymérisation ont mené à des résultats contradictoires, en particulier pour l'HbF. Les mesures de concentrations d'HbF dans l'agrégat (après centrifugation du gel) ont mené Bertles et coll 1968. à conclure que l'HbF ne co-polymérise pas avec l'HbS ([Bertles and Milner 1968]). En adéquation avec les résultats de Behe et Englander qui ont analysés le surnageant ([Behe and Englander 1979]). A l'inverse, Goldberg et coll. mettent en évidence une co-polymérisation d'HbS et HbF sous des conditions d'hybridation et de non-hybridation ([Goldberg et coll. 1977]). Finalement, l'analyse de la solubilité totale de mélanges d'hémoglobines, ainsi que des considérations théoriques, mènent à la conclusion que seules les molécules de désoxy-HbS polymérisent dans les mélanges avec l'HbF ([Sunshine et coll. 1979; Benedict et coll. 1981; Sunshine et coll. 1982; Eaton and Hofrichter 1990]).

III-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdu, A., J. Gomez-Marquez and T. K. Aldrich (2008). "The oxygen affinity of sickle hemoglobin." Respir Physiol Neurobiol **161**(1): 92-4.
- Allen, D. W. and J. Wyman, Jr. (1954). "[Equilibrium of drepanocyte hemoglobin with oxygen.]" Rev Hematol **9**(2): 155-7.
- Allison, A. C. (1957). "Properties of sickle-cell haemoglobin." Biochem J **65**(2): 212-9.
- Asakura, T., P. L. Agarwal, D. A. Relman, J. A. McCray, B. Chance, E. Schwartz, S. Friedman and B. Lubin (1973). "Mechanical instability of the oxy-form of sickle haemoglobin." Nature **244**(5416): 437-8.
- Asakura, T., T. Onishi, S. Friedman and E. Schwartz (1974). "Abnormal precipitation of oxyhemoglobin S by mechanical shaking." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(5): 1594-8.
- Baldwin, R. (1986). "Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding." PNAS **83**: 8069-8072.
- Behe, M. J. and S. W. Englander (1979). "Mixed gelation theory. Kinetics, equilibrium and gel incorporation in sickle hemoglobin mixtures." J Mol Biol **133**(1): 137-60.
- Benedict, R. C., B. Richey, L. Fall, S. J. Gill, R. L. Nagel and J. Wyman (1981). "Thermodynamics of anti-sickling agents with hemoglobin S." J Mol Biol **150**(3): 423-34.
- Bertles, J. F. and P. F. Milner (1968). "Irreversibly sickled erythrocytes: a consequence of the heterogeneous distribution of hemoglobin types in sickle-cell anemia." J Clin Invest **47**(8): 1731-41.
- Bertles, J. F., R. Rabinowitz and J. Dobler (1970). "Hemoglobin interaction: modification of solid phase composition in the sickling phenomenon." Science **169**(943): 375-7.
- Bookchin, R. M., T. Balazs and V. L. Lew (1994). "Measurement of the hemoglobin concentration in deoxyhemoglobin S polymers and characterization of the polymer water compartment." J Mol Biol **244**(1): 100-9.
- Bookchin, R. M., T. Balazs, Z. Wang, R. Josephs and V. L. Lew (1999). "Polymer structure and solubility of deoxyhemoglobin S in the presence of high concentrations of volume-excluding 70-kDa dextran. Effects of non-s hemoglobins and inhibitors." J Biol Chem **274**(10): 6689-97.
- Briehl, R. W. and S. M. Ewert (1974). "Gelation of sickle cell haemoglobin. II. Methaemoglobin." J Mol Biol **89**(4): 759-66.
- Briehl, R. W., E. S. Mann and R. Josephs (1990). "Length distributions of hemoglobin S fibers." J Mol Biol **211**(4): 693-8.
- Brittenham, G. (1977). "Genetic model for observed distributions of proportions of haemoglobin in sickle-cell trait." Nature **268**(5621): 635-6.

- Bunn, H. F. (1972). "The interaction of sickle hemoglobin with DPG, CO₂ and with other hemoglobins: formation of asymmetrical hybrids." Adv Exp Med Biol **28**: 41-53.
- Corbett, J. D., W. E. Mickols and M. F. Maestre (1995). "Effect of hemoglobin concentration on nucleation and polymer formation in sickle red blood cells." J Biol Chem **270**(6): 2708-15.
- Cretegny, I. and S. J. Edelstein (1993). "Double strand packing in hemoglobin S fibers." J Mol Biol **230**(3): 733-8.
- Dykes, G., R. H. Crepeau and S. J. Edelstein (1978). "Three-dimensional reconstruction of the fibres of sickle cell haemoglobin." Nature **272**(5653): 506-10.
- Dykes, G. W., R. H. Crepeau and S. J. Edelstein (1979). "Three-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of hemoglobin S." J Mol Biol **130**(4): 451-72.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1990). "Sickle cell hemoglobin polymerization." Adv Protein Chem **40**: 63-279.
- Edelstein, S. J. (1983). "Molecular architecture of the fibers of sickle (SS) hemoglobin." Am J Pediatr Hematol Oncol **5**(4): 386-9.
- Elbaum, D. and T. T. Herskovits (1974). "Dissociation of human hemoglobin by the ureas and amides. Osmotic pressure and light scattering studies." Biochemistry **13**(6): 1268-78.
- Ferrone, F. A. (2004). "Polymerization and sickle cell disease: a molecular view." Microcirculation **11**(2): 115-28.
- Garel, M. C., N. Arous, M. C. Calvin, C. T. Craescu, J. Rosa and R. Rosa (1994). "A recombinant bisphosphoglycerate mutase variant with acid phosphatase homology degrades 2,3-diphosphoglycerate." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3593-7.
- Gill, S. J., R. C. Benedict, L. Fall, R. Spokane and J. Wyman (1979). "Oxygen binding to sickle cell hemoglobin." J Mol Biol **130**(2): 175-89.
- Goldberg, M. A., M. A. Husson and H. F. Bunn (1977). "Participation of hemoglobins A and F in polymerization of sickle hemoglobin." J Biol Chem **252**(10): 3414-21.
- Guttman, H. J., C. F. Anderson and M. T. Record, Jr. (1995). "Analyses of thermodynamic data for concentrated hemoglobin solutions using scaled particle theory: implications for a simple two-state model of water in thermodynamic analyses of crowding in vitro and in vivo." Biophys J **68**(3): 835-46.
- Hall, D. and A. P. Minton (2002). "Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. I. Equilibrium models." Biophys Chem **98**(1-2): 93-104.
- Hall, D. and A. P. Minton (2003). "Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges." Biochim Biophys Acta **1649**(2): 127-39.

- Hall, D. and A. P. Minton (2004). "Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. II. Kinetic models for nucleated fiber growth." *Biophys Chem* **107**(3): 299-316.
- Haynes, J., Jr., B. Obiako, R. B. Hester, B. S. Baliga and T. Stevens (2008). "Hydroxyurea attenuates activated neutrophil-mediated sickle erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure and adhesion to pulmonary vascular endothelium." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(1): H379-85.
- Himanen, J. P., U. A. Mirza, B. T. Chait, R. M. Bookchin and J. M. Manning (1996). "A recombinant sickle hemoglobin triple mutant with independent inhibitory effects on polymerization." *J Biol Chem* **271**(41): 25152-6.
- Hofrichter, J., P. D. Ross and W. A. Eaton (1976). "Supersaturation in sickle cell hemoglobin solutions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(9): 3035-9.
- Huisman, T. H. (1977). "Trimodality in the percentages of beta chain variants in heterozygotes: the effect of the number of active Hbalpha structural loci." *Hemoglobin* **1**(4): 349-82.
- Ip, S. H., M. L. Johnson and G. K. Ackers (1976). "Kinetics of deoxyhemoglobin subunit dissociation determined by haptoglobin binding: estimation of the equilibrium constant from forward and reverse rates." *Biochemistry* **15**(3): 654-60.
- Lew, V. L. and R. M. Bookchin (1991). "Osmotic effects of protein polymerization: analysis of volume changes in sickle cell anemia red cells following deoxy-hemoglobin S polymerization." *J Membr Biol* **122**(1): 55-67.
- Li, X., R. W. Briehl, R. M. Bookchin, R. Josephs, B. Wei, J. M. Manning and F. A. Ferrone (2002). "Sickle hemoglobin polymer stability probed by triple and quadruple mutant hybrids." *J Biol Chem* **277**(16): 13479-87.
- Ma, Q., D. F. Wyszynski, J. J. Farrell, A. Kutlar, L. A. Farrer, C. T. Baldwin and M. H. Steinberg (2007). "Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea." *Pharmacogenomics J* **7**(6): 386-94.
- Magdoff-Fairchild, B., W. N. Poillon, T. Li and J. F. Bertles (1976). "Thermodynamic studies of polymerization of deoxygenated sickle cell hemoglobin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(4): 990-4.
- Manno, M., P. L. San Biagio and M. U. Palma (2004). "The role of pH on instability and aggregation of sickle hemoglobin solutions." *Proteins* **55**(1): 169-76.
- Marden, M. C., L. Kiger, C. Poyart and S. J. Edelstein (1998). "Identifying the conformational state of bi-liganded haemoglobin." *Cell Mol Life Sci* **54**(12): 1365-84.
- Marden, M. C., J. Kister, B. Bohn and C. Poyart (1988). "T-state hemoglobin with four ligands bound." *Biochemistry* **27**(5): 1659-64.
- Mellouli, F. and M. Bejaoui (2008). "[The use of hydroxyurea in severe forms of sickle cell disease: study of 47 Tunisian paediatric cases]." *Arch Pediatr* **15**(1): 24-8.

- Minton, A. P. (1998). "Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion." Methods Enzymol **295**: 127-49.
- Minton, A. P. (2005). "Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: predictions and observations." J Pharm Sci **94**(8): 1668-75.
- Minton, A. P. (2006). "Macromolecular crowding." Curr Biol **16**(8): R269-71.
- Mirchev, R. and F. A. Ferrone (1997). "The structural link between polymerization and sickle cell disease." J Mol Biol **265**(5): 475-9.
- Monod, J., J. Wyman and J. P. Changeux (1965). "On the Nature of Allosteric Transitions: a Plausible Model." J Mol Biol **12**: 88-118.
- Mu, X. Q., L. Makowski and B. Magdoff-Fairchild (1998). "Analysis of the stability of hemoglobin S double strands." Biophys J **74**(1): 655-68.
- Noguchi, C. T., D. A. Torchia and A. N. Schechter (1980). "Determination of deoxyhemoglobin S polymer in sickle erythrocytes upon deoxygenation." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(9): 5487-91.
- Padlan, E. A. and W. E. Love (1985a). "Refined crystal structure of deoxyhemoglobin S. I. Restrained least-squares refinement at 3.0-A resolution." J Biol Chem **260**(14): 8272-9.
- Padlan, E. A. and W. E. Love (1985b). "Refined crystal structure of deoxyhemoglobin S. II. Molecular interactions in the crystal." J Biol Chem **260**(14): 8280-91.
- Perutz, M. F. and H. Lehmann (1968). "Molecular pathology of human haemoglobin." Nature **219**(5157): 902-9.
- Poillon, W. N. and B. C. Kim (1990). "2,3-Diphosphoglycerate and intracellular pH as interdependent determinants of the physiologic solubility of deoxyhemoglobin S." Blood **76**(5): 1028-36.
- 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." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5039-43.
- Pumphrey, J. G., K. Holroyd and A. P. Minton (1979). "Oxygen equilibrium of emulsified solutions of normal and sickle hemoglobin." Biochem Biophys Res Commun **88**(3): 980-7.
- Pumphrey, J. G. and J. Steinhardt (1976). "Formation of needle-like aggregates in stirred solutions of hemoglobin S1." Biochem Biophys Res Commun **69**(1): 99-105.
- Rao, M. J., A. Malavalli, B. N. Manjula, R. Kumar, M. Prabhakaran, D. P. Sun, N. T. Ho, C. Ho, R. L. Nagel and A. S. Acharya (2000). "Interspecies hybrid HbS: complete neutralization of Val6(beta)-dependent polymerization of human beta-chain by pig alpha-chains." J Mol Biol **300**(5): 1389-406.

- Ross, P. D., R. W. Briehl and A. P. Minton (1978). "Temperature dependence of nonideality in concentrated solutions of hemoglobin." Biopolymers **17**(9): 2285-8.
- Ross, P. D., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1977). "Thermodynamics of gelation of sickle cell deoxyhemoglobin." J Mol Biol **115**(2): 111-34.
- Ross, P. D. and A. P. Minton (1977). "Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions." J Mol Biol **112**(3): 437-52.
- Ross, P. D. and S. Subramanian (1981). "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability." Biochemistry **20**(11): 3096-102.
- Rossi-Bernardi, L., M. Luzzana, M. Samaja, M. Davi, D. DaRiva-Ricci, J. Minoli, B. Seaton and R. L. Berger (1975). "Continuous determination of the oxygen dissociation curve for whole blood." Clin Chem **21**(12): 1747-53.
- Rossi, F., M. Perrella, D. Bresciani, G. Guglielmo and L. Rossi-Bernardi (1975). "Cyanate and hemoglobin-S: effect of carbamylation of the alpha and beta chain alpha-amino groups on O₂ affinity." FEBS Lett **55**(1): 99-101.
- Roth, E. F., Jr., D. Elbaum and R. L. Nagel (1975). "Observations on the mechanical precipitation of oxy Hb S and other mutants." Blood **45**(3): 377-86.
- Serjeant, G. R. (1985). "Treatment of sickle cell disease in early childhood in Jamaica." Am J Pediatr Hematol Oncol **7**(3): 235-9.
- Spolar, R. S., J. H. Ha and M. T. Record, Jr. (1989). "Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(21): 8382-5.
- Sunshine, H. R., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1979). "Gelation of sickle cell hemoglobin in mixtures with normal adult and fetal hemoglobins." J Mol Biol **133**(4): 435-67.
- Sunshine, H. R., J. Hofrichter, F. A. Ferrone and W. A. Eaton (1982). "Oxygen binding by sickle cell hemoglobin polymers." J Mol Biol **158**(2): 251-73.
- Weatherall, D. J. and J. B. Clegg (1972). "Haemoglobin synthesis in thalassaemia: two new molecular mechanisms for the production of the clinical picture of thalassaemia." Hamatol Bluttransfus **10**: 237-9.
- Wells, I. C. and H. A. Itano (1951). "Ratio of sickle-cell anemia hemoglobin to normal hemoglobin in sicklemics." J Biol Chem **188**(1): 65-74.
- Wishner, B. C., K. B. Ward, E. E. Lattman and W. E. Love (1975). "Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution." J Mol Biol **98**(1): 179-94.
- Xu, A. S., R. J. Labotka and R. E. London (1999). "Acetylation of human hemoglobin by methyl acetylphosphate. Evidence of broad regio-selectivity revealed by NMR studies." J Biol Chem **274**(38): 26629-32.

CHAPITRE IV

Rationnel et objectif :

Modélisation de la polymérisation de HbS

IV-1 CINETIQUE DE POLYMERISATION DE L'HEMOGLOBINE S

IV-2 DETECTION EXPERIMENTALE DE LA FORMATION DES POLYMERES

IV-3 LE MODELE DE DOUBLE NUCLEATION

IV-4 APPROCHE CONCEPTUELLE ET BUT DE L'ETUDE

IV-5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

IV-1. CINÉTIQUE DE POLYMERISATION DE L'HEMOGLOBINE S

Les études expérimentales de la polymérisation de HbS, en tant que processus dynamique ont joué un double rôle. D'une part, elles ont permis de savoir quels paramètres physico-chimiques et physiologiques influencent le processus de polymérisation (cf. Chap. III). D'autre part, elles étayaient la compréhension de la physiopathologie drépanocytaire, et conduisent à des hypothèses pharmaco-thérapeutiques (cf. Chap. II ; [Eaton and Hofrichter 1987 ; Eaton and Hofrichter 1990; Frenette and Atweh 2007]).

Expérimentalement, la caractéristique principale de la dynamique de formation des polymères est le temps de latence ou « *delay time* ». Celui-ci représente la période durant laquelle aucune agrégation, aucun polymère n'est décelable quelle que soit la méthode de détection utilisée. Au-delà de ce temps caractéristique, les polymères se développent à la fois de façon extrêmement rapide ET autocatalytique ([Hofrichter et coll. 1974 ; Moffat and Gibson 1974 ; Malfa and Steinhardt 1974]). Le temps de latence constitue non seulement une information fondamentale sur la polymérisation de HbS, mais, aussi et surtout, il est l'indicateur cinétique le plus « accessible » -ce qui en fait la donnée expérimentale la plus étudiée et exploitée. En particulier, le modèle initial de double nucléation, qui est à la base de ce travail (et décrit en détail dans la section IV-3), a été validé et utilisé uniquement dans sa version linéaire, *via* le temps de latence (ou des variables expérimentales qui en dépendent ; [Bishop and Ferrone 1984; Ferrone et coll. 1985a; Ferrone et coll. 1985b; Cao and Ferrone 1996; Cao and Ferrone 1997; Li et coll. 2002; Ferrone et coll. 2002; Rotter et coll. 2005b; Rotter et coll. 2005a])

IV-2 DETECTION EXPERIMENTALE DE LA FORMATION DES POLYMERES

La formation des polymères de HbS peut être détectée par une variété de techniques expérimentales, incluant les mesures :

- de biréfringence linéaire ([Hofrichter et coll. 1974; Hofrichter et coll. 1976]),
- de dichroïsme circulaire ([Li et coll. 2002]),
- de turbidité ([Hofrichter et coll. 1976 ; Ferrone et coll. 1985a] ; [Sunshine et coll. 1979] ; [Moffat and Gibson 1974] ; [Wenger and Balcerzak 1984]),
- de diffusion de la lumière ([Nishio et coll. 1983]; [Pumphrey and Steinhardt 1976; Madonia et coll. 1983]),
- de viscosité ([Behe and Englander 1979] ; [Wenger and Balcerzak 1984] ; [Malfa and Steinhardt 1974]),
- de microcalorimétrie ([Malfa and Steinhardt 1974] ; [Hofrichter et coll. 1974]),

Citons aussi les méthodes d'imagerie par résonance magnétique ([Noguchi et coll. 1980; Rao et coll. 2000]), et par résonance paramagnétique électronique ([Thiyagarajan and Johnson 1983; Morse and Warth 1990]).

Le signal expérimental fourni par ces différentes techniques est proportionnel à la quantité de monomères polymérisés. De ce fait, le chercheur obtient des courbes de polymérisation isomorphes : une phase précoce, le temps de latence - où aucun signal expérimental n'est détecté - une phase de croissance « exponentielle » correspondant à la croissance rapide et auto-catalytique des polymères et à leur croissance.

A l'inverse, le processus de dépolymérisation (« melting ») est rapide et se développe sans retard. Ceci a été mis en évidence dans des expériences de réduction de température d'un gel préformé d'HbS ([Moffat and Gibson 1974; Peetermans et coll. 1986; Agarwal et coll. 2002] ; cf. également [Turner et coll. 2006] et revue [Eaton and Hofrichter 1990]).

Globalement, l'aspect le plus frappant de ces phénomènes est que le temps de latence est extrêmement sensible aux conditions expérimentales, et tout particulièrement à la concentration d'HbS. En effet, le temps de latence s'avère inversement proportionnel à la 30-

à 50^{ème} puissance de la concentration initiale d'HbS ([Hofrichter et coll. 1974; Hofrichter et coll. 1976; Sunshine et coll. 1979]). Autrement dit, plus la concentration est élevée plus le temps de latence est réduit. C'est la plus forte dépendance connue, vis-à-vis de la concentration, pour un processus en solution. Par ailleurs, le temps de latence est directement proportionnel à la solubilité, élevée à une puissance de l'ordre de ≈ 40 , indépendamment de la méthode utilisée pour moduler la-dite solubilité ([Hofrichter et coll. 1976; Noguchi and Schechter 1985]).

Une formulation empirique du temps de latence « t_d » (exprimé en s^{-1}) a été tirée de ces résultats :

$$\frac{1}{t_d} = k \left(\frac{C_0}{C_s} \right)^n \quad (\text{éq IV-1})$$

où, C_0 est la concentration totale en HbS avant précipitation; C_s est la solubilité de HbS à l'équilibre (déterminée après que le processus de précipitation soit achevé) ; k et n sont des constantes, k valant environ 10^{-7} et n variant entre 30 et 50. Une analyse, informée et très détaillée, du lien phénoménologique existant entre « temps de latence », « concentration initiale » et « solubilité » est présentée dans la revue de Eaton et Hofrichter ([Eaton and Hofrichter 1990]).

Essentiellement, deux techniques ont été utilisées pour déterminer le temps de latence. La première est une technique classique en cinétique enzymatique rapide, à savoir le « saut de température » (« *temperature jump* ») qui consiste à soumettre une solution d'HbS désoxygénée à une élévation « brusque » de température (depuis 4°C jusqu'à une température permettant la polymérisation, (typiquement dans la gamme 15-40°C, cf. [Ferrone et coll. 1985a]). Pour des raisons techniques, liées en particulier au rapport entre temps de latence et temps d'équilibration thermique du volume expérimental, cette méthode est limitée aux temps de latence supérieurs à une centaine de secondes ($HbS < 4,5 \text{ mM}$).

Pour étendre les mesures cinétiques aux temps plus courts, et aux concentrations physiologiques de HbS (5-6 mM), la technique de photolyse induite par laser a été utilisée. Avec cette méthode, on peut obtenir une solution d'HbS complètement désoxygénée (en conformation « T ») en quelques millisecondes ([Coletta et coll. 1982; Nishio et coll. 1983; Ferrone et coll. 1985a; Aprelev et coll. 2005; Rotter et coll. 2005b; Aprelev et coll. 2007]). Dans cette technique, le complexe « HbSCO » (conformation « R » ; HbS-[CO]₄), soluble jusqu'à au moins 48 g/dl (\approx 7 mM), peut être converti en désoxy-HbS par photodissociation du CO sous illumination laser. Le laser sert également de source de contrôle de la formation des polymères, via l'évolution de la diffusion de la lumière. Quand le laser est arrêté, le CO se re-lie à HbS des polymères et ceux-ci se redissocient en une solution de monomères. L'expérience peut être répétée ainsi indéfiniment. Etant donné que les volumes d'observation sont de l'ordre de 10^{-11} ml (soit une dizaine de femtolitres), la technique de photolyse-laser a pu également être utilisée pour déterminer la formation *intra-érythrocytaire* de polymères ([Coletta et coll. 1982 ; Mozzarelli et coll. 1987a] ; voir également, [Nishio et coll. 1983], utilisant la diffraction laser ; pour une revue des aspects techniques liés à la détection des polymères *in situ*, cf.[Mozzarelli et coll. 1987b]).

Les techniques de photolyse-laser et de « saut de température », ont été utilisées par Ferrone et coll. pour déterminer la dynamique complète de polymérisation de HbS dans une large gamme de concentrations (3-6 mM) et de températures (15-35°C), ce qui a permis à ces auteurs de mettre en place et de valider le modèle dit de « double nucléation » de la polymérisation de HbS que nous présentons dans la section suivante ([Ferrone et coll. 1985b; Ferrone et coll. 1985a; Hofrichter 1986]).

Signalons enfin que l'utilisation de modèles de souris « drépanocytaires » transgéniques (SAD, exprimant une version modifiée du HbS, Hb-SAD, et BERK – « Berkeley », dont le tableau pathologique est plus sévère) a permis de montrer que

l'inhibition de la polymérisation de HbS, par introduction d'un gène variant de la β^A -globine, augmente le temps de latence et réduit la falciformation ([Paszty 1997 ; Pawliuk et coll. 2001]).

IV-3 LE MODELE DE DOUBLE NUCLEATION

Sur la base de travaux antécédents [Hofrichter et coll. 1974 ; Hofrichter et coll. 1976; Ross et coll. 1977 ; Ferrone et coll. 1980 ; Coletta et coll. 1982; Sunshine et coll. 1982], Ferrone et coll. ont développé un modèle de la polymérisation de l'hémoglobine S. Ce modèle est dit de « double nucléation » car il postule que les fibres polymères de HbS se développent à partir de *noyaux* (terminologie empruntée à la chimie des polymères), formés en solution ou à la surface de polymères pré-existants ([Ferrone et coll. 1985b]). L'hypothèse de l'existence de deux voies de nucléation a été avancée dès 1980 par Ferrone et coll., avec la publication d'une version « exploratoire » de leur modèle ([Ferrone et coll. 1980]), mais ce n'est que 5 ans plus tard, avec la publication du modèle affiné et « complet » en tant qu'objet mathématique que le terme « double nucléation » est proposé ([Ferrone et coll. 1985b]).

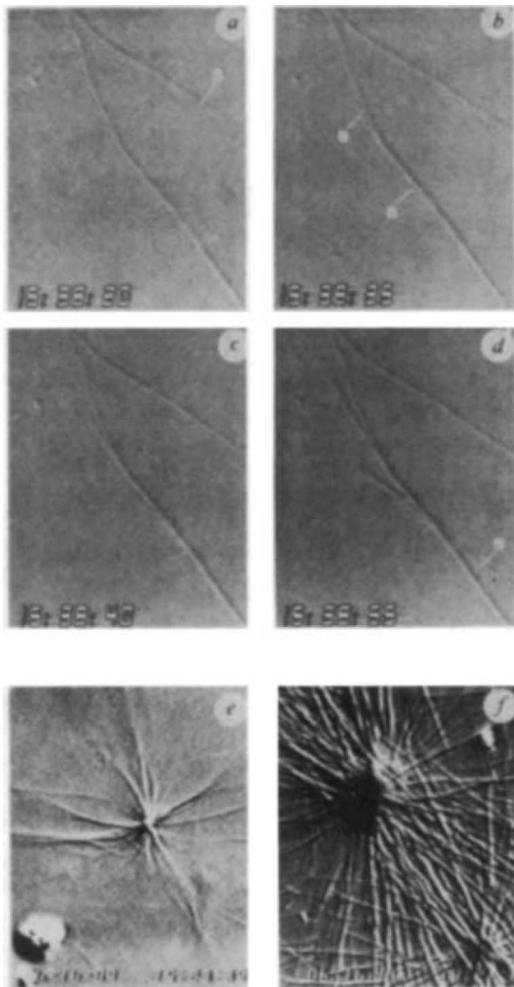
Une analyse fouillée de la littérature nous a montré qu'il s'agit de l'unique description mathématique du processus de polymérisation de HbS. C'est pourquoi nous l'avons utilisé comme point de départ dans ce travail (cf. section IV-5).

La première confirmation expérimentale de l'existence des deux voies de nucléation proposées a été réalisée en 1990 par Samuel et coll. (cf. Figure 16). Ils ont observé en temps réel (vidéo-microscopie en contraste de phase différentiel) la nucléation en solution, la croissance (élongation), et les interactions entre fibres ([Samuel et coll. 1990]; [Briehl 1995]):

Les fibres proviennent à la fois des centres qui produisent de nombreuses fibres radiales et de la surface même des fibres préexistantes, à partir desquelles elles divergent.¹

¹ Citation originelle : *The fibres originate both from centers that produce many radially distributed fibres and on the surface of preexisting fibres, from which they then branch* (extrait de Samuel, R. E., E. D. Salmon and R. W. Briehl (1990). "Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin." *Nature* **345**(6278): 833-5.)

De nombreuses expériences ultérieures confirment, indubitablement, l'existence de deux voies de nucléation pour la polymérisation de HbS, l'une en solution, dite « homogène », l'autre sur des fibres préexistantes, dite « hétérogène » ([Cao and Ferrone 1996; Galkin and Vekilov 2004; Rotter et coll. 2005b; Galkin et coll. 2007a]).



Microphotographies de fibres de HbS en croissance (25 min après le saut de température ; intervalle entre a et f, 35s ; concentration de HbS, 4,45 mM ; T, 21°C, largeur de champ optique, 17 µm pour a-d et 35 µm pour e-f) : (a), les deux fibres croissent à 0,09 µm/s ; (b), apparition de 2 embranchements, qui croissent en c et d ; les branches apparaissent au niveau d'épaississements de la fibre parent ; (d) apparition d'une branche, dans la direction opposée à la première. Autre préparation (e) fibres émanant radialement d'un centre (nucléation homogène) unique ; (f) évolution de e, après 2 min. (figure extraite de Samuel et al., 1990)

Figure 16 : Visualisation de la croissance des fibres polymères de HbS et de la nucléation hétérogène
(Samuel et al., 1990)

Fondamentalement, le modèle de double nucléation ([Ferrone et coll. 1985b; Ferrone et coll. 1985a; Hofrichter 1986]) rend compte des effets majeurs de la concentration, de la température, et des courbes de progression de la polymérisation, à savoir:

- l'existence-même d'un temps de latence et sa dépendance vis-à-vis de la concentration initiale de HbS,
- la nature stochastique de l'apparition de la première fibre polymère, telle qu'elle peut être mise en évidence dans les petits volumes expérimentaux (de l'ordre de quelques centaines de femtolitres, soit l'équivalent de *quelques* volumes érythrocytaires).

La figure 17 schématise le principe du modèle de double nucléation.

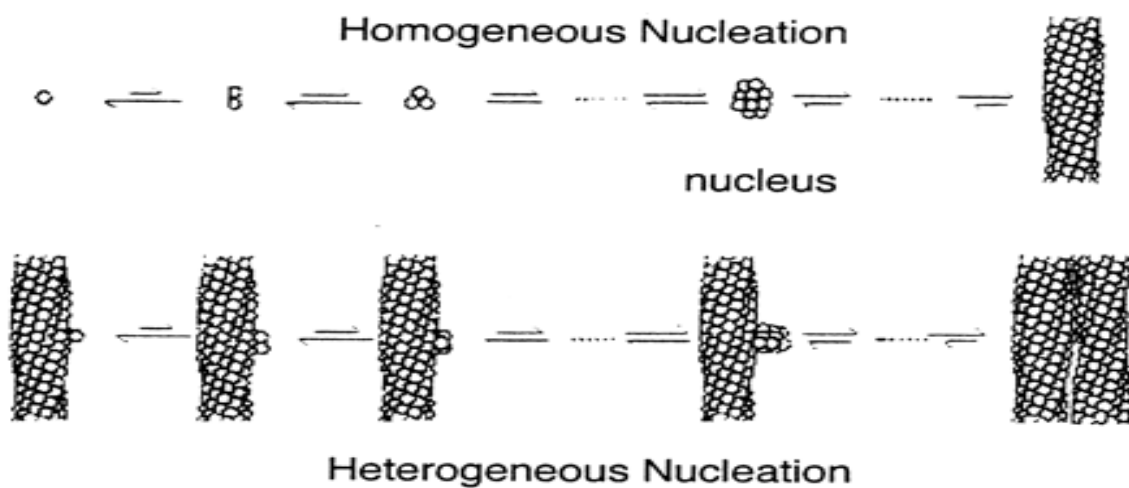


Figure 17 : Schéma du modèle de double nucléation
(Ferrone et al., 1985b)

La nucléation « homogène » : Selon le modèle de double nucléation, le processus de polymérisation de HbS est initié par l'assemblage d'un agrégat métastable de monomères (HbS) en solution (la *nucléation homogène*), suivi de son élongation par additions successives, et non-coopératives, de monomères pour former une fibre (cf. Figure 17, partie supérieure). L'apparition d'un tel agrégat nucléaire est un phénomène stochastique, et il en existe à chaque instant dans la solution de différentes tailles (nombre de monomères de HbS

constituants). Ces agrégats sont appelés « noyaux homogènes » parce qu'ils se forment en milieu « homogène » (en solution) et qu'aucune surface initiale n'est impliquée (comme cela a été démontré expérimentalement par [Galkin and Vekilov 2004]).

Du point de vue thermodynamique, l'existence/apparition du noyau *critique* résulte de la compétition entre deux composantes énergétiques antagonistes. D'une part, l'énergie cinétique, associée aux degrés de liberté des molécules en solution (énergies translationnelles et rotationnelles), et d'autre part l'énergie libre associée à la formation des contacts intermoléculaires du polymère (par exemple, entre la valine mutée d'une HbS et la poche hydrophobe HbS voisine ; voir Chapitre III, section III-3). Lorsque l'agrégat est constitué d'un nombre de monomères d'HbS inférieur à la taille *critique*, le terme entropique lié aux mouvements « libres » des monomères domine, et l'agrégat se dissocie spontanément (ceci est représenté par les flèches allant de droite à gauche, vers les monomères libres, sur le schéma de la figure 15). Lorsqu'un nombre suffisant de contacts intermoléculaires *par monomère* est formé (donc d'énergie libre d'interaction), le terme énergétique associé aux contacts intermoléculaires excède le terme entropique et l'agrégation devient favorable (ceci est représenté par des flèches gauche → droite dominantes, sur la figure 15 ; cf. [Ferrone et coll. 1985b]).

Dans le modèle de double nucléation, les noyaux, homogènes et hétérogènes, sont considérés comme étant à l'équilibre. Cela signifie que le processus de coalescence/dissociation est considéré comme étant « infiniment » rapide par rapport au processus d'addition des monomères –exemple, l'élongation. La dérivation des équations permettant de calculer la concentration « à l'équilibre » de ces noyaux *critiques* fait appel à la thermodynamique statistique. Les équations correspondantes sont présentées dans le chapitre suivant (cf. également [Ferrone et coll. 1985b; Cao and Ferrone 1997; Galkin et coll. 2007a; Galkin et coll. 2007b]). En bref, en deçà d'une taille critique, les noyaux sont instables et se

désagrègent rapidement après leur formation. Quand la taille *critique* est atteinte, la coalescence de chaque monomère additionnel produit un agrégat incrémentalement plus stable. Ceci constitue le processus de développement, « opérationnellement irréversible », d'une fibre polymère. La vitesse de polymérisation par la voie « homogène » est proportionnelle à la concentration des noyaux homogènes et à celle des monomères; il s'agit donc d'une cinétique du second ordre ; [Ferrone et coll. 1985b]).

Il est à noter enfin que des études très récentes montrent que le processus de nucléation homogène se décompose probablement en deux étapes [Galkin et coll. 2007a; Galkin et coll. 2007b] :

- la formation, dans la solution, de « gouttelettes denses » métastables (« dense liquid clusters »), servant de précurseurs à l'étape suivante, à savoir,
- la formation, au sein de ces gouttelettes mésoscopiques, des noyaux homogènes *ordonnés* (approximativement tels que dans le cristal).

Si l'existence des noyaux homogènes permet d'expliquer la dépendance, marquée, de la vitesse de polymérisation vis-à-vis de la concentration, elle ne permet pas d'expliquer l'existence du temps de latence pour l'apparition de la première fibre (ainsi que de toutes les fibres d'origine homogène), ni la forme sigmoïdale des courbes de progression de la polymérisation, c.a.d l'extrême autocatalyse observée du processus. Selon le modèle de double nucléation, ce délai est dû au second type de nucléation, à savoir la « nucléation hétérogène », responsable de la coalescence de monomères *sur* les fibres pré-existantes pour former les noyaux *hétérogènes*. Au fur et à mesure que les fibres polymères de HbS (initialement d'origine « homogène ») s'accumulent et s'allongent, le nombre de monomères de HbS polymérisés, et par voie de conséquence les sites potentiels de nucléation hétérogène, augmente continuellement (voir Figure 17, partie inférieure). Les nouveaux polymères ainsi

formés peuvent être le siège de nouvelles nucléations à leur surface, ce qui confère au processus sa nature auto-catalytique.

L'extraordinaire dépendance du processus de polymérisation de HbS vis-à-vis de la concentration est illustrée par le fait que si celle-ci est *doublée*, de 200 g/l (3,1 mM) à 400 g/l, le temps de latence décroît de $\approx 10^4$ à 10^{-2} s, soit une variation de 6 ordres de grandeur ! Qualitativement, la dépendance du temps de latence vis-à-vis de la concentration est due à la dépendance de la taille du noyau (homogène) vis-à-vis de cette même concentration : lorsque la concentration d'HbS augmente, l'agrégation devient plus probable, la taille du noyau critique diminue, et le temps de latence diminue (la probabilité qu'un noyau homogène se forme -et s'allonge ensuite en fibre, augmente). Réciproquement, lorsque la concentration de HbS diminue, la probabilité de coalescence de monomères en un noyau critique diminue alors que sa taille augmente, et le temps de latence augmente en conséquence. Enfin, le fait que les noyaux soient en *équilibre* avec les monomères explique également la dépendance du temps de latence vis-à-vis de la solubilité (nb : une grandeur à l'*équilibre*; cf. Eaton and Hofrichter, 1987).

Comme pour la voie homogène, la vitesse de la nucléation hétérogène est traitée comme un processus cinétique du second ordre : sa vitesse est proportionnelle à la concentration des noyaux hétérogènes et à celle des monomères libres (cf. [Ferrone et coll. 1985b] ; cf. Chapitre V, pour une présentation détaillée des équations mathématiques constituant le modèle).

Domaines : Dans de nombreuses situations, et en particulier au sein des érythrocytes, il a été observé que les fibres polymères d'HbS adoptent un arrangement particulier, le *domaine*. Il s'agit d'une structure organisée, plus ou moins radiale (cf. figure 16, section précédente ; cf. figure 18), dont la version précoce est le sphérulite ([Eaton and Hofrichter 1990 ; Ferrone 1993 ; Corbett et coll. 1995; Pawliuk et coll. 2001 ; Christoph et coll. 2005]).

La figure 18, représente les principaux types d'arrangements intraérythrocytaires de domaines (extraite de [Corbett et coll. 1995]) : A, cellule SS falciformée « classique » ; B, « constriction cell », présentant un site unique de nucléation ; C, cellule SS sphérolitique, avec un site unique de nucléation ; D, cellule SS à 3 domaines, organisés en AHP « aligned HbS polymers » ; E, cellule SS à multiples domaines AHP.

Au niveau cellulaire, l'existence, le nombre, et la forme, de ces domaines conditionnent significativement la morphologie et la rhéologie des érythrocytes, et ceci joue certainement un rôle-clef dans la survenue et/ou le développement des évènements vaso-obstructifs d'origine « mécanique » (cf. [Mickols et coll. 1985 ; Basak et coll. 1988; Corbett et coll. 1995 ; Briehl 1995; Christoph et coll. 2005]).

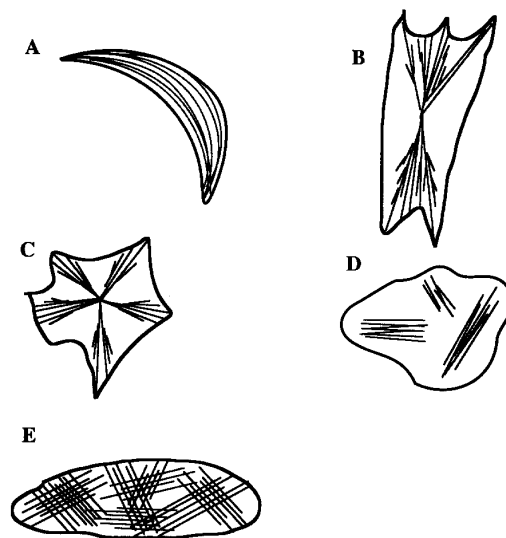


Figure 18 : Principaux arrangements en domaines de polymères d'hémoglobine *in situ* et morphologies érythrocytaires associées
(Corbett et al., 1995)

La densité de tels domaines (par unité de volume) diminue avec l'augmentation du temps de latence. En d'autres termes, plus la polymérisation est lente, moins il se développe de domaines. Ceci a été observé principalement dans les expériences de « *temperature-jump* » (cf. [Christoph et coll. 2005]). Dans les expériences de « *laser photolysis* » (réalisées à faible volume expérimental), un domaine unique est observé dans le volume photolysé (avec un

temps de latence extrêmement variable). Pour les échantillons à polymérisation rapide (temps de latence reproductible), aucun domaine individuel ne peut être observé (Ferrone et al., 1980,1985a ; Hofrichter, 1986). La forte variabilité du temps de latence est liée aux fluctuations stochastiques de l'évènement initial, c.a.d. la nucléation homogène (telle qu'elle peut être détectée dans un petit volume expérimental), et l'*observation* de la variation aléatoire du processus de nucléation homogène est rendue possible par l'amplification considérable engendrée par la nucléation hétérogène. En effet, le nombre de domaines observés est élevé, soit dans les échantillons à polymérisation rapide ($C_0 > 4,5$ mM), soit dans des volumes de mesure plus importants des expériences de « *temperature jump* » : le nombre d'événements « nucléation homogène » est donc élevé² et le temps de latence effectivement mesuré est moyenné et donc reproductible.

IV- 4 APPROCHE CONCEPTUELLE ET OBJECTIF DE L'ETUDE

Ainsi que nous l'avons vu dans les chapitres précédents, la pathologie drépanocytaire est contrôlée et modulée par un grand nombre de facteurs, géniques et non-géniques, agissant et interagissant, depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau de l'organisme (Chap. II). Quelque soit leur nature et leur niveau, les facteurs en question *sont* la source de l'extrême variabilité interindividuelle des profils cliniques et thérapeutiques (voir Tableau 1).

In fine, la *sévérité* clinique dépend de l'ampleur et de la dynamique de la vasoocclusion d'une part (cf. phénotype vasoocclusif, Chap. II, section 5) et de l'hémolyse intravasculaire d'autre part (cf. phénotype hémolytique, *idem*) -ainsi que des proportions respectives de ces deux évènements. Or, plusieurs facteurs impliqués dans la vasoocclusion

² Un domaine donné provient d'un noyau homogène unique (et des multiples noyaux hétérogènes qui se forment ensuite sur la fibre « homogène » correspondante, puis sur les fibres « filles »).

et/ou l'hémolyse peuvent être directement reliés aux polymères de HbS. Parmi ceux-ci, on peut citer :

- les modifications « mécaniques » érythrocytaires (viscosité cytosolique, déformation/tension/déchirement membranaire, réduction de la déformabilité, falciformation),
- l'activation des voies de transport des ions osmotiquement actifs majoritaires (K^+ et Cl^-), participant à la déshydratation,
- la déshydratation des cellules SS et l'augmentation de la fraction de cellules denses,
- les altérations métaboliques et rédox (ex : appauvrissement en glutathion, stress oxydatif dû aux compartiments de fer « membranaire » et intravasculaire, peroxydation lipidique),
- l'« activation » érythrocytaire, avec expression de facteurs et protéines d'adhésion, et l'adhésion à l'endothélium, et/ou aux leucocytes, des cellules SS (réticulocytes et érythrocytes).

Secondairement, d'autres événements peuvent être causés par la polymérisation de HbS (avec ses conséquences érythrocytaires : modifications de morphologie, de densité, d'adhésivité, d'hémolyse,...). Citons :

- la biodisponibilité réduite du NO° (methémoglobine, hémoglobine intravasculaire), et la diminution de la signalisation « vaso-relaxante » érythrocyte-endothélium médiée par l'ATP,
- l'activation endothéliale, leucocytaire, et plaquettaire, avec expression de protéines d'adhésion et formation d'agrégats homo- et hétérotypiques, due à l'augmentation des effets mécaniques ou hémodynamiques vasculaires (ex : shear-stress),
- l'état procoagulateur et proinflammatoire induit par ces effets mécaniques.

Objectif général du travail : Au niveau clinique, la difficulté de choix et d'adaptation du traitement de la drépanocytose résulte de la multiplicité des facteurs impliqués, de leur dynamique propre et de leurs interactions.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre projet *DREPASIM*, dont l'ambition terminale est d'aider à l'amélioration de la prise en charge des patients par une approche de physiopathologie intégrative, complémentaire à l'expérimentation et à la clinique. Globalement, *DREPASIM* vise à mettre en place un modèle mathématique, intégrant les niveaux et les déterminants pertinents de la variabilité drépanocytaire, ainsi que leurs interactions³.

Un tel outil, par définition intégratif et quantitatif, permettra au clinicien :

- (i) de tester des hypothèses et de simuler des scénarios, physio-pathologiques ou thérapeutiques,
- (ii) de prédire la survenue de crises vaso-occlusives, chez un patient donné, en fonction de ses propres paramètres hématologiques et cliniques.

Comme nous l'avons montré, si l'on ne peut réduire la pathologie drépanocytaire aux seules crises vasoocclusives induites par les fibres polymères, la polymérisation de HbS en représente l'un des éléments déclenchants majeurs, sinon le *primum movens*. Ce processus moléculaire doit donc être considéré et décrit en tout premier lieu, avant d'aborder les niveaux supérieurs, cellulaires, vasculaires et cliniques.

Ce travail de thèse constitue la première étape dans la mise en place du modèle global ciblé : le développement d'un modèle mathématique, description dynamique, réaliste et fiable de la polymérisation de HbS telle qu'elle est déterminée expérimentalement *in vitro*.

³ Les partenaires de ce projet sont le Centre de la Drépanocytose (Pr F Galactéros, Créteil), le Département de Physique de l'université Drexel (Pr F Ferrone, Philadelphie), l'Inserm U927 (Dr P Hannaert, Poitiers) ; en 2004, l'Etablissement Français du Sang (Centre-Atlantique) a permis la réalisation d'une phase exploratoire de ce projet.

Objectifs spécifiques : Tous les travaux et validations du modèle de double nucléation ont été réalisés avec une version simplifiée, linéarisée du modèle.

La linéarisation ayant été faite à $[C_0, t_0]$ (concentration initiale, temps initial), le modèle n'est fiable (en tous cas, démontré comme tel) que dans les dix premiers pourcents du processus (« tenth-time », cf. [Ferrone et coll. 1985b]). Une seconde conséquence de la linéarisation à $[C_0, t_0]$ est que le modèle ne tient pas compte de l'évolution (c'est-à-dire la consommation) des monomères libres, la concentration de ceux-ci (C) étant considérée statique (fixée à t_0). Troisième problème lié à cette linéarisation : les polymères formés (pertinemment négligés à $[C_0, t_0]$) sont omis, ainsi que les conséquences physicochimiques de leur présence et de leur évolution dynamique.

C'est pourquoi nos objectifs spécifiques sont :

- l'implémentation, la correction, et la mise à jour, de la version analytique complète, c'est-à-dire non-linéarisée de ce modèle initial de « double nucléation » ([Ferrone et coll. 1985b]),
- l'intégration numérique complète de ce modèle de base, et l'évaluation de ses performances par comparaison aux données expérimentales ; le *corpus* expérimental est constitué de données (i) fournies par le Pr F Ferrone et son groupe (communication personnelle), (ii) issues de [Ferrone et coll. 1985a; Hofrichter 1986], et,
- l'amélioration du modèle analytique complet par la prise en compte simultanée de la présence des monomères de HbS et des polymères formés, de leurs propriétés physicochimiques et de leur évolution dynamique.

IV-5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agarwal, G., J. C. Wang, S. Kwong, S. M. Cohen, F. A. Ferrone, R. Josephs and R. W. Briehl (2002). "Sickle hemoglobin fibers: mechanisms of depolymerization." J Mol Biol 322(2): 395-412.
- Aprelev, A., M. A. Rotter, Z. Etzion, R. M. Bookchin, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2005). "The effects of erythrocyte membranes on the nucleation of sickle hemoglobin." Biophys J 88(4): 2815-22.
- Aprelev, A., W. Weng, M. Zakharov, M. Rotter, D. Yosmanovich, S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2007). "Metastable polymerization of sickle hemoglobin in droplets." J Mol Biol 369(5): 1170-4.
- Basak, S., F. A. Ferrone and J. T. Wang (1988). "Kinetics of domain formation by sickle hemoglobin polymers." Biophys J 54(5): 829-43.
- Behe, M. J. and S. W. Englander (1979). "Mixed gelation theory. Kinetics, equilibrium and gel incorporation in sickle hemoglobin mixtures." J Mol Biol 133(1): 137-60.
- Bishop, M. F. and F. A. Ferrone (1984). "Kinetics of nucleation-controlled polymerization. A perturbation treatment for use with a secondary pathway." Biophys J 46(5): 631-44.
- Briehl, R. W. (1995). "Nucleation, fiber growth and melting, and domain formation and structure in sickle cell hemoglobin gels." J Mol Biol 245(5): 710-23.
- Cao, Z. and F. A. Ferrone (1996). "A 50th order reaction predicted and observed for sickle hemoglobin nucleation." J Mol Biol 256(2): 219-22.
- Cao, Z. and F. A. Ferrone (1997). "Homogeneous nucleation in sickle hemoglobin: stochastic measurements with a parallel method." Biophys J 72(1): 343-52.
- Christoph, G. W., J. Hofrichter and W. A. Eaton (2005). "Understanding the shape of sickled red cells." Biophys J 88(2): 1371-6.
- Coletta, M., J. Hofrichter, F. A. Ferrone and W. A. Eaton (1982). "Kinetics of sickle haemoglobin polymerization in single red cells." Nature 300(5888): 194-7.
- Corbett, J. D., W. E. Mickols and M. F. Maestre (1995). "Effect of hemoglobin concentration on nucleation and polymer formation in sickle red blood cells." J Biol Chem 270(6): 2708-15.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1987). "Hemoglobin S gelation and sickle cell disease." Blood 70(5): 1245-66.

- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1990). "Sickle cell hemoglobin polymerization." Adv Protein Chem 40: 63-279.
- Ferrone, F. A. (1993). "The polymerization of sickle hemoglobin in solutions and cells." Experientia 49(2): 110-7.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985a). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. I. Studies using temperature-jump and laser photolysis techniques." J Mol Biol 183(4): 591-610.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985b). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism." J Mol Biol 183(4): 611-31.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter, H. R. Sunshine and W. A. Eaton (1980). "Kinetic studies on photolysis-induced gelation of sickle cell hemoglobin suggest a new mechanism." Biophys J 32(1): 361-80.
- Ferrone, F. A., M. Ivanova and R. Jasuja (2002). "Heterogeneous nucleation and crowding in sickle hemoglobin: an analytic approach." Biophys J 82(1 Pt 1): 399-406.
- Frenette, P. S. and G. F. Atweh (2007). "Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise." J Clin Invest 117(4): 850-8.
- Galkin, O., R. L. Nagel and P. G. Vekilov (2007a). "The kinetics of nucleation and growth of sickle cell hemoglobin fibers." J Mol Biol 365(2): 425-39.
- Galkin, O., W. Pan, L. Filobelo, R. E. Hirsch, R. L. Nagel and P. G. Vekilov (2007b). "Two-step mechanism of homogeneous nucleation of sickle cell hemoglobin polymers." Biophys J 93(3): 902-13.
- Galkin, O. and P. G. Vekilov (2004). "Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia hemoglobin in deoxy state." J Mol Biol 336(1): 43-59.
- Hofrichter, J. (1986). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. III. Nucleation rates determined from stochastic fluctuations in polymerization progress curves." J Mol Biol 189(3): 553-71.
- Hofrichter, J., P. D. Ross and W. A. Eaton (1974). "Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease." Proc Natl Acad Sci U S A 71(12): 4864-8.
- Hofrichter, J., P. D. Ross and W. A. Eaton (1976). "Supersaturation in sickle cell hemoglobin solutions." Proc Natl Acad Sci U S A 73(9): 3035-9.

- Li, X., R. W. Briehl, R. M. Bookchin, R. Josephs, B. Wei, J. M. Manning and F. A. Ferrone (2002). "Sickle hemoglobin polymer stability probed by triple and quadruple mutant hybrids." J Biol Chem 277(16): 13479-87.
- Madonia, F., P. L. San Biagio, M. U. Palma, G. Schiliro, S. Musumeci and G. Russo (1983). "Photon scattering as a probe of microviscosity and channel size in gels such as sickle haemoglobin." Nature 302(5907): 412-5.
- Malfa, R. and J. Steinhardt (1974). "A temperature-dependent latent-period in the aggregation of sickle-cell deoxyhemoglobin." Biochem Biophys Res Commun 59(3): 887-93.
- Mickols, W., M. F. Maestre, I. Tinoco, Jr. and S. H. Embury (1985). "Visualization of oriented hemoglobin S in individual erythrocytes by differential extinction of polarized light." Proc Natl Acad Sci U S A 82(19): 6527-31.
- Moffat, K. and Q. H. Gibson (1974). "The rates of polymerization and depolymerization of sickle cell hemoglobin." Biochem Biophys Res Commun 61(1): 237-42.
- Morse, P. D., 2nd and J. A. Warth (1990). "Direct measurement of the internal viscosity of sickle erythrocytes as a function of cell density." Biochim Biophys Acta 1053(1): 49-55.
- Mozzarelli, A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1987a). "Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo." Science 237(4814): 500-6.
- Mozzarelli, A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1987b). "The problem of describing gelation in vivo." Prog Clin Biol Res 240: 237-44.
- Nishio, I., T. Tanaka, S. T. Sun, Y. Imanishi and S. T. Ohnishi (1983). "Hemoglobin aggregation in single red blood cells of sickle cell anemia." Science 220(4602): 1173-5.
- Noguchi, C. T. and A. N. Schechter (1985). "Sickle hemoglobin polymerization in solution and in cells." Annu Rev Biophys Biophys Chem 14: 239-63.
- Noguchi, C. T., D. A. Torchia and A. N. Schechter (1980). "Determination of deoxyhemoglobin S polymer in sickle erythrocytes upon deoxygenation." Proc Natl Acad Sci U S A 77(9): 5487-91.
- Paszy, C. (1997). "Transgenic and gene knock-out mouse models of sickle cell anemia and the thalassemias." Curr Opin Hematol 4(2): 88-93.
- Pawliuk, R., K. A. Westerman, M. E. Fabry, E. Payen, R. Tighe, E. E. Bouhassira, S. A. Acharya, J. Ellis, I. M. London, C. J. Eaves, R. K. Humphries, Y. Beuzard, R. L. Nagel and P. Leboulch (2001). "Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy." Science 294(5550): 2368-71.

- Peetermans, J., I. Nishio, S. T. Ohnishi and T. Tanaka (1986). "Light-scattering study of depolymerization kinetics of sickle hemoglobin polymers inside single erythrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 83(2): 352-6.
- Pumphrey, J. G. and J. Steinhardt (1976). "Formation of needle-like aggregates in stirred solutions of hemoglobin S1." Biochem Biophys Res Commun 69(1): 99-105.
- Rao, M. J., A. Malavalli, B. N. Manjula, R. Kumar, M. Prabhakaran, D. P. Sun, N. T. Ho, C. Ho, R. L. Nagel and A. S. Acharya (2000). "Interspecies hybrid HbS: complete neutralization of Val6(beta)-dependent polymerization of human beta-chain by pig alpha-chains." J Mol Biol 300(5): 1389-406.
- Ross, P. D., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1977). "Thermodynamics of gelation of sickle cell deoxyhemoglobin." J Mol Biol 115(2): 111-34.
- Rotter, M., A. Aprelev, K. Adachi and F. A. Ferrone (2005a). "Molecular crowding limits the role of fetal hemoglobin in therapy for sickle cell disease." J Mol Biol 347(5): 1015-23.
- Rotter, M. A., S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2005b). "Heterogeneous nucleation in sickle hemoglobin: experimental validation of a structural mechanism." Biophys J 89(4): 2677-84.
- Samuel, R. E., E. D. Salmon and R. W. Briehl (1990). "Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin." Nature 345(6278): 833-5.
- Sunshine, H. R., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1979). "Gelation of sickle cell hemoglobin in mixtures with normal adult and fetal hemoglobins." J Mol Biol 133(4): 435-67.
- Sunshine, H. R., J. Hofrichter, F. A. Ferrone and W. A. Eaton (1982). "Oxygen binding by sickle cell hemoglobin polymers." J Mol Biol 158(2): 251-73.
- Thiyagarajan, P. and M. E. Johnson (1983). "Saturation transfer electron paramagnetic resonance detection of sickle hemoglobin aggregation during deoxygenation." Biophys J 42(3): 269-74.
- Turner, M. S., G. Agarwal, C. W. Jones, J. C. Wang, S. Kwong, F. A. Ferrone, R. Josephs and R. W. Briehl (2006). "Fiber depolymerization." Biophys J 91(3): 1008-13.
- Wenger, G. D. and S. P. Balcerzak (1984). "Viscometric and spectrophotometric measurements of hemoglobin S polymerization kinetics." Blood 63(4): 897-903.

CHAPITRE V

Matériel et méthodes

V-1. PRESENTATION DU MODELE DE DOUBLE NUCLEATION

V-1-A DESCRIPTION MATHEMATIQUE DU MODELE INITIAL

V-1-B LES EQUATIONS DU MODELE INITIAL

V-2. CORRECTIONS ET MODIFICATIONS DU MODELE

V-3. ENVIRONNEMENT DE MODELISATION ET DE SIMULATION

V-4. ANALYSE DES COURBES DE POLYMERISATION ET COMPARAISON AUX COURBES EXPERIMENTALES

V-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

V-1. PRESENTATION GENERALE DU MODELE DE DOUBLE NUCLEATION

Le modèle de double nucléation est une description à la fois thermodynamique et cinétique du processus de polymérisation de l'hémoglobine drépanocytaire, HbS. Il a été développé par Ferrone et coll. dans le but de reproduire la phase initiale des courbes expérimentales, le temps de latence et sa dépendance vis-à-vis de la concentration (cf. Chap. IV), avec des paramètres thermodynamiques et physicochimiques qui soient vraisemblables. Le modèle de double nucléation prédit correctement la polymérisation de HbS dans une large gamme de conditions expérimentales :

- concentration initiale de HbS 3-6 mM et température 15-35°C ([Ferrone et coll. 1985b; Ferrone et coll. 1985a]),
- en présence de différentes concentrations de HbF ([Rotter et coll. 2005a]),
- pour différents mutants de Hb ([Li et coll. 2002]).

Grâce à ces succès prédictifs, à l'observation directe des processus de nucléation ([Samuel et coll. 1990 ; Galkin and Vekilov 2004; Galkin et coll. 2007]), ainsi qu'à diverses confirmations [Mirchev and Ferrone 1997; Li et coll. 2002; Rotter et coll. 2005b], **le modèle de double nucléation** est largement admis. Rappelons néanmoins ce que nous avons précisé dans le chapitre précédent, à savoir qu'**il n'est *a priori* valide que pour la phase initiale du processus**. En effet, la dynamique d'évolution des différents composants est ignorée¹.

V-1-A DESCRIPTION MATHEMATIQUE DU MODELE INITIAL

Mathématiquement, le modèle de double nucléation est décrit par deux équations différentielles ordinaires (EDO) :

- une équation explicitant la vitesse de formation des polymères,

¹ *Nota bene* : dans ce qui suit (i) HbS est la seule forme d'hémoglobine présente (absence de HbF et d'autres hémoglobines), (ii) HbS est considérée comme totalement désoxygénée, condition optimale pour la polymérisation.

- une équation explicitant la vitesse de disparition des monomères de la phase *solution*.

Ces deux équations sont couplées *via* une contrainte algébrique, sous la forme d'une équation de bilan de matière (conservation des monomères de HbS).

Nous présentons ici les hypothèses et simplifications principales du modèle originel, telles qu'elles sont décrites dans [Ferrone et coll. 1985b].

- **Hypothèse 1** : l'addition d'un monomère au noyau homogène -ou hétérogène- produit un « polymère » (fibre en élongation), et cette réaction est considérée irréversible (cf. éq. V-1).
- **Hypothèse 2** : les polymères sont considérés comme « infiniment grands » par rapport aux noyaux et la disparition des monomères due à la nucléation est négligée comparativement à celle qui résulte de la croissance des polymères (éq. V-3).
- **Hypothèse 3** : les noyaux homogènes et hétérogènes sont considérés en équilibre constant avec les monomères (cf. éq. V-6, et éq. V-7a, V-7b, respectivement).
- **Hypothèse 4** : le noyau hétérogène étant attaché au polymère, il est traité thermodynamiquement comme un cristal (cf. éq. V-7a, b).
- **Hypothèse 5** : le nombre de sites disponibles à la surface du polymère est proportionnel à la concentration des monomères polymérisés (cf. éq. V-12).
- **Hypothèse 6** : le rapport des coefficients d'activité pour l'addition et de la soustraction du monomère au polymère de n'importe quelle taille (« t »), γ_t/γ_{t+1}^* et γ_t/γ_t^* (où \clubsuit désigne le noyau *activé*, c.a.d. le noyau critique, de taille i^* ou j^* , ayant fixé un monomère additionnel) est égal à l'unité, ie. le coefficient d'activité du noyau j^* est égal au coefficient d'activité du complexe activé j^{*+1} (cf. éq. V-1).
- **Hypothèse 7** : dans le noyau homogène, toutes les liaisons intermoléculaires sont équivalentes.

- **Simplification 1** : simplification dans le traitement mathématique en posant $k_- = k_+ \gamma_s C_s$ (induite par l'hypothèse 3) ; ceci permet de calculer la constante d'équilibre pour la formation des noyaux.
- **Simplification 2** : les coefficients d'activité du j^* -mère et du complexe activé j^*+1 -mère ne sont pas inclus dans les équations de vitesses (c.a.d. considérés comme égaux à l'unité ; cf. Hypothèse 6).
- **Simplification 3** : en toute rigueur, il y a plusieurs arrangements de monomères possibles, pour un noyau de taille donnée, ce qui introduirait un terme d'entropie configurationnelle ; dans le modèle néanmoins, un seul arrangement est pris en compte (« the closest packed structure »).
- **Simplification 4** : Seul le volume exclu par les monomères aux autres monomères -et agrégats est-il pris en compte (par exemple, le volume exclu par les polymères est négligé).

V-1-B LES EQUATIONS DU MODELE INITIAL

Nota bene: Les équations du modèle initial sont transcrites ici telles qu'elles sont représentées dans [Ferrone et coll. 1985b]

Symboles et notation utilisés dans les équations :

C_0 : concentration initiale d'HbS

C : concentration de monomères libres

C_{poly} : concentration de monomères polymérisés

γ : coefficient d'activité du monomère

C_S : solubilité

γ_s : coefficient d'activité à la solubilité

C_p : concentration des terminaisons des fibres en élongation

k_+ : constante de vitesse d'addition du monomère aux noyaux ou au polymère.

γ : coefficient d'activité du monomère

K_{i^*} : constante d'équilibre de formation du noyau homogène

γ_{*+1} : coefficient d'activité du complexe activé (noyau et un monomère)

i^* : taille du noyau homogène

j^* : taille du noyau hétérogène

j_{max} : taille du noyau hétérogène au-delà de laquelle l'addition de monomère supplémentaire n'augmente plus l'aire de contact avec la surface du polymère (ie « saturation » gain énergétique)

$\mu_{jc_{max}}$: potentiel chimique du noyau hétérogène critique

$K_{j^*} K_{j^*}^-$: produit de constante d'équilibre de formation du j^* -mère dans la solution et la constante d'équilibre d'attachement du j^* -mère au polymère

ϕ : constante de proportionnalité liée au nombre total de sites de nucléation (par monomère polymérisé)

S : supersaturation

δ_1 et δ_2 : paramètres, géométriques (phénoménologiques), qui décrivent la fraction de liaisons intermoléculaires dans le noyau relativement à un polymère infini

μ_{pc} : potentiel chimique des liaisons intermoléculaires dans le polymère

μ_{cc} : potentiel chimique par unité d'aire de contact entre le noyau hétérogène et la surface du polymère

σ_1 et σ_2 : paramètres, géométriques (phénoménologiques), qui décrivent la dépendance de l'aire de contact entre le noyau hétérogène et la fibre, avec la taille de ce même noyau hétérogène

T : température

R : constante des gaz parfaits (1,988 cal/mole.k)

V : volume spécifique de HbS ($V = 0,79 \text{ cm}^3/\text{g}$; sauf pour le calcul de γ_{i^*+1} , où $V = 0,75 \text{ cm}^3/\text{g}$)

Vitesse de formation des polymères : La vitesse de formation des polymères, C_p est la somme des vitesses de la voie homogène et de la voie hétérogène. Chacune de ces vitesses est égale au produit de la constante cinétique d'addition (k_+) par l'activité du monomère d'une part et l'activité (ou concentration) des noyaux correspondants (l'explication des symboles est reportée plus bas):

$$\frac{dc_p}{dt} = \left(\frac{k_+ K_{i^*}}{\gamma_{i^*+1}} \right) (\gamma c)^{i^*+1} + k_+ K_{j^*} K_{j^*}^- \phi (c_0 - c) (\gamma c)^{j^*+1} \quad (\text{éq. V-1})$$

L'intégration de l'équation #1 (valeur initiale nulle) donne la concentration des fibres (plus précisément, les extrémités de fibres en élongation) en élongation à un instant donné.

Vitesse de disparition des monomères de la phase solution : Cette vitesse est égale à la consommation des monomères libres par l'élongation des fibres (C_p). Il est à noter que le coefficient d'activité des fibres est considéré ici comme égal à l'unité. Selon cette équation le processus s'arrête lorsque γC est égal à $\gamma_s C_s$, c'est-à-dire quand la concentration des monomères libres atteint la solubilité :

$$- \frac{dc}{dt} = k_+ (\gamma c - \gamma_s c_s) c_p \quad (\text{éq. V-2})$$

Conservation de HbS totale :

la concentration du monomère libre en solution (C) est fournie par la loi de conservation de la matière

$$C = C_0 - C_{poly} \quad (\text{éq. V-3})$$

L'intégration de l'équation #3 (valeur initiale de $C = C_0$) fournit C_{poly} , la concentration des monomères polymérisés, c.a.d. la variable mesurée expérimentalement (cf. [Ferrone et coll. 1985b]).

Constante d'équilibre de formation du noyau critique homogène :

$$K_i^* = \exp \left\{ [(4.R.T + \delta_1 \mu_{pc}) \ln [-(4.R.T + \delta_1 \mu_{pc}) / R.T. \ln S] + (4.R.T + \delta_1 \mu_{pc}) (\ln(\gamma_s \cdot c_s / \ln S) - R.T. \ln \rho + \frac{3}{2} R.T. \ln 2 + (\delta_2 - 1) \cdot \mu_{pc} + R.T. \ln(\gamma_s \cdot c_s)] / R.T. \right\} \quad (\text{éq. V-4})$$

Coefficient d'activité du complexe activé (noyau critique + un monomère) :

$$\gamma_{i^*+1} = \exp \left\{ -\ln(1-v.c) + [3.v.c / (1-v.c)] \rho^{-1/3} \cdot (i^*+1)^{1/3} + [3(v.c + \frac{9}{2} (v.c)^2 / (1-v.c)^2)] \rho^{-2/3} \cdot (i^*+1)^{2/3} + [v.c \cdot (1+v.c + (v.c)^2) / (1-v.c)^3] \rho^{-1} \cdot (i^*+1) \right\} \quad (\text{éq. V-5})$$

Taille du noyau homogène : Cette équation donne le nombre de monomères du noyau critique homogène :

$$i^* = -(4.R.T + \delta_1 \mu_{pc}) / R.T. \ln S \quad (\text{éq. V-6})$$

$$B2=8v$$

$$B5=35.30v^4$$

$$B3=15v^2$$

$$B6=47.4 v^5$$

$$B4=24.48v^3$$

$$B7=65.9 v^6$$

Constante de formation du noyau hétérogène : Cette constante d'équilibre est posée, opérationnellement, comme le produit de deux constantes « fictives » :

- la constante d'équilibre de formation du j^* -mère en solution (éq. V-10a), et
- la constante d'équilibre d'attachement du j^* -mère au polymère (éq. V-10b) :

$$K_{j^*} K_{\bar{j}}^* = \exp\{ [-(\sigma_2 \mu_{cc} - \delta_1 \cdot \mu_{pc}) \cdot \ln j^* - j^* R.T. \ln \gamma_c + \sigma_2 \mu_{cc} - (\delta_1 - \delta_2) \cdot \mu_{pc}] / R.T \}$$

$$\text{Pour } j^* < j_{\max} \quad (\text{éq. V-10a})$$

$$K_{j^*} K_{\bar{j}}^* = \exp\{ [(\delta_1 \mu_{pc} + 3.R.T) \cdot \ln j^* - (\delta_1 - \delta_2) \cdot \mu_{pc} - 3.R.T(1 + \ln j_{\max}) - \mu_{jc_{\max}}] / R.T \}$$

$$\text{Pour } j^* > j_{\max} \quad (\text{éq. V-10b})$$

où,

$$\mu_{jc_{\max}} = -\sigma_2 \mu_{cc} [\ln(-\sigma_1/\sigma_2) + 1] \quad (\text{éq. V-10c})$$

Concentration des noyaux homogènes : Calcul, à l'équilibre, de la concentration des noyaux critiques homogènes, c'est-à-dire de taille i^* :

$$C_{i^*} = \left(\frac{K_{i^*}}{\gamma_{i^*}} \right) (\gamma \cdot c)^{i^*} \quad (\text{éq. V-11})$$

Concentration des noyaux hétérogènes : Calcul, à l'équilibre, de la concentration des noyaux critiques hétérogènes, c'est-à-dire de taille j^* :

$$C_{j^*} = k_+ \cdot K_{j^*} K_{j^*}^- \cdot \phi \cdot (c_0 - c) (\gamma \cdot c)^{j^*} \quad (\text{éq. V-12})$$

En résumé, les variables d'état du modèle sont donc :

- C (concentration des monomères de HbS libres, en solution),
- C_p (concentration des terminaisons des fibres polymères),
- C_{poly} (concentration des monomères polymérisés, c.a.d. inclus dans des polymères).

Il faut noter toutefois que ce qui apparaît comme des paramètres dans les équations principales (éq. 1-3), (par exemple, les coefficients d'activité « γ », les constantes d'équilibre, telles que K_{i^*} , ou encore la taille des noyaux critiques, i^* et j^*) sont en fait des fonctions des variables d'états du système (essentiellement C). De plus, ces fonctions sont hautement non-linéaires, souvent exponentielles, avec des exposants variables, qui couvrent plusieurs ordres de grandeur (par exemple, j^* varie de moins de 1 à 250-300). Ce sont précisément ces caractéristiques, qui tout en permettant une bonne description du phénomène de polymérisation de HbS tel qu'il apparaît expérimentalement, rendent le modèle « numériquement sensible », aux variables d'état (telles que la concentration), aux variables externes, telles que la température, et aux paramètres (cf. Tableau 2). Une analyse de sensibilité est présentée dans la première partie des résultats.

V-1-C LES PARAMETRES DU MODELE INITIAL

Le tableau 2 (ci-dessous) résume les valeurs des cinq paramètres clef, résultant d'une optimisation simultanée, et utilisés dans la version initiale de leur modèle (approximation linéaire) de double nucléation, à 25°C et à 35°C (cf. « Table 2 » dans [Ferrone et coll. 1985b]).

Tableau 2

Paramètres cinétiques et thermodynamiques du modèle de double nucléation initial (Ferrone et coll., 1985b)

	25°C	35°C
μ_{pc} (kcal/mol)	-8,61 ± 0,15	-8,96 ± 0,15
$\text{Log } k_+$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	+3,31 ± 0,23	+3,54 ± 0,12
$\text{Log } \Phi$ (--)	-3,78 ± 0,56	-3,28 ± 0,35
$\sigma_1 \cdot \mu_{cc}$ (kcal/mol)	+0,70 ± 0,10	+0,79 ± 0,08
$\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$ (kcal/mol)	-9,69 ± 0,55	-10,45 ± 0,37

NB : $\delta_1 = 1,29 \pm 0,04$; $\delta_2 = 0,84 \pm 0,06$ ([Ferrone et coll. 1985b]).

V-2. CORRECTIONS ET MODIFICATIONS DU MODELE

Lors des premières tentatives d'implémentation du modèle initial de [Ferrone et coll. 1985b], nous nous sommes heurtés à de nombreuses erreurs typographiques (ex : signes, unités,...), ainsi qu'à diverses erreurs « analytiques » dans les équations (en particulier dans les expressions des constantes d'équilibres des noyaux homogènes et hétérogènes). Certaines de ces erreurs ont pu être identifiées et corrigées rapidement, tandis que d'autres nous ont menés à établir un contact et à maintenir des échanges électroniques avec le Pr F. Ferrone.

Les équations (modifiées par rapport à l'article de 1985) implémentées *in fine* sont présentées ci-après.

Constante d'équilibre de formation du noyau homogène : L'équation initiale (éq. 4, cf. *supra*) a été modifiée comme suit (Ferrone, communication personnelle)

$$\ln K_{i^*} = \xi \ln \ln S - \frac{\xi}{\ln S} \ln \gamma_c + \xi \cdot (1 - \ln \xi) + \ln \gamma_s \cdot C_s + \ln \frac{\sqrt{8}}{\rho} + (\delta_2 - 1) \frac{\mu_{pc}}{R.T}$$

(éq. V-4.1)

où, $\xi = - \frac{4 \cdot R.T + \delta_1 \cdot \mu_{pc}}{R.T}$

Thermodynamiquement, l'expression de la « constante » de formation des noyaux homogènes (K_{i^*}) dérive de l'expression de la concentration de ceux-ci en posant l'hypothèse d'équilibre (c'est-à-dire d'égalité des potentiels chimiques des monomères libres et des noyaux ; voir par exemple *Annexe 3* dans [Ferrone et coll. 1985b]. L'équation 4.1, ci-dessus a été utilisée en lieu et place de l'équation n° 4 (erronément dérivée).

Concentration des noyaux hétérogènes et vitesse de formation des polymères :

$$\ln C_{j^*} = \ln(\phi \cdot (C_0 - C)) + \xi_1 \cdot (1 - \ln \xi_1) + \delta_2 \cdot \frac{\mu_{pc}}{R.T} + \xi_1 \cdot \ln(\ln S + \xi_2)$$

$$j < j_{\max}$$

(éq. V-12.1a)

$$\ln C_{j^*} = \ln(\phi \cdot (C_0 - C)) + j^* \cdot \ln S + \frac{(\delta_1 \cdot \mu_{pc} + 3 \cdot R.T)}{R.T} \cdot \ln j^* + \frac{\delta_2 \cdot \mu_{pc}}{R.T} - \frac{\mu_{jC \max}}{R.T} - 3 \ln j_{\max}$$

$$j > j_{\max}$$

(éq. V-12.1b)

où,

$$\xi_1 = \frac{\sigma_2 \mu_{cc} - \delta_1 \cdot \mu_{pc}}{R.T}$$

$$\xi_2 = \frac{\sigma_1 \mu_{cc}}{R.T}$$

Le terme cinétique de polymérisation hétérogène, tel qu'il est présenté dans la publication initiale, est posé comme dépendant d'une constante fictive d'équilibre ($K_j K_j^*$). Cette constante représente la formation d'un noyau hétérogène de taille « j^* » dans la solution, et l'addition de ce dernier au polymère. Avec les équations V-12.1a-b, utilisées dans nos simulations, la vitesse hétérogène est posée comme égale au produit :

[constante cinétique (bimoléculaire, k_+)] x [concentration des noyaux hétérogènes] x [concentration des monomères libres].

En conséquence, l'équation 1 prend la forme suivante :

$$\frac{dc_p}{dt} = \left(\frac{k_+ \cdot K_{i^*}}{\gamma_{i^*+1}} \right) (\gamma \cdot c)^{i^*+1} + k_+ \cdot C_{j^*} \cdot (\gamma \cdot c)$$

(*éq. V-1.1*)

Toutes les autres modifications, ajustements, et améliorations, apportés au modèle initial afin d'étendre sa validité et son domaine d'utilisation, font l'objet de ce travail de thèse. Ils seront présentés de manière explicite dans le chapitre *Résultats*.

Discontinuité numérique de la taille des noyaux hétérogènes, j^* : L'équation exprimant la taille critique du noyau hétérogène, j^* , est une fonction par partie (cf. éq V-7a et 7b). Le changement d'équation a lieu lorsque j^* atteint une valeur seuil, j_{max} (éq. V-7c) pour laquelle l'accrétion de monomères additionnels n'augmente plus la surface de contact (donc l'énergie de stabilisation du noyau hétérogène). Numériquement, ceci correspond à une discontinuité dans l'évolution de j^* avec C (j^* calculé par l'équation V-7a n'étant pas égal à j^* calculé par l'équation V-7b). Ceci se traduit par contre-coup en une discontinuité de la concentration des noyaux hétérogènes (cf. éq. V-12.1a et V-12.1b, ci-dessus), et donc de la vitesse hétérogène (éq. V-1.1, second terme du membre de droite). Cette discontinuité se produit aux alentours de $C = 4$ mM (voir figure 24b, dans le chapitre *Résultats*).

Pour résoudre cette discontinuité de j^* et de vitesse hétérogène, nous avons procédé comme suit. Définissant j^*_1 comme la taille du noyau hétérogène calculé par l'équation 7a ($j^* < j_{max}$), et j^*_2 comme la taille du noyau hétérogène calculé par l'équation 7b ($j^* \geq j_{max}$), nous posons l'égalité de ces deux quantités:

$$j^*_1 \Leftrightarrow j^* > j_{max} \quad j^*_1 = -\frac{[\sigma_2 \mu_{cc} - \delta_1 \cdot \mu_{pc}]}{[\sigma_1 \mu_{cc} - R.T. \ln S]}$$

$$j^*_2 \Leftrightarrow j^* < j_{max} \quad j^*_2 = -\frac{[\delta_1 \cdot \mu_{pc} + 3.R.T]}{R.T. \ln S}$$

$$\frac{[\sigma_2 \mu_{cc} - \delta_1 \cdot \mu_{pc}]}{[\sigma_1 \mu_{cc} - R.T. \ln S]} = \frac{[\delta_1 \cdot \mu_{pc} + 3.R.T]}{R.T. \ln S}$$

La résolution de cette équation pour $\ln(S)$ donne $\ln S^\circ$:

$$\ln S^\circ = \frac{(\delta_1 \cdot \mu_{pc} + 3.R.T)\sigma_1 \mu_{cc}}{R.T.(\sigma_2 \mu_{cc} + 3.R.T)}$$

(éq. V-13)

Au lieu d'effectuer la transition à $j^* = j_{max}$, celle-ci est réalisée au moment de la simulation où $\ln S = \ln S^\circ$. Nous avons vérifié que la valeur de j^* correspondante, $j^{*\circ}$, est « proche » de j_{max} : en effet, à ≈ 6 mM par exemple (soit $C_0 = 0,373$ g/ml), $j^{*\circ} = 11,5$, tandis que $j_{max} = 13,8$. La figure 19 est une copie d'écran du bloc Simulink© où cette opération est réalisée (bloc « C. Concentration des noyaux hétérogènes » ; nb : voir figure 20 pour une copie d'écran complète de l'environnement de travail, avec l'explorateur de modèle, invisible sur la fig. 19).

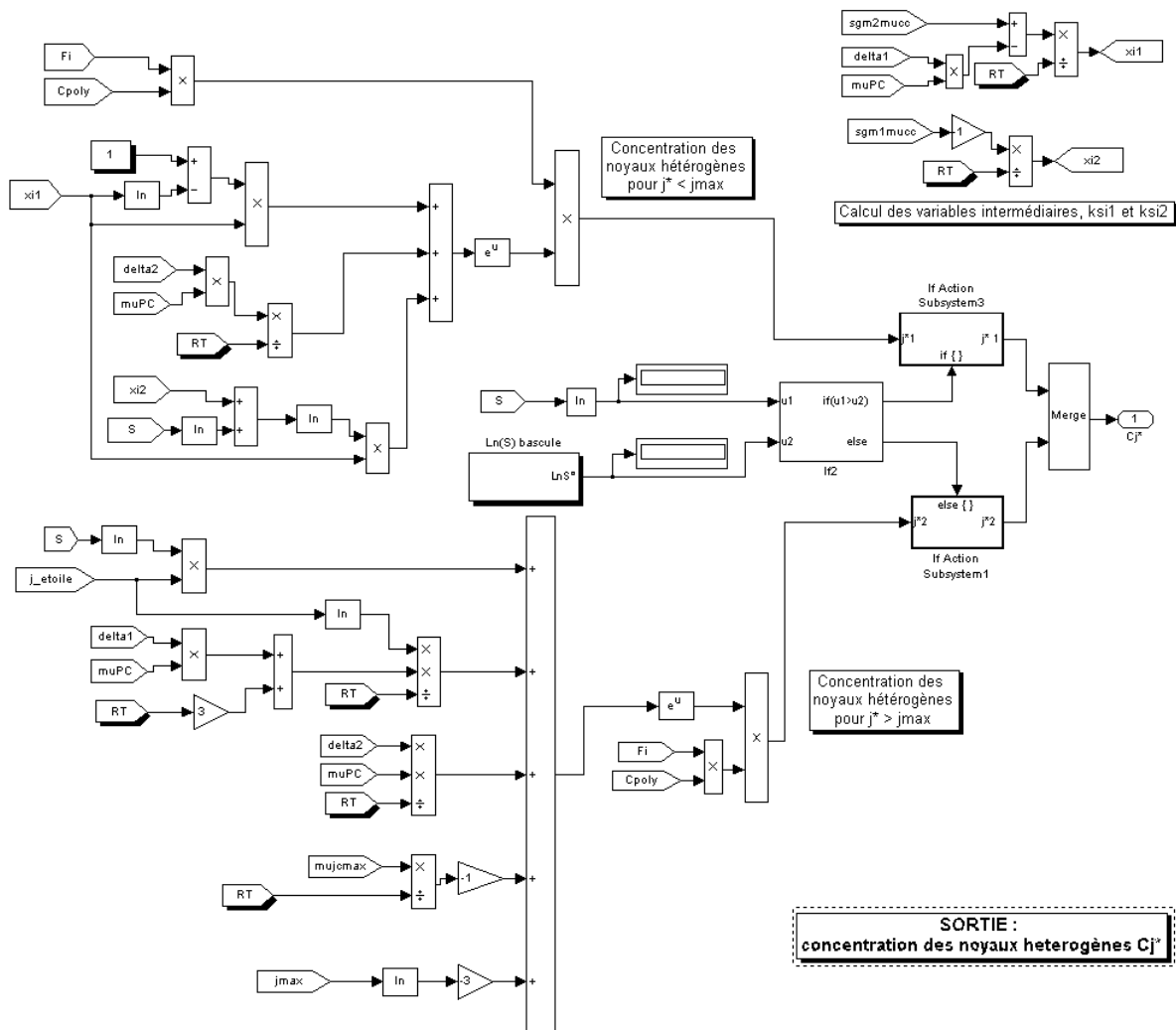


Figure 19 :
Le bloc Simulink© de calcul de la concentration des noyaux hétérogènes, exploitant la bascule en $\ln S^\circ$

V-3. ENVIRONNEMENT DE MODELISATION ET DE SIMULATION

Simulink© (v7.0/R2007b), sous Matlab© (R2007b ; The MathWorks S.A.S, Sèvres, France) a été choisi pour implémenter le modèle et pour effectuer les simulations. Simulink© est un outil versé dans le domaine de la simulation numérique. Il est largement utilisé et éprouvé dans l'industrie aéronautique, automobile et électronique. Il s'agit en fait d'un langage et d'une interface graphique dédié à l'implémentation, la simulation, et l'analyse de systèmes dynamiques (continus ou discrets). Il est donc particulièrement adapté à l'étude de la dynamique de la polymérisation de HbS.

D'autre part, Simulink© permet l'implémentation des équations sous forme modulaire. Les modules sont des éléments de bibliothèque (blocs « élémentaires », emboîtables et réutilisables), prédéfinis et fournis, ou construits par l'utilisateur en fonction de ses besoins. Enfin, Simulink© est complètement compatible avec Matlab© puisqu'il en est une interface. Ceci signifie que toute les fonctions et fonctionnalités de Matlab© sont accessibles depuis Simulink© -y compris des fonctions personnalisées développées sous Matlab©. Les résultats obtenus sous Simulink© peuvent être transférés et exploités dans un tableur, que dans l'espace de travail Matlab©.

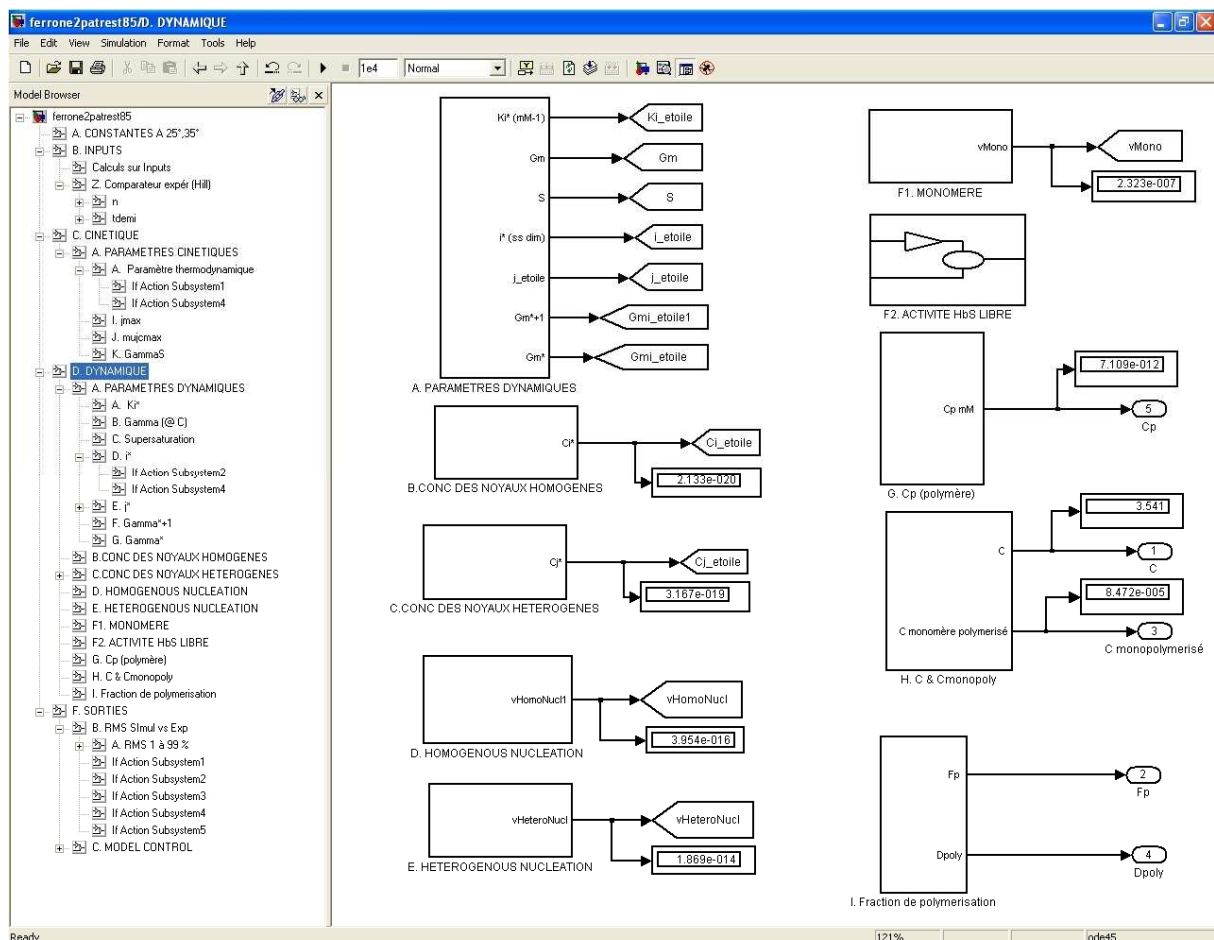
La figure 20 présente une copie d'écran de l'environnement de travail de Simulink©. Dans la partie gauche se trouvent un « navigateur » de modèle et la hiérarchie de celui-ci; à droite est affiché le contenu du bloc sélectionné dans le navigateur (ici le bloc « Sorties »).

Les paramètres de simulation utilisés dans Simulink : Les réglages suivants ont été utilisés pour les simulations numériques :

- Solveur (algorithme d'intégration numérique) : *ODE45 (Dormand-Prince)*
- Pas variable

- Taille maximale du pas d'intégration est : de 10^{-3} s (à 6 mM) à 10^2 s (à 3 mM), à 25°C
- Tolérance relative (« relative tolerance ») : 10^{-3}
- Taille minimale de pas (« min step size »), taille du pas initial (« initial step size »), et tolérance absolue (« absolute tolerance ») : *AUTO*.

Typiquement, ces réglages conduisent à 50-300 pas de calculs.



Simulink© et Matlab© sont installés sur un micro-ordinateur AMD/Athlon (2,17 GHz, 1 Go RAM), avec Windows XP Professionel (version 2002, SP2). En règle générale, une simulation complète (de la concentration initiale jusqu'à la solubilité; sans domaines individualisés) est effectuée en 2–10 s.

Figure 20 :
Copie d'écran de l'environnement de travail de Simulink© (le contenu du bloc « Dynamique », sélectionné à gauche, est affiché dans la partie droite)

V-4. ANALYSE DES COURBES DE POLYMERISATION ET COMPARAISON AUX COURBES EXPERIMENTALES

Corpus de données expérimentales : Elles proviennent principalement de [Ferrone et coll. 1985a], pour la température « 25 °C » (24,4-26,1 °C), dans une gamme de concentration initiale de HbS variant de 0,218 g/ml (3,38 mM) à 0,373 g/ml (5,79 mM). Les données à « 37°C » (32,4 – 40, 7 °C) sont des données non publiées de Ferrone et coll. (F Ferrone, communication personnelle): elles correspondent à six concentrations initiales différentes, de 0,269 g/ml (4,17 mM) à 0,393 g/cm³ (6,10 mM). Ont également été exploitées les données extraites des articles expérimentaux suivants : [Hofrichter et coll. 1974; Hofrichter et coll. 1976; Ross et coll. 1977; Ross and Minton 1977; Ross et coll. 1978; Hofrichter 1986; Eaton and Hofrichter 1990; Cao and Ferrone 1997; Ivanova et coll. 2000; Ferrone et coll. 2002; Galkin and Vekilov 2004; Rotter et coll. 2005a; Rotter et coll. 2005b].

Normalisation des données de polymérisation : Afin de pouvoir les comparer, les données de polymérisation expérimentales et simulées (C_{poly} en fonction du temps) ont été normalisées. Les valeurs simulées ont été normalisées à $(C_0 - C_s)$, c'est-à-dire la concentration théorique maximale de HbS disponible pour la polymérisation. Les données C_{poly} expérimentales ont été normalisées à la valeur maximale du signal

Comparaison des données simulées et expérimentales : Pour évaluer les performances du modèle et comparer ses sorties numériques aux données expérimentales, nous avons utilisé trois critères quantitatifs principaux. Pour quantifier rapidement ces critères, nous avons implémenté leur calcul directement dans le modèle Simulink© (NB : pour tous les calculs, de 9 à 18 points échantillonnés ont été utilisés). Ces trois critères sont les suivants.

1-Le temps de latence. Etant donné son importance expérimentale et sa pertinence pour le processus de polymérisation de HbS, le temps de latence (t_d) est absolument crucial dans la description de ce processus (cf. Chap. IV). Nous avons donc systématiquement déterminé la valeur de ce critère, exprimé en secondes. La procédure mise en place, utilisée pour les données expérimentales et simulées, est la suivante :

- (i) déterminations de la pente maximale de la courbe $C_{poly} = f(t)$ et du point de temps correspondant (point d'inflexion, où la dérivée seconde s'annule),
- (ii) détermination de la pente à ce point (ie. équation de la tangente au point d'inflexion),
- (iii) t_d est calculé comme l'intersection de cette tangente maximale avec l'axe du temps.

Nous avons vérifié que pour les données expérimentales, la valeur de t_d obtenue par cette procédure est similaire, à 30 % près, au « tenth-time », c'est-à-dire le temps requis pour que 10 % du processus de polymérisation soient atteints, comme cela est attendu (cf. [Eaton and Hofrichter 1990]). Sauf indication contraire, nous présenterons le plus souvent le rapport du t_d simulé au t_d expérimental de comparaison.

Les figures 21a et 21b sont des copies d'écran des blocs Simulink© du modèle réalisant cette opération. Des annotations textuelles permettent de suivre le déroulement des calculs au sein de ces blocs). La figure 21a (« $C_{poly_normalisation}$ » dans la hiérarchie du modèle, section gauche) correspond à la détermination des deux points « autour » du point d'inflexion de la courbe $C_{poly}=f(t)$. Les coordonnées de ces deux points sont utilisées dans le bloc supérieur « *Delay-time* » (cf. copie d'écran, figure 21b), pour calculer les paramètres des tangentes (A et

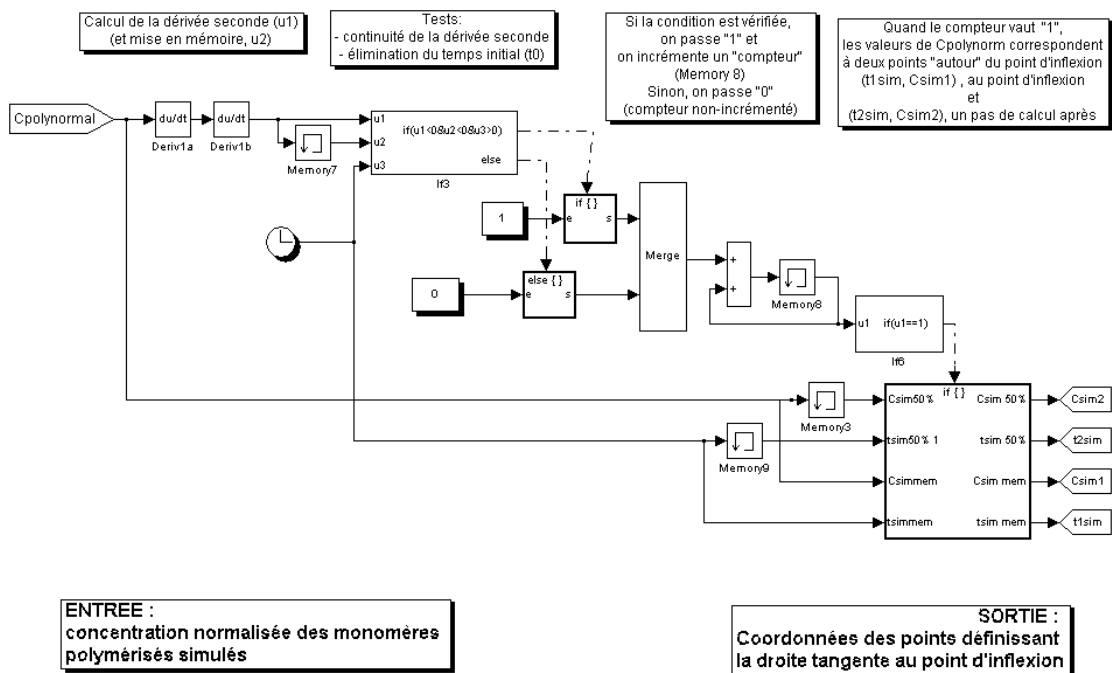


Figure 21a :
Calcul du temps de latence : copie du sous-bloc « Cpoly simulé »

B, pente et ordonnée à l'origine), puis les temps de latence (abscisses à l'origine), et enfin le rapport « simulation/expérience », td_ratio .

2-Déviation moyenne entre *simulation* et *expérience*. L'écart entre les courbes *Cpoly*, normalisées, simulées *versus* expérimentales est quantifié par la moyenne des écarts élevés au carré ("root mean square deviation", ou déviation *rms*). La déviation *rms* est calculée entre 1 et 10% de la réaction, pour les analyses de la phase initiale du processus, et entre 1 et 99% de la réaction pour le processus complet. Ces limites permettent de réduire les contributions artéfactuelles au calcul, des parties initiale (signal ≈ 0) et finale (signal ≈ 1), qui minimisent et maximisent celui-ci, respectivement.

Ces calculs sont également effectués directement au sein du modèle. La figure 22 est une copie d'écran du bloc qui effectue ce calcul (bloc « A. RMS 1 à 99% »).

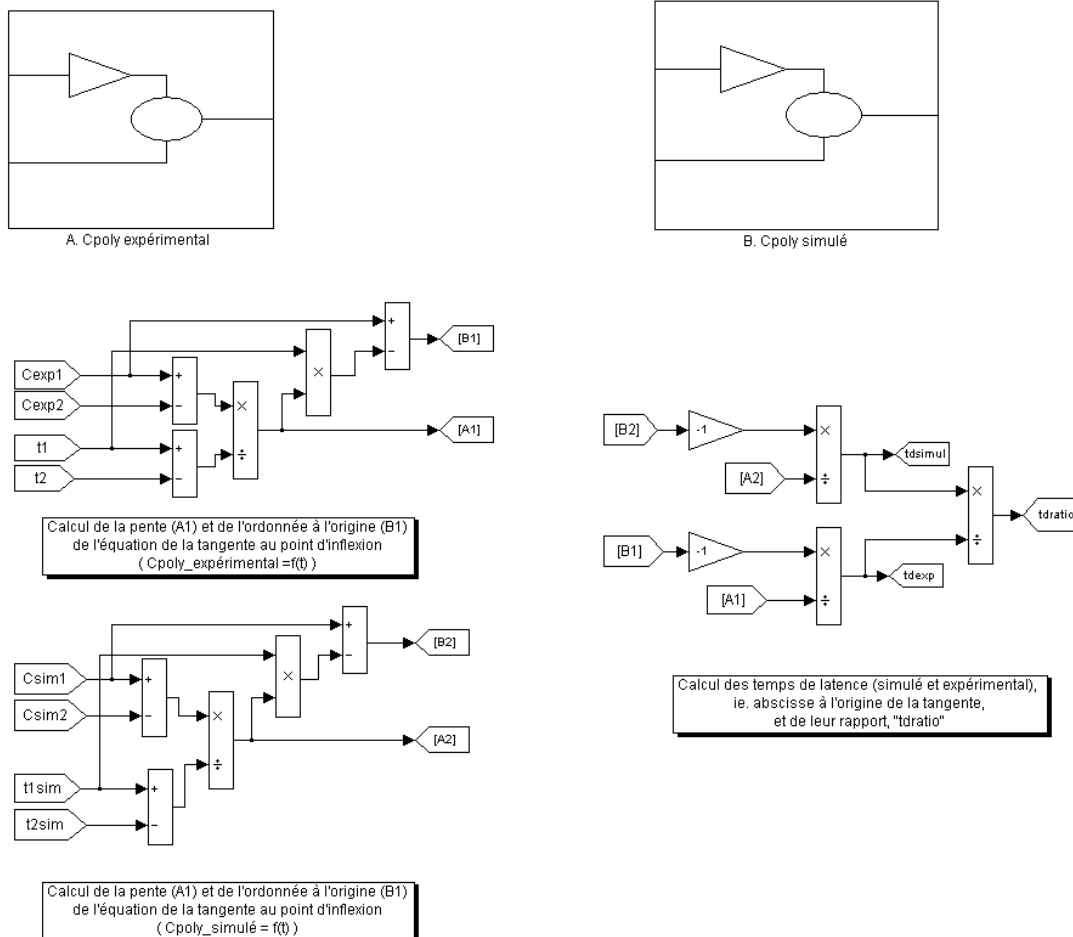


Figure 21b :
Calcul du temps de latence : copie du bloc « Delay-time »

3-Forme des courbes : degré de sigmoïdité. Les courbes complètes de polymérisation sont sigmoïdes, caractéristique des systèmes autocatalytiques. L'équation phénoménologique de Hill² appliquée à notre cas peut être écrite sous la forme :

² En 1910, Hill proposa une équation empirique, l'équation dite « de Hill », pour décrire la liaison coopérative de l'oxygène à l'hémoglobine (cf. <http://en.wikipedia.org/>).

$$C_{poly_normalisé} = 1 / [1 + (K_t/t)^{n_H}] \quad (\text{éq. V-14})$$

où, t représente le temps écoulé depuis l'initiation de processus ; K_t représente la « sensibilité » du processus à la variable t ; et n_H l'indice de coopérativité du processus.

Le paramètre n_H permet de quantifier la coopérativité du processus, c.a.d. le degré de sigmoïdité de sa courbe représentative. Nous avons donc utilisé la valeur de n_H pour comparer quantitativement la forme des courbes de polymérisation. Sa valeur peut être calculée comme la pente de la droite de régression reliant la quantité $\log[C_{poly} / (1 - C_{poly})]$ à $\log(t)$ (une forme linéarisée de l'équation initiale).

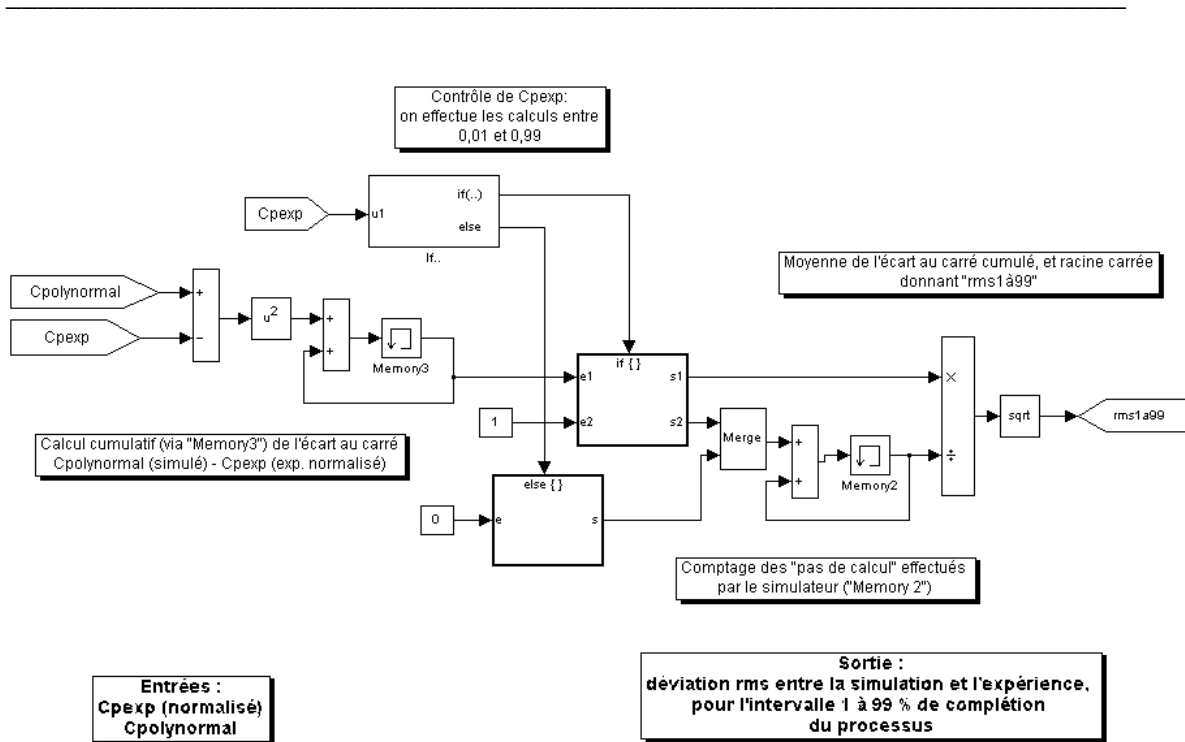


Figure 22 :
Calcul de la déviation rms entre simulation et expérience :
copie du bloc « A. RMS 1 à 99% »

Pour chaque courbe étudiée, 8-12 points, également répartis de part et d'autre du point d'inflexion (point de temps où $Cpoly_normalisé = 0,5$) ont été utilisés pour déterminer la droite de régression, et nH. Tous les coefficients de détermination sont supérieurs à 0,93.

La figure 23a montre le bloc de calcul des coordonnées du point d'inflexion (Cpoly simulé) ; le bloc supérieur calcule les indices de sigmoïdité (non représenté).

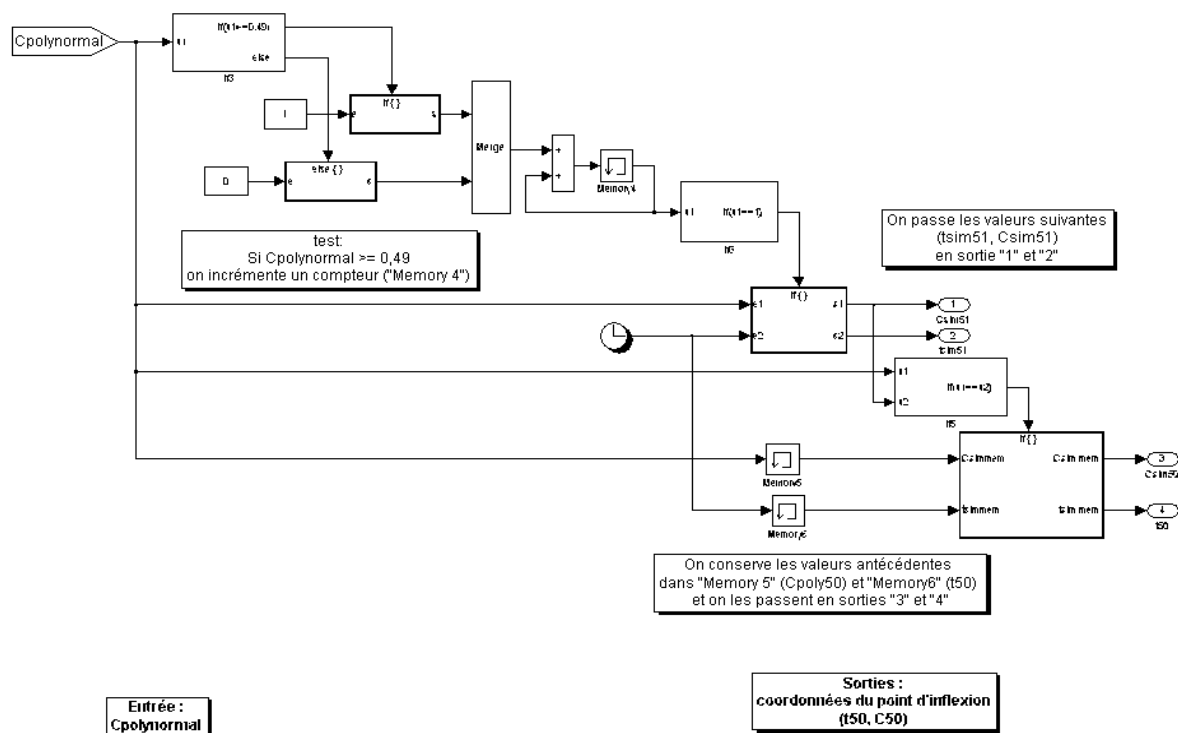


Figure 23 :
Implémentation dans Simunlik© du calcul de l'indice de sigmoïdité :
bloc « Cpoly simulé »

Analyse statistique. Sauf indication contraire, les résultats statistiques sont présentés comme moyenne \pm erreur standard ; l'erreur standard, notée *sem*, est égale à l'écart-type divisé par la racine carrée de la taille de l'échantillon (nombre de cas). Les comparaisons statistiques sont réalisées selon le test *t* de Student (unitatéral, pairé) ; les différences sont considérées comme significatives au seuil de $p = 0,05$.

V-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cao, Z. and F. A. Ferrone (1997). "Homogeneous nucleation in sickle hemoglobin: stochastic measurements with a parallel method." Biophys J 72(1): 343-52.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1990). "Sickle cell hemoglobin polymerization." Adv Protein Chem 40: 63-279.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985a). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. I. Studies using temperature-jump and laser photolysis techniques." J Mol Biol 183(4): 591-610.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985b). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism." J Mol Biol 183(4): 611-31.
- Ferrone, F. A., M. Ivanova and R. Jasuja (2002). "Heterogeneous nucleation and crowding in sickle hemoglobin: an analytic approach." Biophys J 82(1 Pt 1): 399-406.
- Galkin, O., R. L. Nagel and P. G. Vekilov (2007). "The kinetics of nucleation and growth of sickle cell hemoglobin fibers." J Mol Biol 365(2): 425-39.
- Galkin, O. and P. G. Vekilov (2004). "Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia hemoglobin in deoxy state." J Mol Biol 336(1): 43-59.
- Hofrichter, J. (1986). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. III. Nucleation rates determined from stochastic fluctuations in polymerization progress curves." J Mol Biol 189(3): 553-71.
- Hofrichter, J., P. D. Ross and W. A. Eaton (1974). "Kinetics and mechanism of deoxyhemoglobin S gelation: a new approach to understanding sickle cell disease." Proc Natl Acad Sci U S A 71(12): 4864-8.
- Hofrichter, J., P. D. Ross and W. A. Eaton (1976). "Supersaturation in sickle cell hemoglobin solutions." Proc Natl Acad Sci U S A 73(9): 3035-9.
- Ivanova, M., R. Jasuja, S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2000). "Nonideality and the nucleation of sickle hemoglobin." Biophys J 79(2): 1016-22.
- Li, X., R. W. Briehl, R. M. Bookchin, R. Josephs, B. Wei, J. M. Manning and F. A. Ferrone (2002). "Sickle hemoglobin polymer stability probed by triple and quadruple mutant hybrids." J Biol Chem 277(16): 13479-87.
- Mirchev, R. and F. A. Ferrone (1997). "The structural link between polymerization and sickle cell disease." J Mol Biol 265(5): 475-9.

- Ross, P. D., R. W. Briehl and A. P. Minton (1978). "Temperature dependence of nonideality in concentrated solutions of hemoglobin." Biopolymers 17(9): 2285-8.
- Ross, P. D., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1977). "Thermodynamics of gelation of sickle cell deoxyhemoglobin." J Mol Biol 115(2): 111-34.
- Ross, P. D. and A. P. Minton (1977). "Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions." J Mol Biol 112(3): 437-52.
- Rotter, M., A. Aprelev, K. Adachi and F. A. Ferrone (2005a). "Molecular crowding limits the role of fetal hemoglobin in therapy for sickle cell disease." J Mol Biol 347(5): 1015-23.
- Rotter, M. A., S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2005b). "Heterogeneous nucleation in sickle hemoglobin: experimental validation of a structural mechanism." Biophys J 89(4): 2677-84.
- Samuel, R. E., E. D. Salmon and R. W. Briehl (1990). "Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin." Nature 345(6278): 833-5.

CHAPITRE VI

Résultats

VI-1. LE MODELE DE BASE

VI-1-A. CARACTERISTIQUES PRINCIPALES ET DYNAMIQUE

VI-1-B. EVALUATION QUANTITATIVE

VI-1-C. SENSIBILITE AUX PARAMETRES

VI-2. EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE LA NON-IDEALITÉ

VI-2-A. EFFETS DE LA TEMPERATURE ET VITESSE HOMOGENE

VI-2-B. NON-IDEALITE ET VITESSE HETEROGENE

VI-2-C EVALUATION QUANTITATIVE DU MODELE II

VI-3. AMELIORATION DE LA DESCRIPTION DE LA NON-IDEALITÉ

VI-3-A. THEORIE ET APPLICATION

VI-3-B. EVALUATION DU MODELE III « NON-IDEAL, CPT »

VI-3-C. PARAMETRES DU MODELE

VI-3-D. EVALUATION DE LA VERSION LINEAIRE

VI-3-D. EVALUATION DE LA VERSION LINEAIRE

VI-4. LE MODELE « DOMAINES »

VI-4-A. DEMARCHE

VI-4-B. LE MODELE « DOMAINES »

VI-4-C. EVALUATION DU MODELE « DOMAINES »

VI-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Introduction : Avant de présenter les travaux originaux que nous avons réalisés, il apparaît nécessaire de situer notre démarche en regard de difficultés rencontrées, tout particulièrement dans les premières phases du projet. A titre d'exemple, les inévitables erreurs typographiques qui ponctuent la plupart des publications de modèles mathématiques, et les quelques erreurs « algébriques ou physiques » dans certaines équations, n'ont pas suscité d'*erratum*. Quelle que soit leur nature et leur origine, la plupart de ces erreurs entraînaient des dysfonctions, des réponses aberrantes, et/ou des invraisemblances des sorties numériques du modèle. Les plus importantes de ces corrections sont détaillées dans le chapitre V (*Matériel et Méthodes*, section V-2).

En outre, depuis sa publication initiale en 1985, le modèle de double nucléation a été continuellement modifié par F. Ferrone et collaborateurs (cf. Chap. IV et V). Pour autant, ces modifications sont restées exploitées uniquement dans le cadre de la partie initiale de la réaction (10 %), avec la version linéarisée. Par ailleurs, elles n'ont pas non plus été rassemblées en une version contractualisée et complète. Entre 1985 et 2005, les modifications apportées par Ferrone et coll. à leur modèle de double nucléation se distribuent, principalement¹ dans les publications suivantes : [Cao and Ferrone 1997; Ivanova et coll. 2000; Ferrone et coll. 2002; Rotter et coll. 2005b]. La présentation en reste partielle ou incomplète en termes de modèle, d'équations et de valeurs numériques [Ferrone 2004; Ferrone and Rotter 2004; Ferrone 2006].

C'est pourquoi la première phase de ce travail a été de rassembler, de vérifier, et d'implémenter l'ensemble de ces modifications. **Dans notre perspective de mise en place d'une description *dynamique* de la polymérisation de HbS, c'est donc bien la version différentielle « juste » du modèle mathématique que nous avons explorée et exploitée par intégration numérique.**

¹ hors modifications ou améliorations méthodologiques

Le chapitre *Résultats* est divisé en quatre parties. Dans la première partie, sont décrits la mise en place du modèle de base et ses caractéristiques principales, dont la sensibilité aux paramètres, et enfin l'évaluation quantitative de ses performances, par comparaison aux données expérimentales. L'aspect le plus important et novateur de ce travail est l'analyse exhaustive de la dynamique du processus modélisé de polymérisation de HbS, par intégration numérique du modèle différentiel complet.

L'actualisation exhaustive du modèle de 1985, par adjonction des modifications publiées ultérieurement (température, volume exclu), suivie de l'évaluation et la validation quantitative de cette version mise à jour constitue la seconde partie. Une partie des résultats correspondant à cette phase du projet a été publiée.

La troisième partie porte sur la théorie et la mise en place d'une description améliorée de la non-idéalité, prenant en compte simultanément et dynamiquement, le volume exclu des monomères et des fibres polymères. L'analyse quantitative des résultats obtenus présentée ensuite conduit à des nouvelles hypothèses, qui sont testées dans la quatrième partie.

Cette dernière partie des résultats évalue certains aspects spatiaux de la polymérisation de HbS, avec la mise en place exploratoire d'un modèle décrivant le processus d'individualisation et d'évolution des domaines.

VI-1. LE MODELE DE BASE

Dans sa version différentielle et intégrée numériquement. Les simulations présentées sont réalisées à $\approx 25^\circ\text{C}$ ², étant donné que

(i) la plupart des résultats expérimentaux ont été obtenus à cette gamme de température.

² La gamme de température notée « 25°C » correspond à des déterminations expérimentales réalisées entre $24,4$ et $26,1$ °C.

(ii) dans les articles *princeps* les données et les calculs présentés sont à cette température [Ferrone et coll. 1985b; Ferrone et coll. 1985a],

(iii) l'effet de la température - comme variable continue - est détaillé dans la section suivante (section VI-2).

En conséquence, comme nous l'avons souligné ci-dessus : l'évaluation du modèle, dans cette première partie, est fondée exclusivement sur les données expérimentales extraites de [Ferrone et coll. 1985a]. Enfin, nous présentons une analyse numérique de la sensibilité du modèle aux cinq paramètres principaux (cf. Tableau 2, Chap. V).

VI-1-A. CARACTERISTIQUES PRINCIPALES ET DYNAMIQUE

Evolution de la taille des noyaux homogènes et hétérogènes : Selon le modèle de double nucléation, la polymérisation de HbS dépend étroitement de la présence -condition *sine qua none*, de la concentration, et de la taille, des noyaux dits « critiques »³. C'est, en effet, à partir de ces agrégats métastables que se développent et s'allongent les fibres polymères et ce, par additions successives de monomères. La constante réactionnelle cinétique bimoléculaire « k_+ » traduit cette élongation. Dans le contexte de l'hypothèse des deux voies de nucléation, Ferrone et coll. ont montré que les données expérimentales (*in vitro*) ne sont correctement reproduites que si la taille des noyaux (homogène et hétérogènes) est considérée comme une quantité variable, et non constante comme cela avait pu être supposé auparavant [Ferrone et coll. 1985b ; Eaton and Hofrichter 1990]}. Les variables secondaires⁴ du modèle que sont i^* et j^* (tailles critiques des noyaux homogènes –HON- et hétérogènes –HEN-, respectivement) varient donc en fonction de la concentration des monomères libres, avec laquelle ils sont en équilibre (cf. éq. 6 et 7a-c, Chap. V, *Matériel et Méthodes*).

³ Cf. *Matériel et Méthodes*, Chapitre V, pour la présentation mathématique du modèle de double nucléation, et cf. Chapitre IV, section IV-3, pour une présentation conceptuelle du modèle

⁴ Les variables « primaires » étant : (i) t , le temps de simulation, ie. la variable indépendante ; (ii) les trois variables d'état, c'est-à-dire C ([HbS libre]), C_p ([Fibres]), et C_{poly} ([HbS polymérisés]).

Les figures 24a et 24b (ci-dessous) illustrent la dépendance de la taille des noyaux « critiques » (homogènes et hétérogènes, respectivement) vis-à-vis de la concentration des monomères libres de HbS. Cette taille *critique* traduit la barrière énergétique que le système doit « franchir » pour que la polymérisation se produise effectivement (cf. Chap. V).

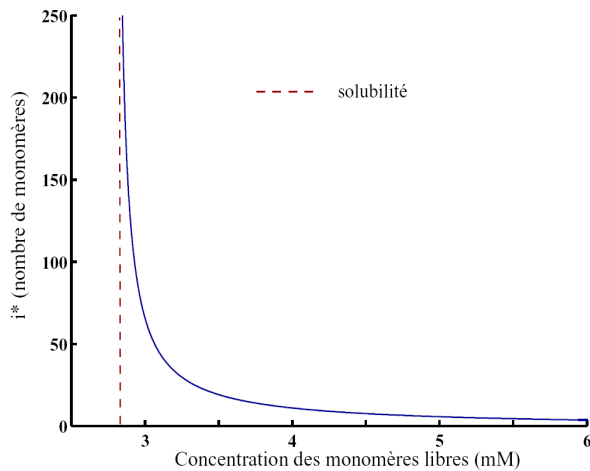


Figure 24a: Taille des noyaux homogènes

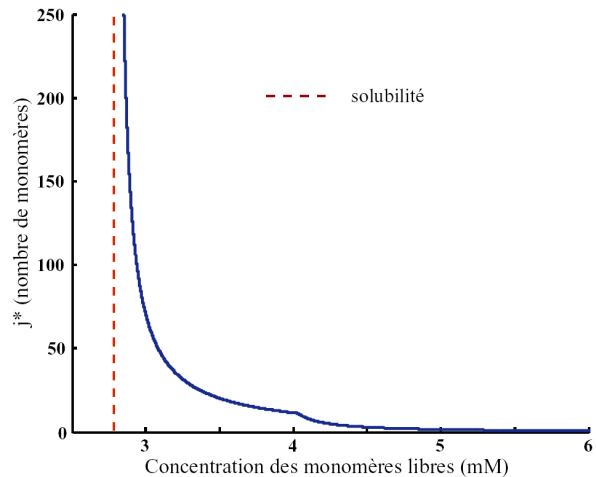


Figure 24b: Taille des noyaux hétérogènes

On observe que la taille des noyaux homogènes, i^* , augmente continûment, lorsque la concentration de HbS (C) diminue (ici à partir de 6 mM), pour tendre asymptotiquement vers une valeur infinie lorsque C tend vers la solubilité de HbS (C_s ; trait rouge discontinu, fig. 24a-b)⁵. À l'inverse, i^* tend vers zéro au-delà de 5 mM de HbS libre. La fonction utilisée pour décrire i^* en fonction de C est continue (réelle et positive) : les valeurs non-entières devraient en toute rigueur être discrétisées, puisque les noyaux sont physiquement constitués d'un nombre entier de monomères ! Pour des raisons de simplicité⁶, nous n'avons pas procédé à cette modification. La diminution de i^* lorsque C augmente facilite la polymérisation à

⁵ De plus, afin d'éviter que les termes du modèle qui dépendent exponentiellement de i^* ou de j^* (cf. éq. 11 et 12, *Matériel et méthodes*) ne franchissent la limite de représentation des nombres de Simulink® ($e^{\pm 308}$), à l'approche de la solubilité, nous avons limité dans les simulations ces deux variables à une valeur maximale de « 272 ».

⁶ et parce que l'ensemble du modèle est défini mathématiquement comme un système continu (aux dérivées ordinaires ; voir Chap IV, *Matériel et méthodes*)

concentration élevée : à 6 mM, chaque monomère libre est *de facto* un noyau susceptible d'engendrer un polymère ; par contre, à 3 mM, les noyaux doivent être constitués d'approximativement 65 monomères pour que la polymérisation démarre (voir figure 24a).

Les observations relatives au noyau homogène (ci-dessus) s'appliquent également au noyau hétérogène (fig. 24b). Deux différences existent néanmoins :

- (i) l'équation de j^* (éq. V-7a-c, *Matériel et Méthodes*) est une fonction par partie, ce qui génère une discontinuité à $\approx 4,1$ mM, correspondant à j_{max} valeur de j^* pour laquelle l'accrétion de monomères additionnels n'augmente plus la surface (donc l'énergie) de contact entre le noyau hétérogène et la fibre;
- (ii) en-deçà du point de rupture, les valeurs numériques de j^* tendent progressivement vers i^* lorsque C tend vers C_s ($j^* = i^* + 1/LnS$, éq. V-7b). Par contre au-delà la gamme de concentration physiologique de HbS, $\approx 5-6$ mM, les noyaux hétérogènes sont systématiquement plus petits que les noyaux homogènes. Ceci est dû à l'énergie de stabilisation additionnelle fournie par les interactions entre le noyau hétérogène et la surface du polymère.

Nota bene : La méthode de gestion de la discontinuité de j^* est décrite en détail dans le chapitre V (*Matériel et méthodes*, section V-2). Ce problème n'est pas abordé dans la version linéaire qui a été publiée et décrite jusqu'à présent. En effet, les « variables d'état » y sont statiques (ne varient pas en fonction du temps), par définition.

Evolution des vitesses : Dans la validation et l'exploitation du modèle, nous utilisons C_{poly} (concentration des monomères polymérisés), la variable d'état du modèle qui correspond à la grandeur déterminée expérimentalement : le signal expérimental est proportionnel à cette grandeur [Ferrone et coll. 1985b; Ferrone et coll. 1985a]. C'est donc à partir de C_{poly} (en dynamique, ou au plateau d'équilibre, en fin de processus) que nous déterminons le temps de latence (t_d), et que nous calculons la fraction de polymérisation ($f_p = C_{poly} / HbS_{tot}$).

Le comportement dynamique du modèle est illustré par les courbes des vitesses, à partir desquelles les variables d'état sont produites par intégration numérique. Les figures 25a, 25b et 25c montrent l'évolution des vitesses de nucléations homogène, et hétérogène, et celle d'élongation des fibres (c.a.d la disparition des monomères de la phase *solution*), respectivement. La figure 25d représente l'évolution intégrée des trois variables d'état du modèle, C et C_{poly} d'une part et C_p (fibres en élongation, en insert), dans les mêmes conditions (6 mM, 25°C). *Nota bene* : à cause des dynamiques différentes, les échelles numériques des axes des 3 courbes sont différentes (cf. ci-dessous).

L'analyse de ces figures permet de comprendre les caractéristiques dynamiques du modèle. La vitesse homogène est la seule vitesse qui soit non-nulle au temps zéro (t_0) : autrement dit, seul le processus *homogène* est « actif » au départ de la réaction. Il décroît régulièrement, pour s'annuler peu après 40 ms. A ce stade la concentration de monomères libres a atteint la valeur de $\approx 5,1 \text{ mM}$ ⁷. L'extinction de $V_{homogène}$ se produit bien avant celle de $V_{hétérogène}$ (approximativement, au second point d'inflexion du décours de celle-ci), et *a fortiori* avant la fin du processus ($C \rightarrow C_s$, au-delà de 0,6 s). Avant de s'annuler, $V_{homogène}$ est en moyenne du même ordre de grandeur que $V_{hétérogène}$. La vitesse d'élongation est, quant à elle, supérieure de ≈ 4 ordres de grandeur. En effet, comme nous l'avons déjà dit, à forte concentration, la formation des noyaux (HON et HEN) est « facilitée » par le fait que chaque monomère représente un noyau, et donc une fibre potentielle. L'équivalence numérique des vitesses homogène et hétérogène suggère que les concentrations des noyaux homogènes et hétérogènes soient également du même ordre de grandeur. Effectivement, C_i^* et C_j^* évoluent de $5 \cdot 10^{-8}$ à virtuellement 0 mM, et de 0 à $7 \cdot 10^{-9}$ mM, respectivement.

⁷ Rappelons que les vitesses homogène et hétérogène dépendent de façon extrêmement sensible et hautement non-linéaire de la variation de concentration des monomères libres, via la concentration des noyaux (cf. éq. 11 et 12, Chap. V, Matériel et méthodes), de sorte qu'une diminution « apparemment » modeste de C se traduit en réalité par une chute brutale et rapide de la vitesse –exemple, pour $C_0 = 6 \text{ mM}$, et une chute de C de 6 à 5 mM, dans l'intervalle de temps correspondant, soit approx. 50 ms, la vitesse homogène est divisée par 100, ie. quasiment annulée ! Dans le même intervalle, la vitesse hétérogène et la vitesse d'élongation atteignent leur maximum (cf. fig. 25a-c).

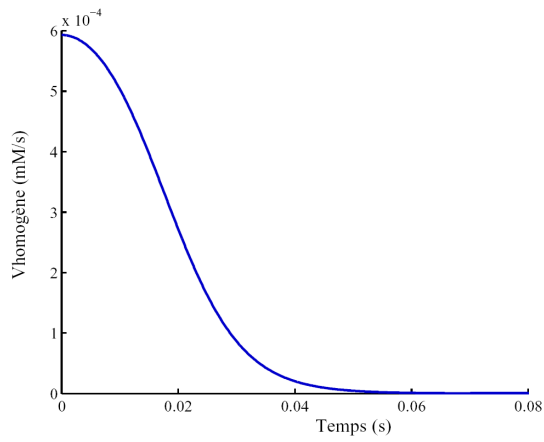


Figure 25a : Evolution de la vitesse homogène

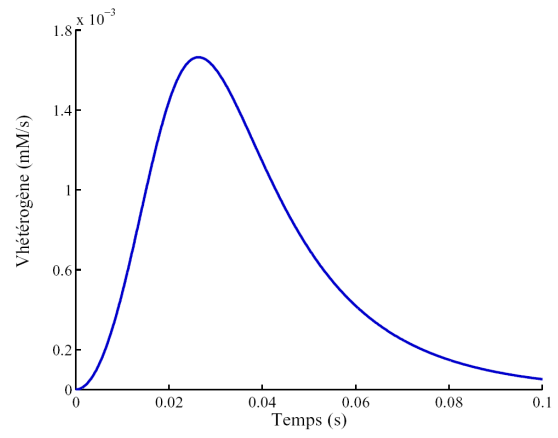


Figure 25b : Evolution de la vitesse hétérogène

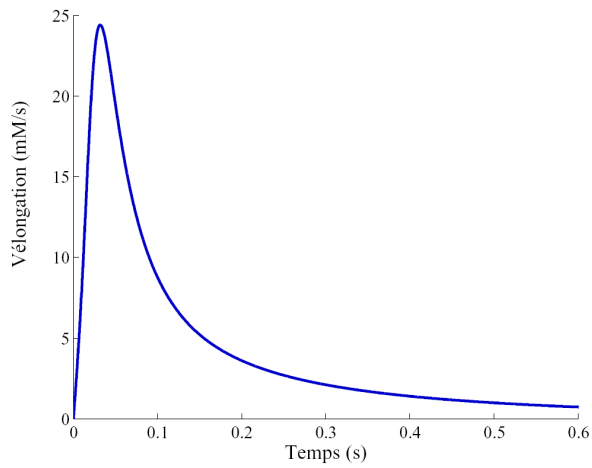


Figure 25c : Vitesse de disparition des monomères

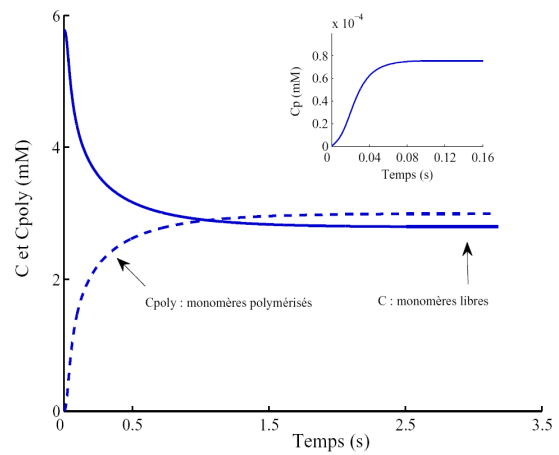


Figure 25d : Dynamiques des variables d'état

Aux faibles concentrations (< 4,5 mM, non représentées ici), la voie hétérogène domine -et ce d'autant plus que C tend vers la solubilité. Cela tient aux faits suivants : les noyaux homogènes sont moins concentrés, et la vitesse d'élongation des premières et « rares » fibres *homogènes* qui en sont issues est suffisamment rapide pour que la nucléation hétérogène s'active avant la formation de nouvelles fibres *homogènes*. A 3,5 mM par exemple, non seulement la vitesse hétérogène est-elle 10^4 fois supérieure à la vitesse homogène (alors que ces vitesses sont du même ordre de grandeur à 6 mM, comme précisé au § précédent), mais la vitesse d'élongation est, elle, $\approx 10^{12}$ fois supérieure à la vitesse homogène (alors que le facteur n'est « que » de 10^3 à 6 mM). Le tableau 3 résume ces observations, de façon semi-quantitative⁸, pour trois concentrations représentatives de la gamme étudiée (3,5 mM, faible ; 4,8 mM, intermédiaire, et 5,8 mM, forte). Ces observations sont faites dans la fenêtre temporelle où $V_{\text{homogène}}$ varie de sa valeur maximale initiale (rapportée dans le tableau) à 1% de celle-ci ; les valeurs maximales de $V_{\text{hétérogène}}$ et de $V_{\text{élongation}}$ sont également reportées dans le tableau.

Tableau 3

Comportements dynamiques différentiels des trois vitesses caractéristiques du modèle de double nucléation : vitesses homogène, hétérogène et d'élongation.

		<i>Observation</i>					
		$V_{\text{homog.}}$ (mM/s)	$V_{\text{hétérog.}}$ (mM/s)	$V_{\text{élong.}}$ (mM/s)	Fenêtre (sec)	$V_{\text{ho}}/V_{\text{he}}$ (--)	$V_{\text{el}}/V_{\text{ho}}$ (--)
C_0 (mM)	3,5	$4 \cdot 10^{-16}$	$4 \cdot 10^{-12}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2-5 \cdot 10^3$	10^{-4}	10^{-12}
	4,8	$2 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-5}$	1,8	$1-6 \cdot 10^{-1}$	10^{-1}	10^6
	5,8	$8 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	26	$5-30 \cdot 10^{-3}$	1	10^3

⁸ (les ordres de grandeur sont pris en compte)

Enfin, les vitesses tendent à s'annuler à l'approche de la solubilité, par épuisement des monomères libres, la supersaturation approchant de la valeur « unité » (S , éq. V-8).

L'intégration des vitesses telles que décrites ci-dessus fournit l'évolution des variables d'état, C_p , C_{poly} et C . La figure 25d montre la dynamique de C et de C_{poly} . En insert, l'évolution de la concentration des fibres est reportée. Tandis que C et C_{poly} évoluent -après une dynamique initiale rapide (40-100ms) - relativement lentement vers leurs limites (0,5-1,5 s), la concentration de fibres en élongation, C_p , atteint très vite son plateau (50 ms). A noter également que la concentration des fibres est de 4 ordres de grandeur inférieure à C ou C_{poly} (l'écart est de 8 ordres de grandeur à 3,5 mM).

Dynamique et concentration initiale : Pour la polymérisation de HbS, le temps de latence dépend de la concentration initiale (C_0). Avec les paramètres de référence (Table 2, Chap. V, *Matériel et méthodes*), nous avons simulé le processus de polymérisation (jusqu'à la solubilité) sur toute la gamme des concentrations étudiées jusqu'à présent. Les résultats sont résumés par la figure 26. La concentration des monomères polymérisés a été normalisée à sa valeur maximale (cf. *Matériel et méthodes*) pour comparaison. Ainsi pour une concentration variant de 3,3 à 6 mM (moins d'un facteur « 2 »), la dynamique de polymérisation couvre près de sept ordres de grandeur. Le temps de latence varie entre 10^{-2} s (à 6 mM) et 10^5 s (à 3,3 mM).

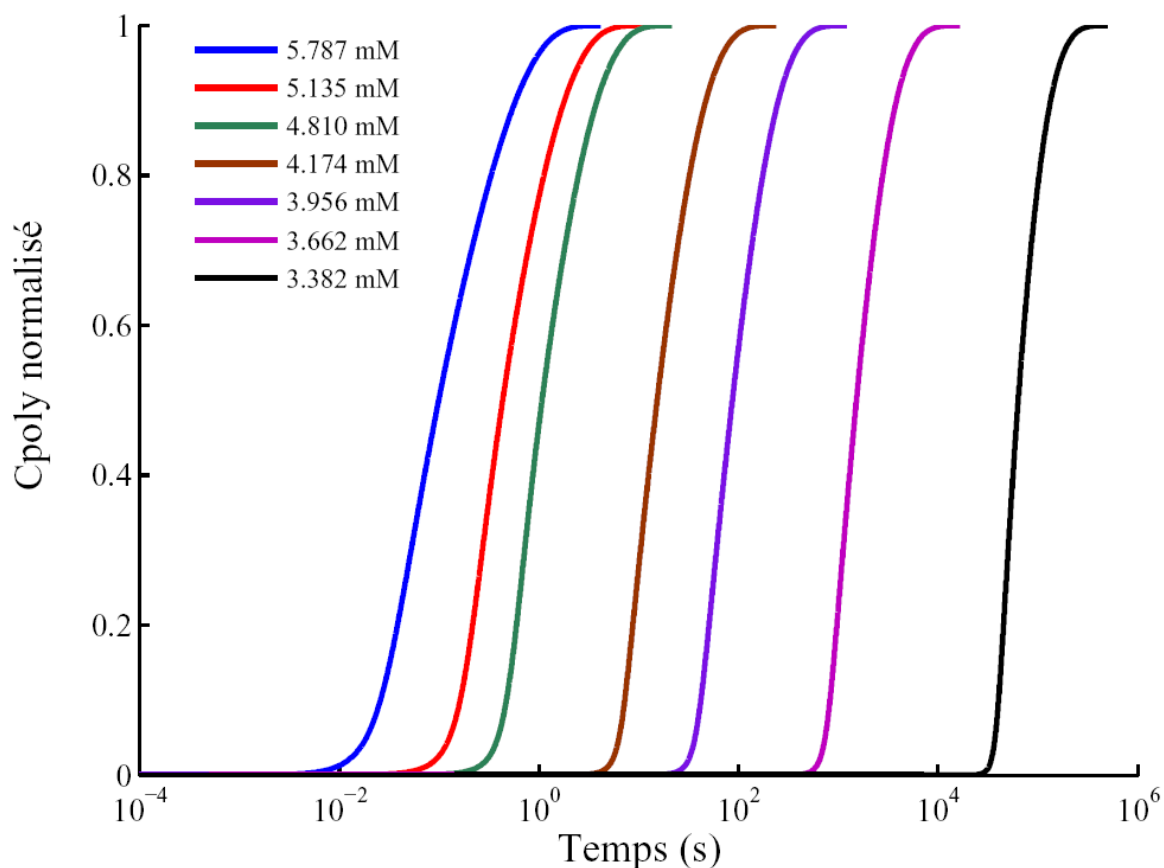


Figure 26:
*Comparaison des dynamiques de polymérisation de HbS
 en fonction de la concentration initiale*

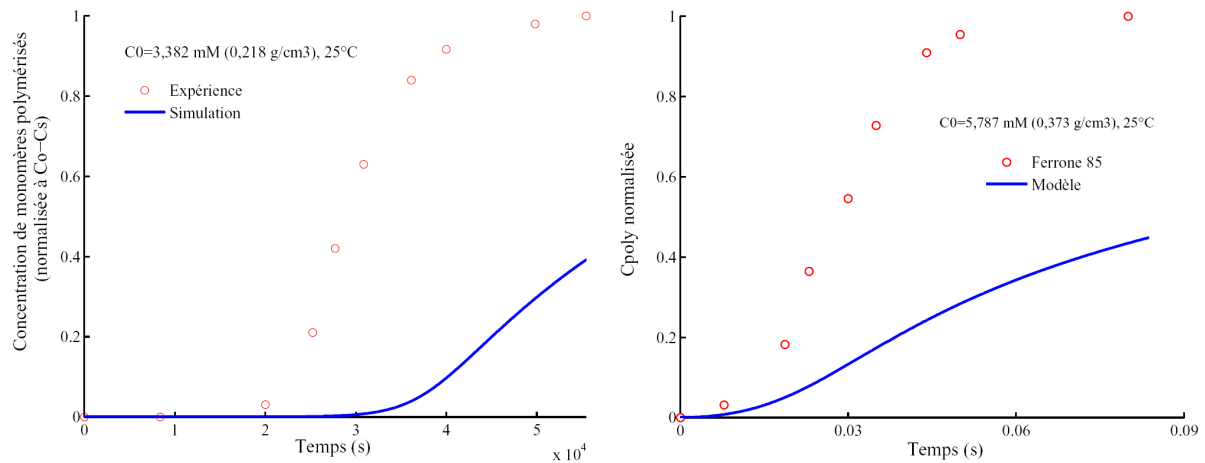
A faible concentration (3,4 mM), le processus se développe relativement lentement, sur deux décades temporelles (10^{-2} à 10^0 secondes), tandis qu'à forte concentration (5,8 mM), il se déroule de façon plus contractée dans le temps (approx. une décade).

VI-1-B. EVALUATION DU MODELE DE BASE

Notre préoccupation primaire est de mettre en place un modèle capable de reproduire la dynamique complète de la polymérisation de HbS, de la concentration initiale jusqu'à la fin du processus, ie. *a priori* la solubilité. Nous avons donc évalué, de façon exploratoire, les performances du modèle, en termes quantitatifs et dynamiques. Pour cela les sorties

numériques sont comparées aux données expérimentales correspondant aux concentrations extrêmes utilisées dans [Ferrone et coll. 1985a], c.a.d. 3,38 et 5,78 mM (à 25°C).

Concentration des monomères polymérisés : La comparaison des sorties du modèle aux données expérimentales. Le modèle intégré ne reproduit pas les courbes expérimentales (les déviations moyennes sont de l'ordre de 0,60). Les courbes produites par simulation numérique du modèle (paramètres initiaux, Tableau 2) différent réellement des courbes expérimentales, est portée des figures 27a et 27b, ci-dessous.



Figures 27a et 27b:

Evaluation exploratoire du modèle initial : intégration complète jusqu'à la solubilité

Légende de la figure 27. Sorties simulées du modèle, courbes continues (en bleu); déterminations expérimentales, courbes discontinues (cercles rouges)⁹

Temps de latence : Etant donné les mauvaises performances du modèle intégré, nous avons cherché à savoir si celui-ci reproduit néanmoins la phase initiale du processus. Nous avons donc déterminé les temps de latence (t_d), et nous avons observé que ceux-ci sont reproduits, avec des rapports $t_d \text{ simulé} / t_d \text{ expérimental}$ proches de l'unité. Ces valeurs, obtenues avec le

⁹ NB : échantillonnage de 8-12 points des courbes expérimentales.

modèle de base, ne sont pas présentées ici, car la même analyse, réalisée avec une version plus performante du modèle, est présentée *in extenso* dans la section suivante¹⁰. Néanmoins, nous pouvons illustrer le comportement précoce du modèle, par la vérification suivante. Le rapport du temps de latence simulé (t_{d_sim}) au temps de latence produit par l'équation phénoménologique n'est pas significativement différent de 1 ($p < 0,16$)¹¹ validée par les expérimentalistes (t_{d_phenom}) (éq. IV-2, section IV-1 ; voir Eaton et Hofrichter, 1990).

En conclusion, cette phase exploratoire montre que le temps de latence est bien reproduit par le modèle. Cependant le déroulement temporel de la polymérisation (concentration des monomères polymérisés) ne l'est pas du tout. Ceci sera repris en détail dans la seconde partie des *Résultats* (cf. également Medkour et coll., 2008).

VI-1-C. SENSIBILITE AUX PARAMETRES

L'exploration précédente nous a montré que le modèle est particulièrement sensible aux paramètres énergétiques. L'analyse systématique de sensibilité que nous avons menée a été réalisée « manuellement », sur la base de deux quantités :

- (i) le degré de polymérisation atteint (à un temps choisi, avant l'équilibre),
- (ii) le temps de latence.

En ce qui concerne le degré de polymérisation, l'analyse a été réalisée aux deux concentrations « extrêmes », 3 mM (à $t = 5 \cdot 10^4$ s, soit ≈ 30 % de complétion du processus par le modèle, cf. figure 26a) et 5,8 mM (à $t = 40$ ms et à $t = 150$ ms, ≈ 20 et 100 % de complétion, respectivement). Pour quantifier la sensibilité, chacun des paramètres a été modifié (de ± 1 et 2 %) de part et d'autre de sa valeur de référence (cf. Tableau 2) et l'effet sur la variable

¹⁰ (de plus, cette vérification a été faite au cours de mon stage de DEA)

¹¹ moyenne \pm sem = $2,7 \pm 1,6$ ($n = 8$) ; en excluant l'un des 8 points, en raison de sa valeur « excentrée » (rapport = 12,5 à 5,8 mM), $m \pm$ sem = $1,1 \pm 1,0$ ($n = 7$).

évaluée (t_d ou C_{poly}) est représenté en pourcentage de la référence (cf. légende du tableau 4, ci-après).

Le tableau 4 résume les résultats obtenus par cette analyse. En ce qui concerne le degré de polymérisation (C_{poly}), on remarque que :

- de façon générale, la sensibilité aux paramètres décroît à forte concentration;
- à faible concentration, la polymérisation est très sensible aux paramètres énergétiques (ex : + 95 , - 19 , et -52 % pour μ_{pc} , $\sigma_1\mu_{cc}$ et $\sigma_2\mu_{cc}$, respectivement) ;
- à forte concentration (au cours du développement de la dynamique, c.a.d. @ 40 ms), le seul paramètre influent (+ 20 %) est μ_{pc} ;
- typiquement, les autres paramètres ont une influence minimale (ex : +2 % pour k_+) ou nulle;
- enfin, les effets de ces paramètres sont considérablement réduits à l'approche de la solubilité (c.a.d. @ 150 ms) (seul μ_{pc} conserve une certaine influence, + 6%).

En ce qui concerne le temps de latence, on peut observer que :

- de façon générale, comme pour C_{poly} , la sensibilité aux paramètres est faible ou nulle à forte concentration -à l'exception notable de μ_{pc} (-25 %).
- à faible concentration, le temps de latence est très sensible à μ_{pc} et $\sigma_2\mu_{cc}$ (- 50 et + 18 %, respectivement), relativement moins à $\sigma_1\mu_{cc}$ (+ 7%), et l'est peu ou pas à Φ et à k_+ .

Tableau 4
Sensibilité du modèle de base aux cinq paramètres principaux

Paramètre « p »	Condition d'évaluation	Variable évaluée (% de la référence)	
		$\Delta C_{poly}/\Delta p.$	$\Delta t_d/\Delta p.$
k_+	$C_0 = 3\text{mM}$	+ 3	- 1
	$C_0 = 6 \text{ mM (@40 ms)}$	+ 2	- 1
	$C_0 = 6 \text{ mM (@150 ms)}$	+ 1	s.o.
μ_{PC}	$C_0 = 3\text{mM}$	+ 95	- 50
	$C_0 = 6 \text{ mM (@40 ms)}$	+ 20	- 25
	$C_0 = 6 \text{ mM (@150 ms)}$	+ 6	s.o.
$\sigma_1\mu_{cc}$	$C_0 = 3\text{mM}$	- 19	+ 7
	$C_0 = 6 \text{ mM (@40 ms)}$	< 1	< 1
	$C_0 = 6 \text{ mM (@150 ms)}$	< 1	s.o.
$\sigma_2\mu_{cc}$	$C_0 = 3\text{mM}$	- 52	+ 18
	$C_0 = 6 \text{ mM (@40 ms)}$	< - 1	- 1
	$C_0 = 6 \text{ mM (@150 ms)}$	- 1	s.o.
Φ	$C_0 = 3\text{mM}$	+ 1	< 1 (-)
	$C_0 = 6 \text{ mM (@40 ms)}$	< 1	0
	$C_0 = 6 \text{ mM (@150 ms)}$	< 1	s.o.

Les valeurs reportées dans ce tableau représentent la pente de la droite de régression de la variable évaluée (exprimée en % de la valeur de référence) en réponse à la modification du paramètre considéré (« p » de -2 à + 2 %). Dans cette analyse, tous les coefficients de détermination de régression sont supérieurs à 0,90. Les valeurs reportées sont arrondies au % le plus proche. La distinction effectuée à 6 mM entre les deux temps de simulation 40 et 150 ms est sans objet (« s.o. ») pour le temps de latence, t_d .

VI-2 EFFETS DE LA TEMPERATURE ET DE LA NON-IDEALITÉ

Dans cette section, le modèle est modifié et mis à jour, en termes de dépendance vis-à-vis de la température, et en terme de non-idéalité pour l'activité du noyau hétérogène. La dépendance du modèle vis-à-vis de la température est convertie en dépendance continue, par expression analytique des paramètres thermodynamiques en fonction de la température. La vitesse de nucléation hétérogène est ajustée avec un nouveau coefficient d'activité pour le noyau hétérogène, modifiant ainsi la *Simplification #2*, telle que posée dans le modèle de base (cf. *Matériel et Méthodes*, section V-1-A.). Le modèle résultant est appelé « Modèle II ».

Une partie des résultats (section VI-2-B) de ces ajustements du modèle, concernant la nucléation hétérogène, a fait l'objet d'une publication [Medkour et coll. 2008]. Celle-ci est présentée *in extenso* en annexe.

VI-2-A. EFFETS DE LA TEMPERATURE ET VITESSE HOMOGENE

Le modèle de double nucléation dépend étroitement de la température *via* son influence sur les cinq paramètres principaux, et sur la solubilité de HbS. La version du modèle de base utilisée dans la section précédente (*Résultats*, VI-1.) ne comportait pas d'implémentation directe de l'effet de T (hormis le terme $R.T$, qui apparaît dans de très nombreuses équations).

Les paramètres initiaux du modèle (Tableau 2 ; [Ferrone et coll. 1985b]) de double nucléation ont été déterminés par ajustement des sorties du modèle linéarisé à (C_0, t_0) à la partie initiale (10 %) d'un ensemble de courbes expérimentales. Celles ci sont décrites par l'équation qui reproduit la phase exponentielle précoce [Bishop and Ferrone 1984]¹² :

$$C_{\text{poly}} = A \cdot [\cosh(B.t) - 1] \quad (\text{éq. VI-1})$$

où A et B sont des paramètres qui sont fonction des vitesses de nucléation et d'élongation¹³

¹² L'identification a été réalisée simultanément pour les 5 paramètres, avec comme objectif la minimisation de l'écart moyen entre l'équation VI-1 et le modèle linéarisé.

L'équation VI-1 représente une solution au premier ordre, obtenue par une méthode de perturbation [Bishop and Ferrone 1984], de la version linéarisée du système différentiel décrit par les équations de vitesse de formation des polymères (éq. V-1), d'élongation (éq. V-2) et de conservation de monomères (éq. V-3 ; cf. *Matériel et méthodes*)¹³. La plausibilité physique des valeurs numériques obtenues et la qualité de l'ajustement suggéraient que la description thermodynamique-cinétique proposée était réaliste et juste [Ferrone et coll. 1985b; Ferrone et coll. 1985a]. Cependant, certains aspects quantitatifs du modèle ont été contestés. Ainsi la première utilisation des méthodes stochastiques révéla une vitesse de nucléation homogène de l'ordre de 100 fois plus élevée que les prédictions du modèle de double nucléation [Hofrichter 1986; Cao and Ferrone 1997]. Comme nous l'avons précisé (Chap. IV), le modèle conceptuel a été validé par l'observation [Samuel et coll. 1990]. Néanmoins, les résultats expérimentaux de Samuel et coll., tout en apportant une détermination indépendante de la constante cinétique k_+ , ont rappelé l'incertitude inhérente aux ajustements simultanés de plusieurs paramètres. Un nouvel ajustement des (quatre) paramètres restants et une nouvelle caractérisation des fluctuations de la nucléation homogène se sont alors imposés.

La constante cinétique d'addition des monomères : Nous avons montré dans l'*Introduction* comment la distribution statistique du temps caractéristique¹⁴ de la polymérisation peut être utilisée pour déterminer la vitesse de nucléation homogène (voir Chapitre V, section V-4 ; cf. [Szabo 1988]). Cette distribution est générée par les fluctuations du délai d'apparition de chaque domaine issu d'un unique noyau homogène.

¹³ $A = f_0 / (g_0 - df_0/dc)$ et $B^2 = J_0 \cdot (g_0 - df_0/dc)$, où f_0 est la vitesse initiale de la voie homogène, g_0 est la vitesse initiale de la voie hétérogène, J_0 est la vitesse initiale d'élongation, et c , la concentration de HbS (cf. section VI-4-B.; pour dérivation, voir Bishop, M. F. and F. A. Ferrone (1984). "Kinetics of nucleation-controlled polymerization. A perturbation treatment for use with a secondary pathway." *Biophys J* **46**(5): 631-44, Ferrone, F. A. and M. A. Rotter (2004). "Crowding and the polymerization of sickle hemoglobin." *J Mol Recognit* **17**(5): 497-504.)

¹⁴ Rappel : le temps caractéristique est défini comme le temps requis pour atteindre 10% de complétion de la réaction (« tenth-time »).

Ce temps caractéristique varie de quelques millisecondes à quelques centaines de kilosecondes (soit un intervalle de 8 ordres de grandeur, cf. figure 26, section précédente). Pour les temps « longs » ($> 100\text{s}$, $C_0 < 4\text{ mM}$), la durée de l'expérience devient prohibitive, car elle compromet, entre autres, la stabilité des échantillons, et impose des contraintes rédhibitoires. Pour franchir cet obstacle, Cao et Ferrone ont développé une méthode « en parallèle » qui, tout en accroissant la précision des mesures, permet d'effectuer un grand nombre (50-200) de déterminations simultanées [Cao and Ferrone 1996]. Le faisceau laser (qui initie par ailleurs la réaction par photolyse) est divisé en plusieurs petits faisceaux. Les volumes de solution définis sont suivis avec une caméra à haute résolution spatiale, la dispersion de la lumière permettant de suivre la formation des polymères. Avec cette méthode, la vitesse de nucléation homogène, en fonction de la concentration et de la température, a pu être déterminée [Cao and Ferrone 1997].

La valeur de vitesse obtenue, couplée à la valeur expérimentale de k_+ [Samuel et coll. 1990] (cf. Chap. IV-3, et figure 16), a permis d'identifier l'un des quatre paramètres résiduels, à savoir le potentiel chimique des liaisons intermoléculaires dans le polymère, μ_{pc} . Dans cette version du modèle (modèle I), la dépendance de k_+ vis-à-vis de la température a été construite par ajustement d'un *corpus* de valeurs expérimentales constitué à partir de l'article de [Cao and Ferrone 1997], et de données non publiées de F. Ferrone (communication personnelle). L'ajustement est réalisé sous Excel©, et l'équation produite est ($n = 6$ points expérimentaux, $R^2 = 0,99$) :

$$\text{Ln}(k_+) = 0,912 \cdot Tc^{0,452} \quad (\text{éq. VI-2})$$

où, Tc la température exprimée en °C (k_+ en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

Enfin, la dépendance du potentiel chimique μ_{pc} ¹⁵ vis-à-vis de T est construite à partir des nouveaux résultats expérimentaux [Cao and Ferrone 1997]¹⁶. L'équation ajustée est (Excel©, $R^2 = 0,94$):

$$\mu_{pc} = -1,503 \cdot \ln(Tc) - 2,707 \quad (\text{éq. VI-3})$$

où μ_{pc} est exprimé en kcal/mol.

La solubilité : Les données expérimentales de solubilité de HbS ont permis la mise en place d'une équation phénoménologique reliant celle-ci à la température (cf. pp116 de [Ross et coll. 1977] ; pour revue, cf. [Eaton and Hofrichter 1990]). Nous avons utilisé l'ajustement quadratique initial (repris par [Galkin and Vekilov 2004], pp48), soit :

$$C_s = 0,319 - 0,00883 \cdot (TK - 273,15) + 0,000125 \cdot (TK - 273,15)^2 \quad (\text{éq. VI-4})$$

où, C_s est exprimée en g/ml, et TK est la température exprimée en K.

En résumé, par la détermination de trois paramètres : constante cinétique k_+ , potentiel chimique des interactions dans le polymère μ_{pc} , et solubilité C_s , la dépendance de la vitesse de nucléation homogène a été étendue à la température, considérée comme une variable continue. Nous avons implémenté l'ensemble de ces effets dans le modèle II.

VI-2-B. NON-IDEALITE, VITESSE HOMOGENE ET VITESSE HETEROGENE

L'existence de régions de contact potentiel à la surface des fibres d'HbS permet à la nucléation de se produire *sur* les polymères préexistants. En effet, pour chaque plateau de 14

¹⁵ μ_{pc} , potentiel chimique, exprimé par mole de monomère polymérisé, des liaisons intermoléculaires au sein du polymère, considéré comme infini –cf. *Matériel et Méthodes*.

¹⁶ Il faut noter une différence de $\approx 1,0$ kcal/mole entre les valeurs de μ_{pc} déterminées dans l'article *princeps* (Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985b). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism." *J Mol Biol* **183**(4): 611-31.) et celles de Cao, Z. and F. A. Ferrone (1997). "Homogeneous nucleation in sickle hemoglobin: stochastic measurements with a parallel method." *Biophys J* **72**(1): 343-52., les valeurs de 1997 (utilisées ici) étant inférieures (stabilisation énergétique supérieure) à celles de 1985 (par exemple, à 25°C : -8,61 vs -7,55 kcal/mol, pour 1985 et 1997, respectivement).

monomères constituant la fibre polymère de HbS, quatre des 10 monomères situés à la périphérie exposent, le résidu muté Val-β6 (de l'une des chaînes β) non impliqué dans le contact *latéral* [Mirchev and Ferrone 1997 ; Roufberg and Ferrone 2000] ; cf. Chap. III). Ces résidus constituent très vraisemblablement les sites préférentiels de la nucléation hétérogène.

L'agrégation de HbS se produit à hautes concentrations en hémoglobine ($> \approx 3$ mM, soit 0,19 g/ml)¹⁷ *in vivo* et *in vitro* (Eaton and Hofrichter, 1990). Par conséquent, la description thermodynamique du processus d'assemblage doit prendre en compte l'encombrement macromoléculaire et la non-idéalité des solutions qui en résulte (cf. Chap. III, section III-4). L'encombrement mutuel de l'hémoglobine tétramérique (« monomère » pour la polymérisation) a été bien étudié, et le coefficient d'activité de Hb (ou HbS) a été déterminé dans des expériences « colligatives »¹⁸ [Ross and Minton 1977; Ross et coll. 1977 ; Ross et coll. 1978; Prouty et coll. 1985].

Ce coefficient d'activité a permis de rationaliser avec succès la solubilité de HbS et son influence sur :

- la polymérisation en présence d'agents macromoléculaires « encombrants » mais non-polymérisants,
- la copolymérisation -partielle ou son absence, d'autres mutants de l'hémoglobines, ainsi que des conformations d'HbS partiellement liée à l'oxygène [Minton 1977 ; Hofrichter 1979 ; Adachi and Asakura 1982; Marden et coll. 1988; Eaton and Hofrichter 1990; Poillon et coll. 1993].

En ce qui concerne la *vitesse homogène* et l'influence de la non-idéalité d' « encombrement moléculaire », le problème a été étudié selon une approche connue sous le

¹⁷ Soit une supersaturation ($S = \gamma C / \gamma_s C_s$, cf. éq. V-8, *Matériel et méthodes*) de $\approx 1,2$ (2,9 mM) ; à 6 mM, $S > 50$.

¹⁸ Se dit des propriétés d'une substance qui ne dépendent que de sa concentration moléculaire et non de la nature même de la substance)

nom de « *scaled particle theory* » (SPT). Grâce à cette description physico-chimique, les coefficients d'activité d'objets moléculaires peuvent être déterminés dans les cas où leur géométrie est similaire. Le cas le mieux traité -et le plus fréquemment utilisé, est celui de la sphère, ou pseudo-sphère pour l'hémoglobine (par exemple, cf. [Guttman et coll. 1995]). Le modèle SPT s'est avéré pertinent et efficace pour décrire la nucléation homogène [Ivanova et coll. 2000].¹⁹.

La **nucléation hétérogène**, quant à elle, pose un défi encore plus ardu. En particulier, le noyau hétérogène se formant à la surface d'un polymère, la SPT ne semble pas appropriée. En effet, d'une part, la réaction de nucléation se produit entre deux « phases », la solution et la surface du polymère, et d'autre part les particules mises en jeu ont des formes différentes (« cylindrique » pour les fibres, « sphérique » pour les monomères et les noyaux, composite pour la fibre portant un noyau).

Originellement [Ferrone et coll. 1985b], la description du coefficient d'activité du noyau hétérogène supposait le coefficient d'activité du polymère égal à celui du polymère complété du noyau agrégé (cf. Modèle de base : Hypothèse #6 et Simplification #2, Chap. V, *Matériel et méthodes*). Mais, nos vérifications ultérieures ont montré que cette hypothèse de travail n'était pas valide. Ainsi, contrairement à la nucléation homogène, la description quantitative de l'effet du « macromolecular crowding » sur la vitesse de nucléation hétérogène *via* la SPT est inadaptée [Ivanova et coll. 2000].

L'inadéquation de la SPT pose des problèmes sérieux en termes de modélisation mathématique -et de simulation numérique. Entre autres, le modèle de double nucléation utilise les énergies d'attachement des noyaux, et des équations cinétiques, toutes grandeurs dépendant directement –ou indirectement, des concentrations ET des activités calculées dans

¹⁹ Brièvement, les auteurs montrent que la SPT permet de prédire quantitativement –sans paramètre additionnel et sans ajustement numérique de paramètre, - diminution de vitesse homogène induite par la présence d'une hémoglobine non-compétente, en l'occurrence HbA Ivanova, M., R. Jasuja, S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2000). "Nonideality and the nucleation of sickle hemoglobin." *Biophys J* 79(2): 1016-22.. Par exemple, à la concentration de HbS de 4-5 mM (≈ 300 g/l), la substitution de la moitié de HbS par HbA réduit la vitesse homogène d'un facteur 10^3 - 10^4 .

le modèle. Ou encore, les contacts intermoléculaires (et donc les énergies mises en jeu) contribuent à l'agrégation, qui *in fine* mène –ou contribue à laétiologie drépanocytaire (voir *Introduction*, Chap. II, III & IV). Au niveau moléculaire, en l'absence de *description réaliste* des phénomènes impliqués, il est impossible d'attribuer un sens aux termes énergétiques impliqués dans le modèle. D'autre part, étant donné l'influence considérable - physiopathologique et thérapeutique, des hémoglobines non-compétentes (oxy-HbS, HbF, HbA), il apparaît qu'une description juste et « exhaustive » de la non-idéalité et des coefficients d'activité correspondants est absolument indispensable. Enfin, ces critiques et précautions se trouvent confirmées par le fait qu'au vu de leurs résultats expérimentaux [Ivanova et coll. 2000], et pour une description plus exacte de la nucléation hétérogène, Ferrone et coll. sont revenus sur la *simplification #2* du modèle de base (Chap 5, section V-1-A.).

Comme nous le verrons dans la troisième partie des résultats, je me suis appuyée sur une déclinaison particulière de la SPT, la « *convex particle theory* » ou *CPT*) [Boublik 1974], qui permet la description de solutions macromoléculaires où les particules peuvent avoir des formes géométriques différentes -pour autant que celles-ci soient convexes (cf. Annexe II). ***Application de la CPT à la description de la non-idéalité du noyau hétérogène telle que mise en place par Ferrone et al. (2002):*** Dans l'équation différentielle de base décrivant la vitesse de formation des fibres polymères (éq. V-1.1, *Matériel et méthodes*) le second terme à droite correspond à la voie hétérogène. Il est modifié par l'introduction d'un facteur multiplicateur, le coefficient Γ (« big gamma », [Ferrone et coll. 2002]. Ce coefficient est en réalité le *rapport* du coefficient d'activité des polymères « nus » à celui des polymères ayant fixé un noyau hétérogène activé (donc de taille j^{*+1}), soit $\gamma_p / \gamma_{p(j^{*+1})}$. En détail, la vitesse du processus hétérogène s'écrit (sous la forme k.A.B):

$$v_{\text{hétérogène}} = k_+ \cdot \gamma C \cdot \{ [\gamma_{j^*} C_{j^*} \cdot (K'_{j^*} \phi)] \cdot \Gamma \cdot C_{\text{poly}} \} \quad (\text{éq. VI-6})$$

où,

k_+ est la constante cinétique d'addition des monomères aux fibres et aux noyaux,

γC est l'activité des monomères libres,

$\gamma_{j^*} C_{j^*}$ est l'activité des noyaux de taille j^* en solution,

C_{poly} est la concentration des monomères polymérisés),

ϕ est la fraction de surface du polymère disponible pour la fixation des noyaux de taille j^* .

Le terme entre les accolades représente l'activité effective des noyaux hétérogènes (c.a.d. fixés aux polymères).

Le gain effectif apporté par le coefficient Γ (Ferrone et al., 2002) au modèle de double nucléation est résumé par la figure 28, ci-dessous, figure extraite de [Ferrone et coll. 2002]: fig. 3, pp104): les symboles "cercles", "carrés" et "triangles" représentent les données expérimentales et les traits -continus et pointillés- les sorties du modèle; l'insert fait référence à la version antécédente du modèle de Ferrone et coll.; "carrés" 35°C, "cercles ouverts" 25°C, "triangles pleins et cercles pleins", 15°C On observe non seulement que l'amélioration obtenue se limite à la gamme de température "35°C", mais de plus qu'elle est partielle (cf. fig. 28, "carrés ouverts" insert *versus* figure principale).

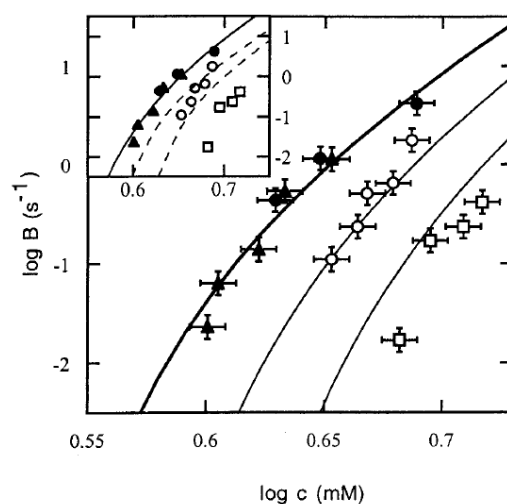


Figure 28 (extraite de Ferrone et al., 2002) :
*Le paramètre phénoménologique B en fonction de logC₀ :
 validation de « big gamma »*

Plusieurs remarques doivent être faites. Tout d'abord, si le modèle (linéaire) reproduit bien les données, l'examen de la figure 3 de l'article de [Ferrone et coll. 2002] (pp404) et de son encart (résultats de 1985 ; cf. figure 28 ci-dessus) suggère (i) que le « gain » d'ajustement manifesté par rapport au modèle initial est modeste, en absence (triangles) ou en présence de 30 % (cercles blancs) de HbA, et ce malgré la représentation log-log, (ii) le gain n'est notable qu'avec 50 % (carrés). Notre interprétation de ces résultats est que le modèle initial est en fait pertinent (version linéarisée), y compris en présence « modérée » (30%) du cosolute macromoléculaire non-polymérisant HbA²⁰. La présence du facteur de non-idéalité Γ n'améliore véritablement le comportement du modèle que lorsque la contribution à la non-idéalité de l'agent non-polymérisant atteint 50%.

Pour terminer cette analyse critique -nécessaire, et outre le passage déterminant à la dynamique qui constitue la clef de voûte de notre travail, il faut constater que, dans le cadre de la description d'une solution qui présente un encombrement moléculaire important (> 10 %), l'application d'une théorie -supposée pertinente, ne peut se réduire à une seule espèce (les noyaux hétérogènes), et doit être étendue aux autres espèces, en l'occurrence les noyaux homogènes (au travers de γ_{*+I}), et les monomères (au travers de γ).

Effet de la température : Afin d'unifier l'ensemble des données expérimentales de vitesse hétérogène -collectées à différentes températures (en fait, le paramètre B « exponential growth rate » cf. 7, 14), des fonctions analytiques dépendantes de la température de $\mu_{cc}\sigma_1$, $\mu_{cc}\sigma_2$, et $\ln \Phi$, ont été construites (Ferrone et al., 2002, 2004). Les équations thermodynamiques correspondantes requièrent chacune trois paramètres. Voici par exemple l'équation décrivant $\mu_{cc}\sigma_1$ en fonction de la température (T_0 , étant une température de référence arbitraire, fixée à 20°C) :

²⁰ (nb : en absence d'information statistique sur les ajustements réalisés).

$$\mu_{cc}\sigma_1(T) = \mu_{cc}\sigma_1(T_0) + \Delta H_1 \cdot \left[1 - \frac{T}{T_0}\right] + \Delta C_{p1} \cdot T \cdot \ln\left(\frac{T_0}{T}\right) \quad (\text{éq. VI-5})$$

où, $\mu_{cc}\sigma_1$ (kcal/mmol) est l'énergie d'interaction ; ΔH_1 (kcal/mmol) et ΔC_{p1} (kcal/mmol/K) sont, respectivement, l'enthalpie et la capacité calorifique correspondant au terme d'énergie de contact $\mu_{cc}\sigma_1$. Deux autres équations similaires existent, pour $\mu_{cc}\sigma_2$ et $\ln \Phi$. La dépendance vis-à-vis de la température de chacun des trois termes énergétiques de contact « hétérogène » introduit donc 3 paramètres, l'enthalpie, la capacité calorifique et la valeur de référence.

Ces équations thermodynamiques ont été insérées dans le modèle.

VI-2-C EVALUATION QUANTITATIVE

L'évaluation quantitative exhaustive des performances du modèle de double nucléation, corrigé et mis à jour (cf. ci-dessus sections VI-1, et VI-2 A-B), dans sa version dynamique a fait l'objet de la publication [Medkour et coll. 2008]²¹, présentée *in extenso* en Annexe. Nous résumons ici les observations et résultats de cette publication.

1. La version différentielle du modèle de double nucléation, numériquement intégrée jusqu'à la solubilité, reproduit bien la phase précoce (« exponentielle ») de croissance des polymères (déviations moyennes = 4 ± 1 % à 25 °C, et 5 ± 1 % à 37 °C). Ce résultat (attendu) se traduit par une prédiction correcte du temps de latence par le modèle intégré, en particulier à 25°C (rapport de $t_d = 1,0 \pm 0,2$, et $1,3 \pm 0,5$, à 25 et 37°C, respectivement).
2. Cependant, le modèle proposé et corrigé par Ferrone et coll. diverge quantitativement au-delà des dix premiers pourcents de la réaction, avec des déviations moyennes

²¹ Une partie des résultats ont également fait l'objet de présentations en congrès nationaux, l'une orale (SFBT, Sté Francophone de Biologie Théorique, 2006, St-Flour), et l'autre affichée RIAMS & IPG (Réseaux d'Interactions, Analyse, Modélisation et Simulation & Integrative Post-Genomics (2007, Lyon)

(« rms ») de $48 \pm 4 \%$ à 25°C , et de $62 \pm 2 \%$ à 37°C . Cette déviation est due au fait que le modèle reproduit insuffisamment l'autocatalyse caractéristique de la polymérisation de HbS. En effet, l'indice moyen de sigmoïdité, n_H , des courbes est de :

- $1,5 \pm 0,1$ p.r. à $5,8 \pm 0,6$ à 25°C
- $1,0 \pm 0,1$ p.r. à $5,9 \pm 0,7$ à 37°C .

3. Par ajustement numérique de deux ($\sigma_2\mu_{cc}$ et ϕ) des trois paramètres impliqués dans la description du processus hétérogène, nous avons pu améliorer notablement les performances du modèle :

- déviation = $13 \pm 1\%$ à 25°C (48% pour le modèle natif), $20 \pm 5\%$ à 37°C (modèle natif, 62%),
- $n_H = 3,0 \pm 0,2$ à 25°C (1,5 pour le modèle natif), $2,6 \pm 0,4$ à 37°C (modèle natif, 1,0).

4. Pour être significatives ($p < 0,01$) les améliorations sont partielles, et un écart subsiste entre les sorties du modèle « ajusté numériquement » et les données de référence (sigmoïdité : 2,6-3,0 par rapport à 5,8).

5. Conclusion, l'autocatalyse présentée par le modèle est insuffisante et la description physicochimique de la nucléation hétérogène requiert d'être affinée.

Analyse : Si l'on considère le véritable succès quantitatif de la version linéarisée du modèle, telle qu'elle a été exploitée par Ferrone et coll. depuis 1985²², il peut apparaître

²² Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985b). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism." *J Mol Biol* **183**(4): 611-31, Cao, Z. and F. A. Ferrone (1996). "A 50th order reaction predicted and observed for sickle hemoglobin nucleation." *J Mol Biol* **256**(2): 219-22, Cao, Z. and F. A. Ferrone (1997). "Homogeneous nucleation in sickle hemoglobin: stochastic measurements with a parallel method." *Biophys J* **72**(1): 343-52, Ivanova, M., R. Jasuja, S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2000). "Nonideality and the nucleation of sickle hemoglobin." *Biophys J* **79**(2): 1016-22, Rao, M. J., A. Malavalli, B. N. Manjula, R. Kumar, M. Prabhakaran, D. P. Sun, N. T. Ho, C. Ho, R. L. Nagel and A. S. Acharya (2000). "Interspecies hybrid HbS: complete neutralization of Val6(beta)-dependent polymerization of human beta-chain by pig alpha-chains." *J Mol Biol* **300**(5): 1389-406, Ferrone, F. A., M. Ivanova and R. Jasuja (2002). "Heterogeneous nucleation and crowding in sickle hemoglobin: an analytic approach." *Biophys J* **82**(1 Pt 1): 399-406, Galkin, O. and P. G. Vekilov (2004). "Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia hemoglobin in deoxy state." *J Mol Biol* **336**(1): 43-59, Rotter, M., A. Aprelev, K. Adachi and F. A. Ferrone (2005a). "Molecular

surprenant que le modèle différentiel intégré diverge « autant » des résultats expérimentaux.

Nous analysons et interprétons ces écarts comme les conséquences des éléments suivants.

Tout d'abord, la description du processus hétérogène, en fonction continue de la température, a nécessité *in fine* l'optimisation simultanée de 9 paramètres²³. Même si le *corpus* de validation était constitué de 51 courbes expérimentales (dans une gamme combinée de concentration et de température), cela constitue, par construction, une source d'erreurs liée à toutes les combinaisons numériques possibles des solutions (et au problème des minima locaux)^{cf. 24}.

L'examen des publications relatives au modèle de double nucléation de 1985 à 2004 montre que les optimisations successives ont fourni un jeu de paramètres ayant quelque peu évolué. Etant donné que chaque modification du modèle invalide *de facto* la construction numérique antécédente, ceci n'est pas surprenant. Il reste que le jeu de paramètres est réaliste et qu'il peut être utilisé comme une base numérique de travail²⁴.

D'autre part, la quantification expérimentale du processus hétérogène est basée sur la grandeur phénoménologique *B*. Or, *B* résulte lui-même, comme nous l'avons déjà évoqué, d'un ajustement. Ceci contribue évidemment à accroître les incertitudes numériques (étape numérique supplémentaire, approximations utilisées de la fonction *cosh*,...). **De ce point de vue, le modèle intégré et dynamique complet que nous avons développé dans ce travail permet, par construction, le calcul exact de toutes les quantités.** Ceci nous affranchit

crowding limits the role of fetal hemoglobin in therapy for sickle cell disease." *J Mol Biol* **347**(5): 1015-23, Rotter, M. A., S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2005b). "Heterogeneous nucleation in sickle hemoglobin: experimental validation of a structural mechanism." *Biophys J* **89**(4): 2677-84, Vekilov, P. G. (2007). "Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?" *Br J Haematol* **139**(2): 173-84, Medkour, T., F. Ferrone, F. Galacteros and P. Hannaert (2008). "The Double Nucleation Model for Sickle Cell Haemoglobin Polymerization: Full Integration and Comparison with Experimental Data." *Acta Biotheor.*

²³ Malgré l'isolation de la vitesse homogène, rendue possible par la détermination expérimentale de k_+ (éq. VI-2 et VI-3) Cao, Z. and F. A. Ferrone (1997). "Homogeneous nucleation in sickle hemoglobin: stochastic measurements with a parallel method." *Biophys J* **72**(1): 343-52..

²⁴ Nous n'avons pas, dans ce travail, effectué d'optimisation numérique des paramètres, car (i) *chacune* des modifications, définitive ou provisoire, l'aurait, par principe requis, (ii) la quantité de calculs aurait été, sinon rhédibitoire, du moins problématique (à cause de la gamme de conditions expérimentales, combinée à la nature dynamique du processus). Etant donné la taille et la combinatoire du problème, les algorithmes évolutionnaires de type « génétiques » seraient sans doute les plus adaptés à cette tâche.

d'hypothèses numériques additionnelles, et nous exonère de l'utilisation d'une fonction secondaire pour exprimer la vitesse hétérogène.

Ensuite, le modèle vise -par définition - à reproduire la polymérisation de HbS sur toute l'étendue des conditions expérimentales utilisées. Or, cette gamme est très large, en termes de concentration (de 3 à 6 mM) et de température (de 15 à 35°C). En termes de modèle, cette gamme est emprunte de conséquences numériques si l'on considère la large sensibilité du processus à la concentration (cf. courbes d'évolution de la taille des noyaux par exemple, figures 24a-b, section VI-1)²⁵. Enfin, l'utilisation même d'une version linéarisée du modèle différentiel (c.a.d. avec C statique, figée à C_0 , donc taille statique des noyaux, figée à la valeur initiale ; polymères et terminaisons ignorés, etc) ne permet pas d'approcher la réalité des phénomènes. En fait, comme nous l'avons montré dans la section *Matériel et méthodes*, (section V-1-B), les termes, coefficients multiplicateurs ou exposants des équations principales (éq. V-1, V-2 et V-3) sont des fonctions de C (concentration des monomères libres), donc des variables dynamiques elles aussi. L'ensemble de ces éléments nous amène tout naturellement à la question: **Les cinq paramètres du modèle doivent-ils être constants ?**

La conséquence des deux dernières observations (étendue des conditions expérimentales, et modèle linéaire « statique ») est que les cinq paramètres du modèle sont définis comme des constantes (indépendantes du temps, comme de la concentration, initiale). Hypothèse légitime dans le cadre statique du modèle linéarisé à C_0 , elle doit être remise en question dans le modèle dynamique. Certaines de ces constantes pourraient varier avec C (et/ou t). A cet égard, nous avons mené les réflexions suivantes, pour chacun des paramètres.

²⁵ Rappelons que la principale méthode utilisée pour induire la polymérisation est précisément le « saut de température » (voir Chap. IV).

- La « constante » cinétique bimoléculaire d'addition des monomères aux fibres et aux noyaux, k_+ , a été déterminée expérimentalement. Par conséquent sa valeur numérique doit être utilisée telle quelle et invariante. C'est ce que nous ferons ici.
- Le potentiel chimique, μ_{PC} , caractérise les interactions entre monomères de HbS au sein du polymère. Il ne dépend que de la structure de celui-ci et doit, à ce titre, être considéré comme une constante.
- Les termes $\sigma_1\mu_{cc}$ et $\sigma_2\mu_{cc}$ sont des combinaisons numériques de paramètres énergétique (μ_{cc}) et géométriques (σ_1 et σ_2). Ils définissent le potentiel chimique des interactions entre le noyau hétérogène en fonction de la taille du noyau hétérogène (cf. *Matériel et méthodes*). En combinaison avec la fraction de surface de polymère effectivement disponible pour la nucléation hétérogène, représentée par le paramètre ϕ , $\sigma_1\mu_{cc}$ et $\sigma_2\mu_{cc}$ permettent de déterminer la concentration des noyaux hétérogènes, donc la vitesse correspondante. Dans l'équation VI-6 (cf. plus haut), le terme $[\gamma_{j^*} \cdot C_{j^*} \cdot K'_{j^*} \cdot \phi]$ représente la concentration (normalisée par monomère polymérisé) des noyaux hétérogènes, fixés aux polymères $[\gamma_{j^*} \cdot C_{j^*} \cdot K'_{j^*} \cdot \phi]$. Le produit $(K'_{j^*} \cdot \phi)$ a donc la dimension d'une constante d'équilibre de fixation des noyaux (taille j^*) aux polymères (ϕ étant, par définition, une fraction de surface de polymère). Il correspond au terme d'énergie additionnelle²⁶ de stabilisation des noyaux hétérogènes dû aux contacts *entre* le noyau et le polymère, selon [Rotter et coll. 2005b]:

$$-RT \ln K'_{j^*} \phi = -RT \ln \phi + \mu_{cc} \sigma_1 j^* + \mu_{cc} \sigma_2 \ln j^* \quad (\text{éq. VI-6})$$

²⁶ Etant libres en solution, les noyaux homogènes ne bénéficient pas de ce terme additionnel.

Les trois paramètres « hétérogènes » sont donc interdépendants. Or, si la définition même (au moins initiale) de ϕ (fraction de surface du polymère susceptible de nucléation) implique *a priori* qu'il soit constant, il n'en est pas de même pour $\sigma_1\mu_{cc}$ et $\sigma_2\mu_{cc}$. Il faut donc postuler qu'ils évoluent en fonction de la concentration de HbS, initiale aussi bien que dynamique.

A cet égard, il est hautement significatif que, dans notre étude :

- 1) $\sigma_2\mu_{cc}$ et ϕ aient dû être modifiés simultanément²⁷
- 2) les modifications requises de ϕ évoluent avec la concentration (≈ 7 ordres de grandeur ; cf. Table 2 dans Medkour et coll., 2008).

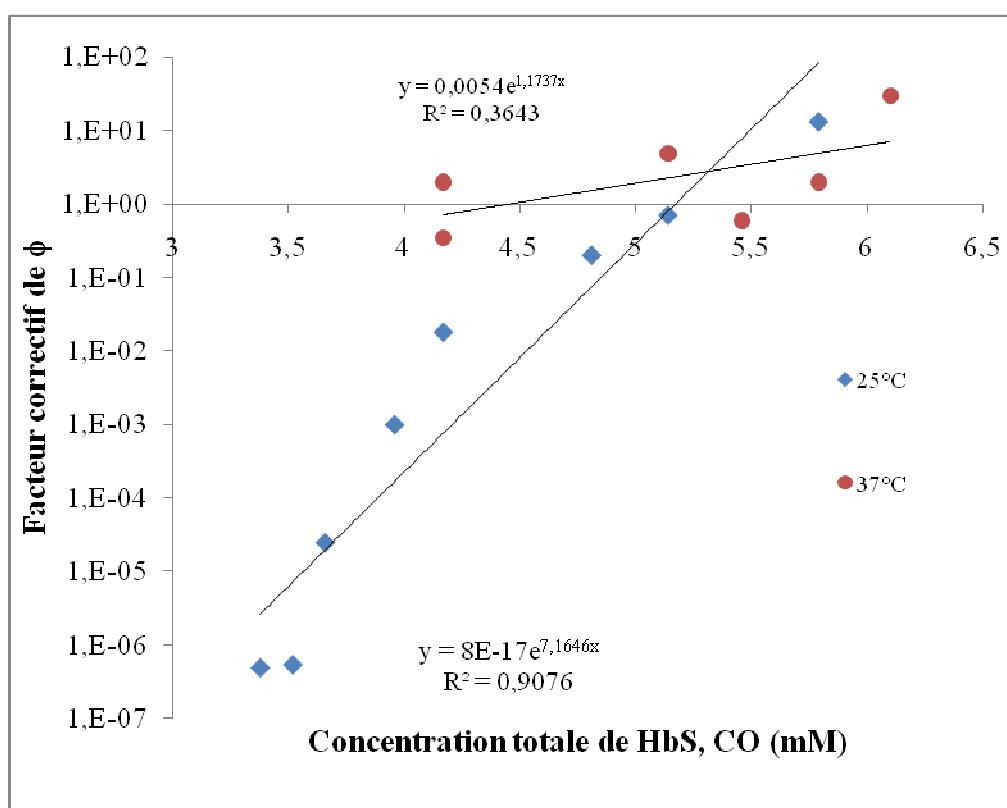


Figure 29 :
Variation du facteur de correction appliqué au paramètre ϕ
en fonction de la concentration de HbS

²⁷ Le peu d'influence apparent de $\sigma_1\mu_{cc}$ est probablement lié à sa faible valeur numérique (de plus d'un ordre de grandeur inférieur à $\sigma_2\mu_{cc}$; cf. Medkour et al., 2008)

En ce qui concerne l'ampleur de la gamme de conditions expérimentales à couvrir, la figure 29 présente l'évolution, en fonction de la concentration (et dans les deux gammes de température « 25°C » et « 37°C »), de la valeur du facteur correctif appliqué au paramètre ϕ (simultanément à $1,4 \times \sigma_{2\mu_{cc}}$). Ceci est requis pour obtenir une amélioration significative des courbes simulées par rapport aux données expérimentales (cf. *Table 2* du manuscrit en *Annexe*, [Medkour et coll. 2008]. On constate que la valeur corrective nécessaire diminue exponentiellement au fur et à mesure que la concentration décroît à 25 °C ($p < 5.10^{-4}$, ddl = 6) et à 37 °C ($p < 0,08$, ddl = 4). Ces observations suggèrent que l'influence du paramètre ϕ -qui conditionne l'autocatalyse- est minimisée à forte concentration. Or c'est à ce niveau que la vitesse homogène domine (cf. section VI-1-A *Evolution des vitesses*). Par contre, à faible concentration, où vitesse hétérogène et autocatalyse dominent largement, ϕ devient plus important, d'où la nécessité de le modifier en conséquence. L'examen détaillé de la figure 29 suggère que, à 25 °C, l'évolution du facteur correctif soit en réalité biphasique, c.a.d. décrite par deux droites successives -la cassure ayant lieu aux environs de 4 mM. C'est à cette concentration que les noyaux hétérogènes atteignent leur taille maximale, j_{max} (cf. *Matériel et méthodes*, « gestion de la discontinuité ») et que l'énergie de contact correspondante sature. Ceci pourrait expliquer une autocatalyse insuffisante (et l'augmentation de la pente du facteur en fonction de C).

En conclusion, les modifications apportées dans cette section au modèle (description plus fine de la nucléation hétérogène et de son contrôle par la non-idéalité de la solution), ont permis d'en améliorer significativement le comportement et de le rapprocher des données expérimentales. Néanmoins, le modèle dynamique reste à diverger des courbes

expérimentales, en particulier par défaut d'autocatalyse. Nos hypothèses principales pour expliquer cette divergence concernent :

- la description incomplète de l'encombrement moléculaire de la solution, et des conséquences sur la non-idéalité,
- la nucléation hétérogène, déterminant majeur de l'autocatalyse,
- le jeu invariant de paramètres -conséquence de l'optimisation réalisée avec un modèle linéarisé et statique.

VI-3. AMELIORATION DE LA DESCRIPTION DE LA NON-IDEALITÉ

Nos résultats présentés dans la section précédente suggèrent que l'inadéquation du modèle corrigé « big gamma » (modèle II) soient dues (en particulier) à la description incomplète de la non-idéalité et du processus hétérogène. C'est pourquoi, j'ai affiné la description de la non-idéalité de la solution. A cet effet, j'ai pris en compte les fibres polymères dans le calcul des coefficients d'activité des monomères et des noyaux –ainsi que par l'introduction explicite du coefficient d'activité de ces mêmes fibres. Pour ce faire, nous mettons en place des équations qui répondent simultanément à la taille, à la forme et à la concentration des fibres polymères au fur et à mesure qu'elles apparaissent et s'allongent avec une réduction concomitante de la concentration de monomères libres. Ce faisant, je dois revenir sur l'une des simplifications majeures du modèle initial, qui postulait dominante l'espèce monomère²⁸. Cette simplification, pertinente pour la partie initiale, est invalidée dès lors que la présence et le volume exclus des polymères formés deviennent significatifs.

Je présente ci-dessus les théories utilisées pour le calcul des coefficients d'activité, avec les équations correspondantes, Puis, nous présentons les résultats obtenus et les performances du modèle modifié, le modèle III (ou modèle « non-idéal, CPT »).

²⁸ -sa seule concentration étant par conséquent prise en compte dans les différents coefficients d'activité

VI-3-A. THEORIE ET APPLICATION

Comme nous l'avons précisé, de façon préliminaire, en *Introduction* (Chap. III, section III-4-A.), les milieux biologiques, et tout spécialement les milieux intracellulaires tels que le cytosol, diffèrent des solutions idéales sur deux points importants. Tout d'abord, ils contiennent une concentration totale élevée de macromolécules solubles (300-500 g/l), majoritairement des protéines chez les Eucaryotes (pour revue, voir [Zimmerman and Minton 1993]). Dans l'érythrocyte, seule l'hémoglobine est présente à forte concentration (~350 g/l). A de telles concentrations²⁹, le volume de solution occupé par ces mêmes macromolécules ne peut être négligé, la fraction correspondante pouvant représenter 20-40 % du volume intracellulaire. De plus, celui-ci est véritablement *structuré* par la présence de divers réseaux et assemblages moléculaires, dont les composants du cytosquelette, filaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires.

Ces conditions et l'environnement local influencent de façon décisive l'évolution des réactions. Ainsi, l'encombrement macromoléculaire est-il capable de modifier les caractéristiques cinétiques et thermodynamiques des réactions d'agrégation protéique, en particulier lorsque les réactants (ou les complexes transitionnels) interagissent différemment avec les espèces « d'arrière-plan » (Zimmerman and Minton, 1993)³⁰.

L'encombrement macro-moléculaire et ses conséquences sur la non-idéalité des solutions est décrit au premier ordre par la SPT (théorie que nous avons présentée en *Introduction*, section III-3). La théorie des particules convexes (CPT) constitue une amélioration considérable de la SPT : nous l'avons exploitée dans notre travail. L'*Annexe II*

²⁹ équivalentes à 2-10 mM, selon le poids moléculaire (15 000-200 000 g/mol)

³⁰ Lorsque les macromolécules, solubles ou structurales, ne participent pas directement à une réaction particulière, elles sont considérées comme espèces « d'arrière-plan » (« back-ground species »).

présente en détail, (i) les bases de la CPT, puis (ii) notre application de celle-ci au cas qui nous concerne de solutions de HbS polymérisante (monomères + fibres), c'est-à-dire :

- les hypothèses géométriques et physiques que nous avons posées,
- la dérivation des équations que nous avons réalisée

VI-3-B. EVALUATION DU MODELE III « NON-IDEAL, CPT »

Dans la première partie de cette section, je présente le jeu de paramètres utilisé et leur dépendance vis-à-vis de la température (M. Ivanova et F. Ferrone, communication personnelle)³¹. Dans la deuxième partie, je me suis attachée à quantifier le comportement de la version linéaire, avant d'effectuer l'évaluation quantitative du modèle dynamique intégré dans la troisième partie. Dans la dernière partie, nous présentons l'analyse qui sert de substrat au modèle « domaines » développé dans la section finale des *Résultats* (VI-4. Modèle « domaines »). Une partie du travail présenté dans cette section a été effectuée en collaboration avec la défunte docteur Maria Ivanova et le professeur F. Ferrone lors d'un stage que j'ai effectué dans le *Laboratoire de Physique* dirigé par ce dernier (*Drexel University*, Philadelphie).

VI-3-C. PARAMETRES DU MODELE

Nous présentons ci-après les modifications apportées au nouveau modèle, comparativement à celui utilisé dans la section précédente.

³¹ Celui-ci est issu d'ajustements réalisés entre 2006 et 2007 par Ferrone et coll., sur la base de la version linéaire du modèle « big gamma » (cf. *Résultats*, section VI-3, pour une description de la version intégrée).

- Constante cinétique d'addition du monomère, k_+ , en fonction de la température (mM.s⁻¹) :

$$k_+ = 8.1944 \times 10^{11} \times \exp\left(\frac{-13.9}{TK \times R}\right) \quad (\text{VI-7})$$

Energie d'activation : -13,9 kcal/mole

TK = température absolue, exprimée en K

Commentaire : Dans les versions précédentes du modèle, nous avons utilisé un ajustement phénoménologique des données k_+ en fonction de la température (éq. VI-2). Toutefois, afin d'avoir une description réaliste, nous avons procédé à un ajustement des données selon la loi d'Arrhénius³².

- Potentiel chimique des liaisons intermoléculaires dans le polymère par monomère polymérisé (μ_{PC}), en kcal/mol:

$$\mu_{pc} = [0.0034.(T_c)^2 - 0.2305.T_c - 4.03] \quad (\text{VI-8})$$

Commentaire : Pour le calcul de μ_{PC} en fonction de la température, nous avons remplacé l'ajustement logarithmique utilisé auparavant (cf. éq. VI-3) par l'ajustement quadratique ci-dessus (éq. VI-20) qui reproduit sensiblement mieux les données et la forme de la courbe ($R^2 = 0,97$ versus 0,94).

- Paramètres énergétiques-géométriques qui décrivent la liaison du noyau hétérogène à la surface du polymère (kcal/mol). Je reporte *in extenso* les expressions utilisées pour le calcul des trois paramètres de modèle, soit. $\sigma_1\mu_{cc}$, $\sigma_2\mu_{cc}$ (en kcal/mol), et ϕ (sans

³² Nous avons vérifié que les valeurs de $k_+ = f(T)$ sont identiques, à moins de 5 % près (résultats non présentés).

dimension). Ces équations sont extraites de [Ferrone et coll. 2002] et [Rotter et coll. 2005b].

$$\sigma_1\mu_{cc} = [\sigma_1\mu_{cc} 20 + dH_1(1 - \frac{T_K}{293.16}) + dC_{p1} \times T_K \times \ln \frac{293.16}{T_K}] \quad (VI-9)$$

$$\sigma_2\mu_{cc} = [\sigma_2\mu_{cc} 20 + dH_2(1 - \frac{T_K}{293.16}) + dC_{p2} \times T_K \times \ln \frac{293.16}{T_K}] \quad (VI-10)$$

$$\phi = \exp[\ln \phi 20 + \frac{dH\phi}{R} (\frac{1}{T_K} - \frac{1}{293.16}) + \frac{dC_{p\phi}}{R} \times \ln \frac{293.16}{T_K}] \quad (VI-11)$$

où , $\sigma_1\mu_{cc}(20)$, $\sigma_2\mu_{cc}(20)$, et $\ln\phi(20)$ représentent la valeur du paramètre correspondant à la température de référence (20°C = 293 K) ; dH_1 , dH_2 et dH_ϕ d'une part, et dC_{p1} , dC_{p2} et $dC_{p\phi}$ d'autre part, représentent les enthalpies (indépendantes de T) et les capacités calorifiques, pour les différents termes de contact, tels qu'ils sont référencés par les indices « 1 » pour $\sigma_1\mu_{cc}$, « 2 » pour $\sigma_2\mu_{cc}$, et « ϕ » pour lui-même. Le tableau 5 présente les valeurs des constantes thermodynamiques utilisées dans ces équations.

Table 5 : Constantes utilisées pour le calcul des paramètres énergétiques de la nucléation hétérogène (équations VI-21 à VI-23)

$\sigma_1\mu_{cc} 20 = 0,092$ kcal/mole
$\sigma_2\mu_{cc} 20 = -5,76$ kcal/mole
$\ln \phi 20 = 6,54$ (sd)
$dH_1 = -83,39$ kcal/mole
$dH_2 = 1120,6$ kcal/mole
$dH\phi = -3,28 \cdot 10^2$ kcal/mole
$dC_{p1} = 0,27$ kcal/mole.K
$dC_{p2} = -3,63$ kcal/mole K
$dC_{p\phi} = 1,1323$ kcal/mole K

VI-3-D. EVALUATION DE LA VERSION LINEAIRE

Compte tenu des ajustements, tâtonnements, et nombreuses modifications successives, (majeures et mineures), que j'ai dû apporter au modèle (cf. section précédentes), nous avons évalué la version linéaire du modèle III, avant d'en étudier en détail le comportement dynamique intégré. Les équations correspondantes sont détaillées en *Annexe III*.

Avec Simulink©, nous avons implémenté les équations principales du modèle linéaire (éq. AIII-4 à AIII-7), couplées aux équations « secondaires » (taille des noyaux, coefficients d'activité et constantes d'équilibres, cf. *Annexe III*). En fonction de la concentration de HbS (C_0) et à différentes températures (15, 25, 35 °C), nous avons recalculé :

- (i) le terme $\log(B^2A)$ (éq. AIII-3), qui caractérise la vitesse homogène initiale³³, et
- (ii) le terme $\log(B)$ (éq. AIII-2), qui caractérise « principalement » la vitesse hétérogène initiale³⁴.

Quelle est la dépendance à C_0 de ces deux termes caractéristiques ?

Les figures 30a et 30b illustrent les résultats obtenus à 25 °C pour le terme homogène et pour le terme hétérogène, respectivement. On constate que le modèle linéaire reproduit bien les données de référence (voir Tableau 6)³⁵. Le tableau 6 rassemble mes résultats en termes de déviation moyenne (« rms ») entre les points simulés et les points expérimentaux.

³³ J_0 est constant dans le modèle linéaire (cf. Annexe III, éq. AIII-6)

³⁴ Comme le montre l'équation VI-25, le terme B ne dépend pas exclusivement de la vitesse hétérogène, mais intègre également une influence de la dérivée df_0/dC_0 .

³⁵ Des résultats similaires ont été obtenus par Ferrone et coll., avec leur propre implémentation sous Matlab© du jeu d'équations linéaires (communication personnelle).

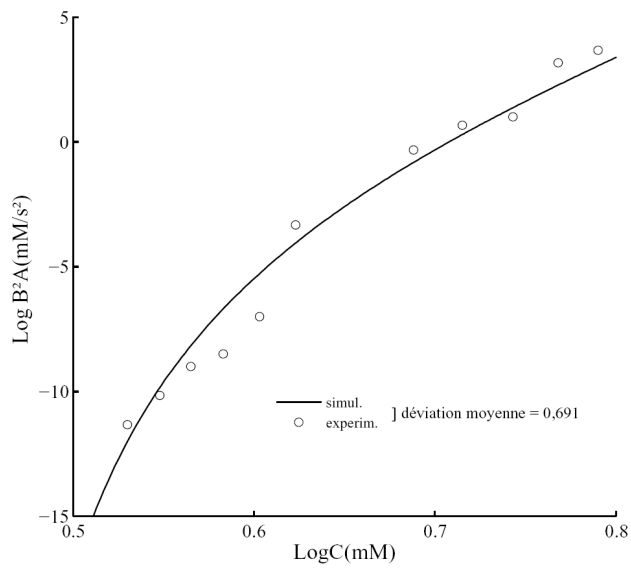


Figure 30a
Modèle linéaire à 25°C :
Vitesse homogène initiale ($\log B^2 A$) en fonction de C_0

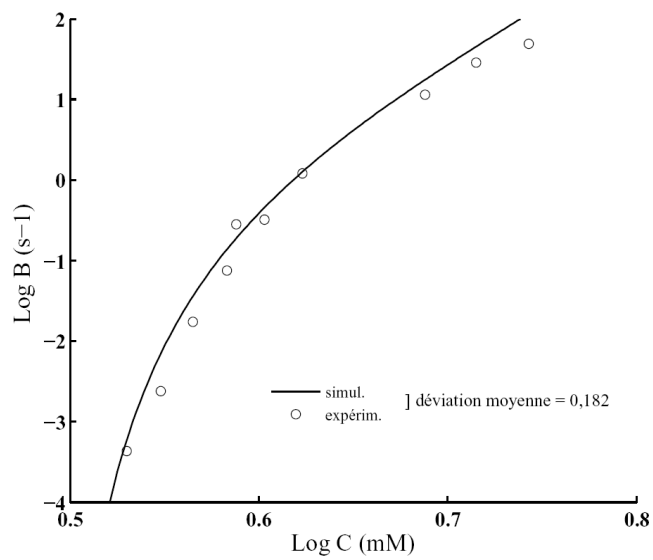


Figure 30b
Modèle linéaire à 25°C :
Vitesse hétérogène initiale ($\log B$) en fonction de C_0

Tableau 6

Comportement quantitatif du modèle linéaire :

Déviations moyennes entre les simulations et les données expérimentales

	Log₁₀(B²A)	Log₁₀(B)
15 °C	1,472	0,354
25 °C	0,691	0,182
35 °C	1,191	0,190

L'examen du Tableau 6 indique que la version linéarisée du modèle III, « non-idéal, CPT », reproduit de façon satisfaisante la partie précoce (10 %) des courbes expérimentales³⁶.

VI-3-C. ETUDE DU MODELE DYNAMIQUE INTEGRE

Nous avons comparé le modèle dynamique intégré aux données expérimentales de référence³⁷. Les figures 31 et 32 comparent les courbes simulées aux courbes expérimentales :

- dans la gamme « 25°C » (figure 31), $C_0 = 3,66 - 5,79$ mM, $T = 24,4 - 25^\circ\text{C}$,
- dans la gamme « 37°C » (figure 32), $C_0 = 5,16$ et $5,79$ mM, $T = 39,2$ et $36,4^\circ\text{C}$,

Le tableau 7 résume l'ensemble des résultats obtenus.

L'examen des figures 31-32 et du tableau 7 permet de constater que le modèle « non-idéal CPT » reproduit les données expérimentales, à 25°C et à 37°C (écart moyen = 0,19 et 0,29, respectivement), tout en conservant le temps de latence (td_ratio (rapport des t_d)= 0,84), et ce pour une gamme de concentration allant de 4 à 6 mM. La sigmoïdité (donc l'autocatalyse) simulée reste néanmoins inférieure à la sigmoïdité expérimentale (2,7 versus

³⁶ Considérant l'échelle logarithmique pour les grandeurs B^2A et B (cf. Figures 30a et b ; et Tableau 6), les valeurs d'erreur rapportées (de 0,7 à 1,5, et de 0,18 à 0,35 , respectivement) correspondent approximativement à des erreurs d'un facteur 10 pour B^2A (qui varie sur 15 ordres de grandeur), et d'un facteur 2 pour B (qui varie sur 6 ordres de grandeur).

³⁷ Pour rappel, le *corpus* de données expérimentales couvre une gamme de concentration de $\approx 3-6$ mM, et une gamme de température de 15-40 °C.

5,8, et 2,3 *versus* 5,9, respectivement). D'un point de vue quantitatif, ces améliorations sont comparables à celles que nous avons obtenues par « ajustement numérique » des paramètres (cf. section VI-2-C ; Medkour et coll., 2008).

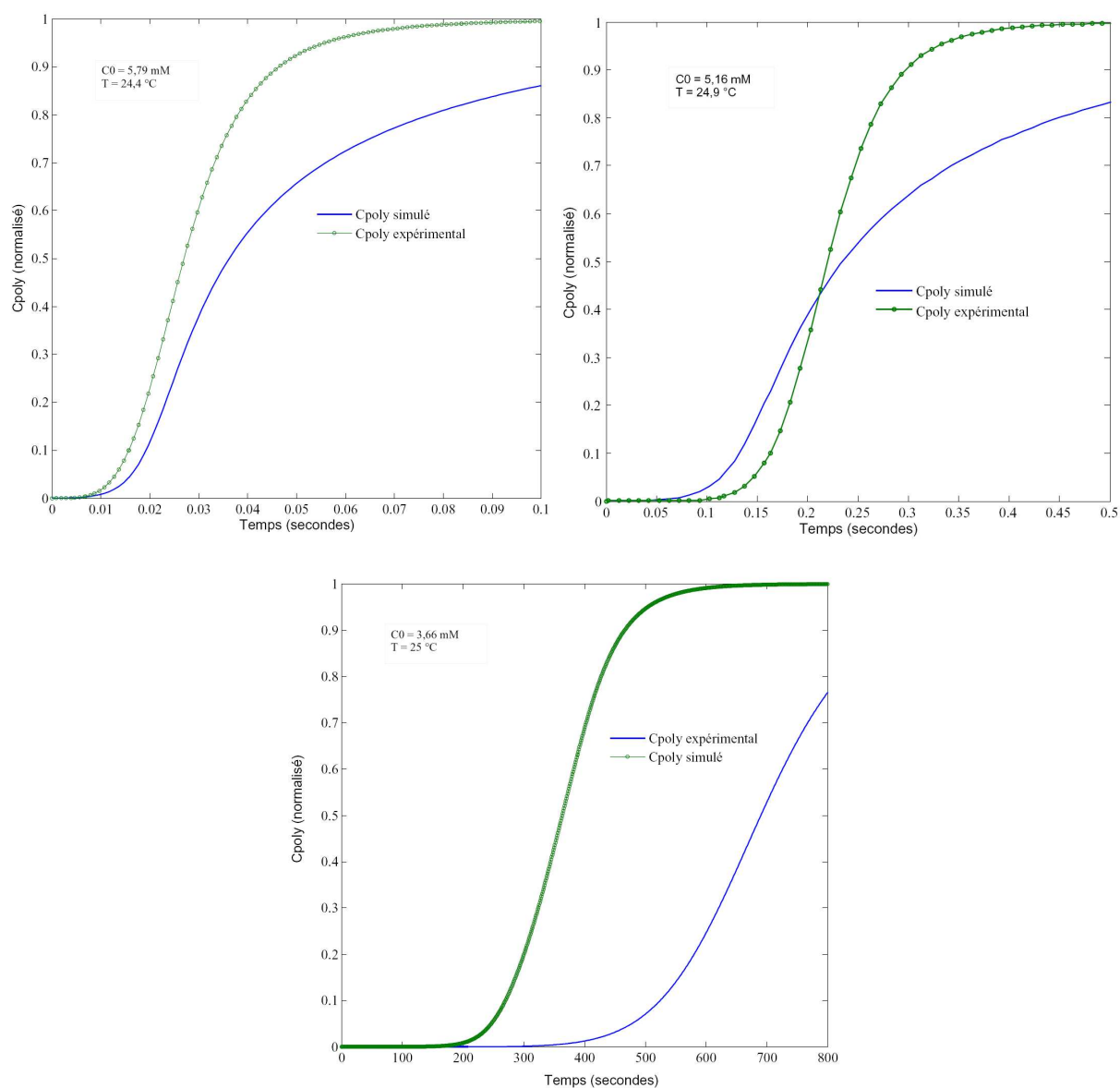


Figure 31
Comportement du modèle intégré (25°C) : dynamique d'évolution des polymères

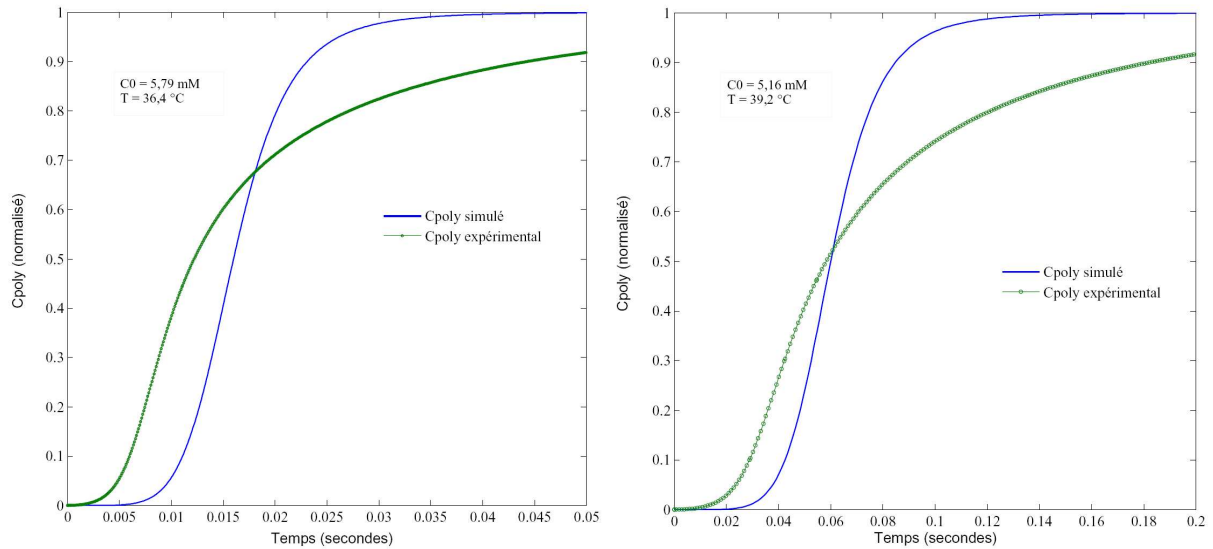


Figure 32
Comportement du modèle intégré (37 °C) : dynamique d'évolution des polymères

Le modèle III, « non-idéal, CPT », rend compte de la réalité biologique de façon bien plus satisfaisante que la version II (« big gamma »), dans laquelle la description de la non-idéalité se restreignait aux monomères (*via* γ) et aux noyaux hétérogène (*via* Γ ; cf. section VI-2-B).

Toutefois, les améliorations apportées au modèle intégré par la prise en compte des monomères et des fibres polymères par la théorie CPT, ne concernent pas toute la gamme de concentrations. En effet en-deçà de $\approx 3,9$ mM -et au moins à 25°C³⁸, j'observe un décalage quantitatif (écarts moyens $\approx 0,6-0,7$ et $td_ratio \leq 0,5$). Ce décalage se traduit par une augmentation considérable de l'indice de sigmoïdité (nH_sim), qui dépasse les valeurs de

³⁸ Le *corpus* expérimental ne contient pas de concentrations $< 4,14$ mM, pour la gamme « 37°C ».

références expérimentales (5-6), pour atteindre des valeurs importantes, *a priori* peu vraisemblables (23-129 ; cf. Tableau 7).

Tableau 7
Comportement quantitatif du modèle intégré

C₀ (mM)	T (°C)	Temps (s)	td_ratio (sim/exp)	nH_sim	nH_exp	Ecart (« rms »)
5,79	24,4	0,4	1,1	2,3	4,1	0,21
5,13	24,9	2	0,7	2,6	7,3	0,18
4,81	26,1	5	0,8	2,7	5,6	0,13
4,17	25,6	40	1,0	2,9	7,0	0,26
3,96	25,0	150	0,6	3,0	8,4	0,17
M±SEM*	n.a.	n.a.	0,84±0,09	2,7±0,1	6,5±0,7	0,19±0,02
3,66	25,0	1 200	0,5	<u>8,0</u>	7,7	<u>0,55</u>
3,52	25,0	12 000	0,3	<u>23</u>	4,9	<u>0,73</u>
3,38	25,0	50 000	0,5	<u>129</u>	8,3	<u>0,69</u>
6,10	32,4	0,10	1,2	2,2	4,0	0,26
5,79	36,4	0,15	0,3	2,1	6,0	0,20
5,46	35,1	0,40	0,37	2,3	6,8	0,26
5,13	39,2	0,30	0,6	2,3	6,4	0,18
4,17	37,1	8,0	1,1	2,6	6,5	0,39
4,17	40,7	10,0	1,1	2,4	6,4	0,42
M ± SEM**	n.a.	n.a.	0,78±0,16	2,3±0,1	6,0±0,4	0,29±0,04

*, moyennes et écarts calculés pour C₀ 3,96-5,79 mM (à « 25°C »). **, moyennes des 6 valeurs de la gamme « 37°C » ; n.a. non applicable. La colonne « Temps » correspond à la fenêtre temporelle dans laquelle se développent les données simulées et expérimentales.

VI-4. LE MODELE « DOMAINES »

VI-4-A. DU MODELE III VERS LE MODELE IV : DEMARCHE

Dans la partie précédente (VI-3), nous avons construit et présenté le modèle III (« non-idéal, deux classes, CPT »), qui considère deux classes de particules « encombrantes » (au sens macromoléculaire)³⁹. Nous avons montré que cette description affinée de la non-idéalité de la solution conduit à une amélioration considérable et significative des courbes simulées, par rapport aux courbes expérimentales. Toutefois, l'amélioration s'estompe et disparaît en-deçà de $C_0 \approx 4$ mM (voir Tableau 7, section précédente).

L'analyse approfondie du comportement du modèle III « non-idéal, deux classes, CPT » en fonction de C_0 nous a menés à formuler une hypothèse pouvant expliquer sa faillite aux faibles concentrations. Cette hypothèse est liée à l'absence de descripteur géométrique du processus de polymérisation. Pour justifier cette hypothèse, nous reprenons, dans le tableau 8, les principales grandeurs issues de simulations numériques du modèle III à 25°C :

- les concentrations des espèces (C , C_p , C_{poly}),
- les coefficients d'activité (γ , γ^{*+1} , Γ),
- la taille et la concentration des noyaux (i^* , j^* , C_{i^*} , C_{j^*})
- les vitesses d'élongation (v_{ELO}), homogène (v_{HON}) et hétérogène (v_{HEN}).

De façon générale, le modèle tend vers des limites numériques (et/ou physiques) à faible concentration (ici, 3,5 mM). Si l'on considère, par exemple, la vitesse homogène et la valeur de ses déterminants à 99 % de complétion, on constate que :

- la taille des noyaux, i^* , tend vers la limite imposée (225 vs. 272, cf. Chap. III, Matériel et méthodes), tandis que leur concentration, C_{j^*} , tend vers « 0 », et

³⁹ cf. équation générale AII-1, *Annexe II*.

- malgré l'augmentation du coefficient d'activité des noyaux activés, γ_{*+1} , vers 10^{308} (limite de Simulink©), la vitesse, v_{HON} , s'annule (10^{-308} ; (cf. éq. V-1, 1^{er} terme du membre de droite).

Si l'on compare les trois vitesses caractéristiques du modèle (élongation, homogène et hétérogène), on constate que l'élongation des fibres est numériquement la plus importante : $v_{ELO}(50\%) = 10^2$ à 10^{-2} mM/, tandis que $v_{HON}(init) = 10^{-2}-10^{-13}$ mM/s et $v_{HEN}(50\%) = 10^{-1}-10^{-8}$ mM/s (voir aussi figure 33).

Tableau 8
Principales variables et grandeurs du modèle III à 25°C

	C	t_{sim}	γ	i*	C_{i*}	γ_{*+1}	v_{HON}	j*	C_{j*}	Γ	v_{HEN}	C_p	v_{ELO}	C_{poly}
	mM	s	sd	sd	mM	sd	mM/s	sd	mM	sd	mM/s	mM	mM/s	mM
t0	5,8	0	120	3	3,7E-07	2,8E+08	1,2E-02	1	0	2,9E-04	0,0E+00	0,0E+00	0	0,0
mid*	4,4	0,027	63,6	4	3,2E-08	1,3E+08	4,2E-04	2	8,8E-02	4,6E-04	5,3E-01	9,8E-03	123	1,4
fin	3,1	0,042	33	6	2,7E-10	1,1E+08	1,3E-06	3	0,014	5,0E-04	3,4E-02	1,3E-02	54	2,7
t0	5,2	0	47	4	2,8E-08	7,8E+07	3,2E-04	2	0	4,3E-04	0,0E+00	0,0E+00	0	0,0
mid	3,8	0,194	25,7	6	3,30E-10	7,1E+07	1,6E-06	3	0,006	4,3E-04	1,3E-02	3,4E-03	14,4	1,3
fin	2,6	0,356	13,8	12	3,2E-15	1,4E+09	5,4E-12	7	1,0E-04	4,8E-05	8,7E-06	3,7E-03	4,2	2,6
t0	3,5	0	8	17	2,0E-15	1,0E+09	2,0E-13	10	0	5,0E-06	0	0,0E+00	0	0,0
mid	2,2	1410	14	14	6,8E-25	1,0E+18	1,0E-21	9	1,7E-05	1,4E-06	3,50E-08	1,2E-05	0,010	1,3
fin	0,8	1691	15	225	0	1,0E+308	1,0E-308	243	3,5E-21	2,5E-134	5,0E-152	1,3E-05	0	2,7

*, « mid » correspond au temps de simulation où C_{poly} vaut 50 % de sa valeur maximale ; « fin » correspond à 99 %.

NB : 1,0E+/-308 correspond à la limite de représentation des nombres dans Simulink©.

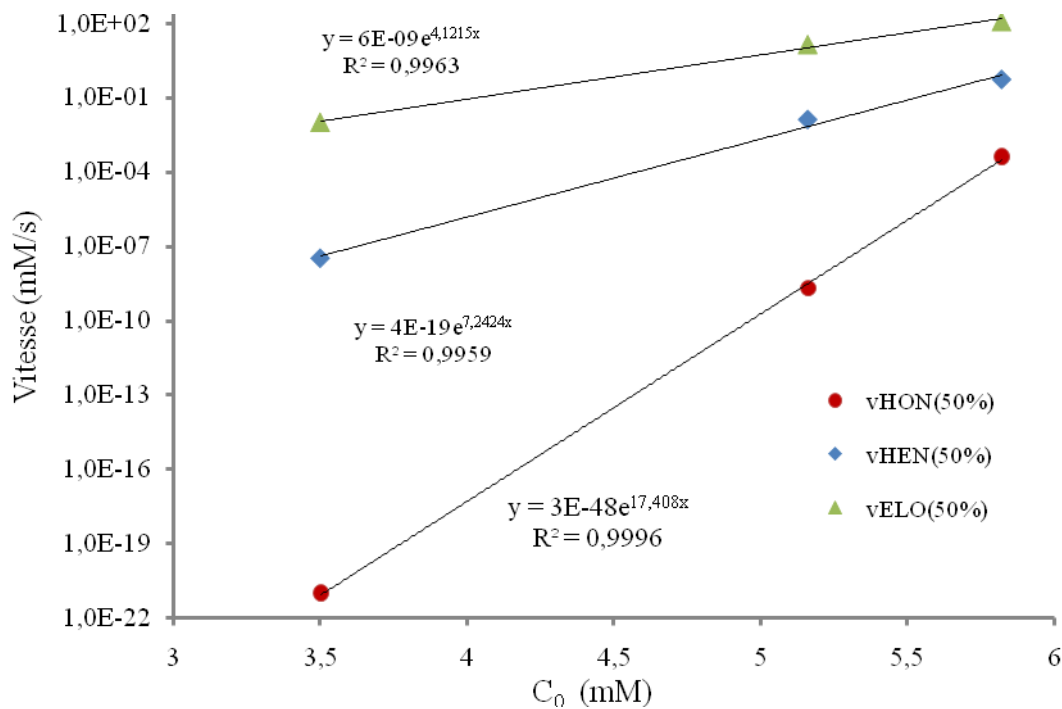


Figure 33
Vitesses du modèle (III) à 50% de complétion

Alors que la vitesse d'élongation des fibres, v_{ELO} , domine à toutes les concentrations, son *ratio* aux deux vitesses de nucléation, v_{HON} et v_{HEN} , évolue différemment avec celle-ci, comme le montre la figure 33 :

- à 5,8 mM, $v_{ELO}/v_{HON} = 3.10^5$ et $v_{ELO}/v_{HEN} = 2.10^2$
- à 3,5 mM, $v_{ELO}/v_{HON} = \mathbf{1.10^{19}}$ et $v_{ELO}/v_{HEN} = 3.10^5$

Autrement dit, plus la concentration diminue plus l'importance relative de l'élongation (qui conditionne C_{poly}) par rapport au processus **homogène** (et, dans une moindre mesure, hétérogène) augmente (ces deux processus conditionnant C_p). On peut donc calculer un nombre moyen de monomères polymérisés par fibre, C_{poly}/C_p et en déduire une longueur

moyenne de fibre⁴⁰. La figure 34 représente le résultat obtenu en fin de processus (99%), en fonction de C_0 (nb : l'axe vertical est en échelle logarithmique).

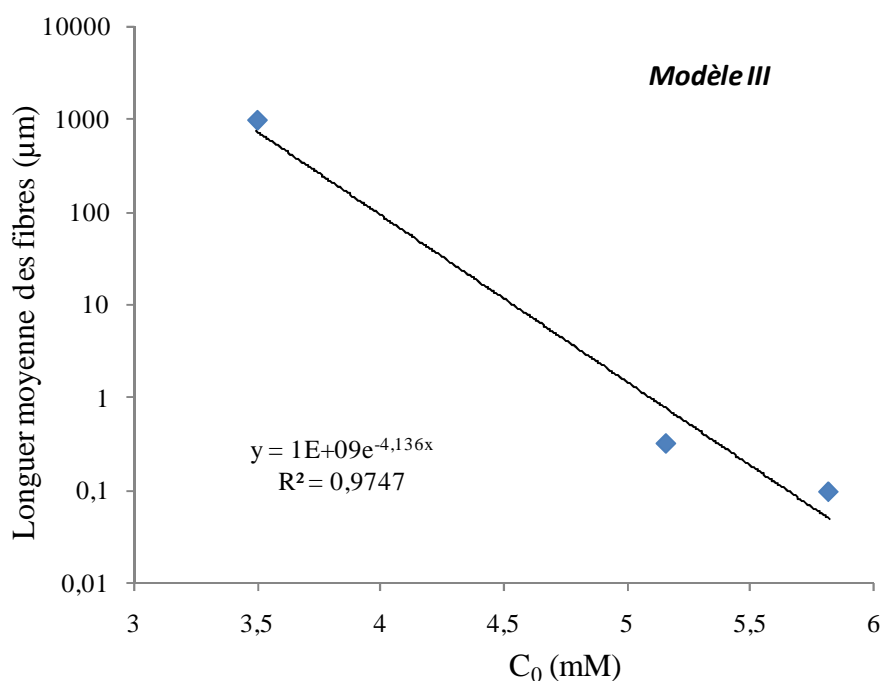


Figure 34
Longueur moyenne des fibres (25°C)

Il s'avère que la longueur moyenne des fibres produite par le modèle III est de $\approx 100 \mu\text{m}$ à 3,5 mM, tandis qu'elle est de de l'ordre de 0,1 μm (200-700 nm) à 5-6 mM. Or, c'est cette même longueur moyenne qui intervient dans les équations des coefficients d'activité CPT (γ_{*+1} et Γ ; voir Annexe II, variable l).

Expérimentalement, il a été montré qu'à forte concentration les domaines (donc les noyaux homogènes qui les ont engendrés) sont « nombreux » et de taille modeste, et inversement à faible concentration (voir [Christoph et coll. 2005]). Autrement dit, la

⁴⁰ L'opération consiste à (i) diviser le nombre de monomères par fibre (C_{poly}/C_p) par 14 (14 monomères par plateau de fibre polymère ; Chap. III), puis (ii) multiplier le résultat par le diamètre d'un monomère, soit 6,1 nm.

distribution de longueur de fibres des « petits » domaines, obtenus à forte concentration, est étroite car la majorité des fibres apparaît et s’allonge quasi-simultanément. Ce n’est pas le cas à faible concentration où la vitesse d’apparition des noyaux homogènes est suffisamment faible pour que les fibres précoces aient le temps de s’allonger davantage que les fibres tardives, ce qui entraîne des disparités de longueurs.

Etant donné que les équations CPT de γ , γ_{i+1}^* et Γ sont largement non-linéaires en l (ainsi qu’en v et C_p), l’utilisation de cette longueur moyenne à faible concentration ne paraît pas pertinente, voire erronée. Par contre, à forte concentration où les noyaux homogènes sont prépondérants (relativement aux faibles concentrations), cette approche semble justifiée⁴¹.

VI-4-B. LE MODELE « DOMAINES »

Dans le but d’affiner le modèle, et pour tenter de pallier la faillite du modèle précédent, nous avons, dans cette dernière partie du travail, développé une version « spatiale » du modèle dans laquelle :

- (i) la nucléation homogène et la nucléation hétérogène ne sont plus dégénérées en une variable « fibres » unique (C_p , voir éq. V-1), mais individualisées en $C_{p(homogène)}$ (d’origine homogène) et $C_{p(hétérogène)}$ (d’origine hétérogène),
- (ii) la « Solution » est caractérisée par un volume **fini**, dans lequel a lieu le processus de nucléation homogène (et les bilans de matière),
- (iii) les « Domaines » sont comptabilisés et ils sont caractérisés par leur propres nucléation hétérogène, fibres, élongation et coefficients d’activité.

⁴¹ L’examen du Tableau 8 met en évidence que le rapport C_j^*/C_i^* (une mesure du nombre de fibres hétérogènes par fibre homogène –donc par domaine) est $\approx 10^6$ à forte concentration, tandis que ce rapport est **10²⁰** à faible concentration.

Nota bene : Au cours de la phase exploratoire des (nombreuses !⁴²) versions d'essai de modèles « spatiaux » -avec individualisation des domaines, nous avons été fréquemment confrontés à des problèmes liés au temps de calcul et/ou à la puissance de calcul de l'ordinateur utilisé (plus particulièrement liés à la mémoire vive effective et à la gestion de cette mémoire par le logiciel Simulink© pour le stockage temporaire des valeurs)⁴³. C'est l'une des raisons pour lesquelles nous avons construit les deux versions du modèle « Domaines » (ou modèle IV) présentées ci-après : (i) une version « préliminaire », relativement moins sophistiquée, que nous avons utilisée pour accélérer les corrections, l'analyse et le développement (modèle IVa), et (ii) la version la plus aboutie de ce travail, le modèle IVb.

Les équations du modèle « domaines » : La mise en place des équations, ainsi que les paramètres spécifiques de ce modèle « Domaines » (versions IVa et IVb) est détaillée en *Annexe IV*.

Les hypothèses du modèle « domaines » : Les hypothèses et simplifications du modèle « domaines » (modèles IVa et b) se résument comme suit.

1. Les fibres polymères de HbS ne sont pas distribuées de manière uniforme dans la solution, mais elles sont localisées et organisées dans des structures appelées « domaines » ; les monomères libres sont répartis de façon isotrope dans la *solution*.
2. La *solution* est définie par son volume, par la concentration des monomères libres (C) et leur coefficient d'activité (γ), ainsi que par la concentration des noyaux homogènes

⁴² Entre février 2007 et mai 2008, période de réflexion et développement du modèle « domaines », nous avons évalué, utilisé (et sauvegardé) 10-12 versions « principales » ; les deux versions présentées ici sont l'aboutissement de ce long travail de maturation.

⁴³ De tels problèmes étaient totalement inexistantes avec les versions « O-D » (sans dimension) précédentes (modèles I, II et III –aussi bien leurs propres versions exploratoires, soit 2-3 par modèle finalisé)

(HON) ; le coefficient d'activité des HON activés, γ_{i+1} , est calculé à partir des propriétés (C , C_p et l) moyennées de la solution (cf. Annexe IV).

3. En *solution*, le nombre des futurs *domains* (HON activés, ou « proto-fibres ») est obtenu par intégration de la vitesse homogène, v_{HON} , suivie d'une discrétisation (arrondi à valeur entière)⁴⁴,
4. Chaque domaine est produit par la séquence suivante :
 - activation d'un noyau homogène (en *solution*), pour donner une « proto-fibre homogène »
 - élongation de celle-ci jusqu'à une longueur minimale requise (seuillage) pour que le processus de nucléation hétérogène puisse produire des noyaux sur cette proto-fibre => apparition d'un nouveau *domaine*
 - la nucléation hétérogène et l'élongation *locales* assurent la croissance de ce domaine.
5. Dans chaque domaine, les fibres hétérogènes sont comptabilisées (intégration de v_{HEN} locale), et allongées (v_{ELO} locale).
6. La concentration des monomères libres est supposée être la même, dans la solution ET dans tous les domaines ; cette hypothèse est basée sur le fait que la diffusion des monomères de HbS est plus rapide que leur polymérisation (élongation et nucléations).

⁴⁴ « Un » domaine est par définition représenté par un nombre entier.

VI-4-C. EVALUATION DU MODELE « DOMAINES »

Modèle « domaines » simplifié : Comparativement au *corpus* expérimental exploité, la version IVa, « simplifiée », du modèle « domaines » fournit les résultats qui sont résumés dans le tableau 9. En raison des difficultés liées au temps de calcul et/ou à la mémoire vive disponible sur le micro-ordinateur utilisé, nous avons restreint l'analyse aux concentrations inférieures ou égales à 4,17 mM (et à « 25 °C »)⁴⁵.

Tableau 9
Comportement quantitatif du modèle « domaines » simplifié, IVa

C₀ (mM)	T (°C)	Vs (fl)	td_ratio (sim/exp)	nH_ratio (sim/exp)	Ecart (« rms »)	#domaines/#fibres (à 99 %)
4,17	25,6	452	<u>0,02</u>	0,38	0,37	106 / 38770
3,96	25,0	337	<u>0,07</u>	0,95	0,33	12 / 8084
M±SD^a	n.c.	n.c.	<u>0,04±0,04</u>	0,5±0,6	0,35±0,03	n.c.
3,66	25,0	337	<u>2</u>	<u>2.10⁵</u>	<u>0,46</u>	1 / 1618
3,52	25,0	337	<u>5</u>	<u>10³</u>	<u>0,77</u>	1 / 1210
3,38	25,0	337	<u>97</u>	<u>40</u>	<u>0,69</u>	1 / 931
M±SD^b	n.c.	n.c.	<u>35±50</u>	<u>10⁵±10⁵</u>	<u>0,64±0,11</u>	n.c.
4,17	37,1	452	0,27	0,38	0,33	920 / 77790
4,17	40,7	452	<u>0,01</u>	0,35	0,32	1678 / 59340
M ± SD^c	n.c.	n.c.	<u>0,2±0,1</u>	0,36±0,03	0,33±0,01	n.c.

^{a, b, c} : moyennes et écarts-types (SD) calculés pour « 25°C » (3,96-4,17 mM), « 25°C » (3,38-3,66 mM) , et « 37°C » (4,17 mM), respectivement; n.c. non calculé. Les valeurs considérées comme « erronées/inacceptables » sont soulignées.

⁴⁵ Par exemple à 4,17 mM (0,269 g/ml) il est nécessaire d'initialiser dans Matlab© la variable qui représente le nombre maximal de domaines (« d ») du modèle à 2-3000 (dans ces conditions, le temps de calcul pour atteindre 99 % de la réaction est supérieur à 2h, avec de plus des saturations de la mémoire qui imposent des coupes-sombres dans le modèle –liés à l'affichage et à l'enregistrement, interdisant une analyse complète du modèle) ; à la concentration immédiatement supérieure dans le corpus expérimental (4,81 mM, soit 0,31 g/ml), « d » doit être initialisé à 6-8000, condition totalement « rédhibitoire » dans notre contexte.

Les figures 36a, 36b et 36c illustrent les résultats obtenus à 3,52, 3,66 et 3,96 mM, respectivement. L'examen du Tableau 9 montre que ce modèle domaine, dans sa version simplifiée (IVa) ne représente pas de gain par rapport au modèle III⁴⁶. Par exemple, si on compare les données à celles du Tableau 7 (section précédente), on constate que non seulement les critères ne sont pas améliorés entre 3,4 et 3,7 mM (« faibles concentrations »), mais que deux d'entre eux sont quantitativement dégradés (la déviation quadratique moyenne « rms » restant élevée, en l'occurrence proche de $\approx 0,6$) :

- le rapport des temps de latence passe de 0,3-05 à ≈ 35 !
- l'indice de sigmoïdité s'accroît considérablement, le rapport sim/exp augmentant de ≈ 10 (modèle III) vers 10^5 (modèle IVa).

Néanmoins, nous avons remarqué qu'à ces faibles concentrations, les courbes simulées sont déplacées à droite des courbes expérimentales (c'est-à-dire que le modèle IV est ralenti relativement au modèle III, cf. Tableau 7).

Nous avons également reporté dans le Tableau 9 le nombre de domaines et le nombre de fibres obtenus en fin de processus (à 99 % de C_{poly}). La figure 35 suivante résume les résultats obtenus avec les conditions du *corpus* expérimental utilisé, dans la gamme « 25°C » et entre 3,4 et 4,2 mM. Comme il était attendu, le nombre de domaines produits augmente avec la concentration initiale de monomères d'HbS⁴⁷. Il est à noter enfin que la température augment considérablement le nombre de domaines : à 4,17 mM, la seule concentration testée dans la gamme « 37 °C » (37,1 et 40,7 °C), le nombre de domaines est multiplié par ≈ 30 , tandis que le nombre de fibres est multiplié que par ≈ 3 .

⁴⁶ Le but, au moins initial, de ce modèle domaine était de tenter d'améliorer le comportement quantitatif par rapport au modèle III aux faibles concentrations (cf. section VI-4-A. et Tableau 8). C'est pourquoi, au vu des difficultés informatiques nous n'avons pas détaillé le comportement du modèle IVa aux concentrations supérieures à 4,17 mM .

⁴⁷ Nous avons vérifié la réponse (sensibilité) du modèle à des modifications de Vs : par exemple entre 250 et 500 fl, à l'exception triviale du nombre de domaines et du nombre de fibres (qui varient linéairement avec le volume !), aucun de nos trois critères d'évaluation ne sont significativement modifiés (résultats non représentés).

En conclusion, la version simplifiée du modèle « domaines », n'améliore pas les performances quantitatives de notre modèle dynamique (modèle III). Nous avons donc, dans une dernière étape, tenté d'affiner encore la description des domaines et de la solution. La démarche que nous avons suivie pour cette ultime déclinaison du modèle est explicitée en détail en *Annexe IV*.

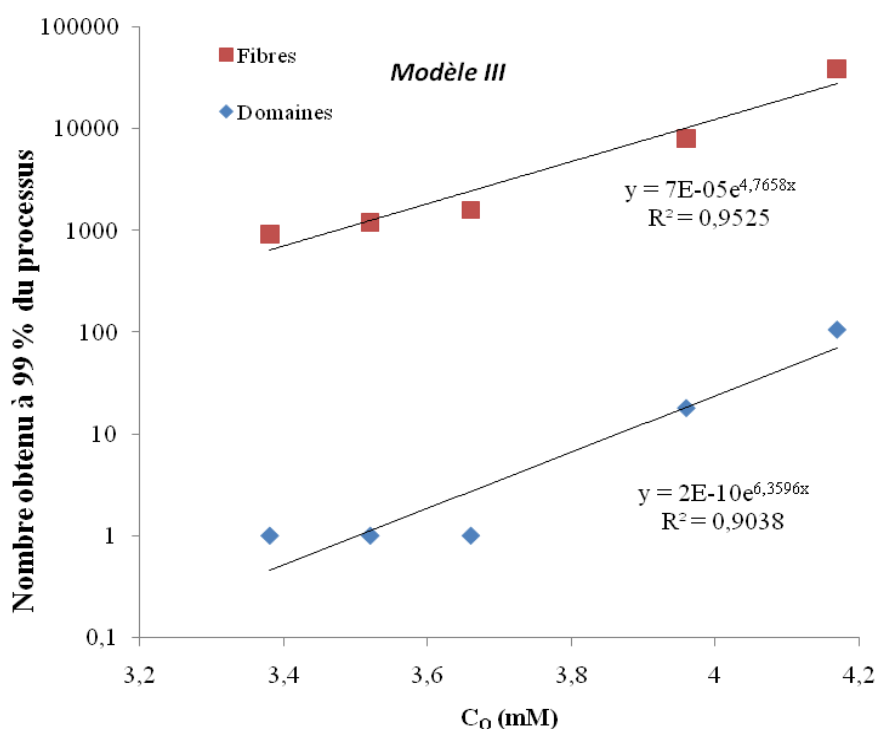
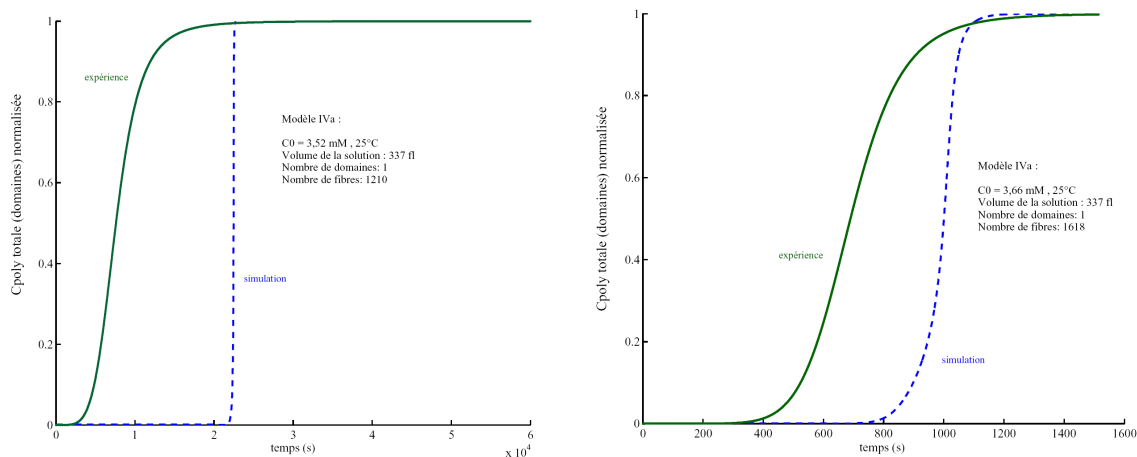


Figure 35

Nombre de domaines et nombre de fibres du modèle IVa (25°C)



Figures 36a (gauche) et 36b (droite)
 Modèle « domaines » simplifié (3,52 et 3,66 mM, 25°C)

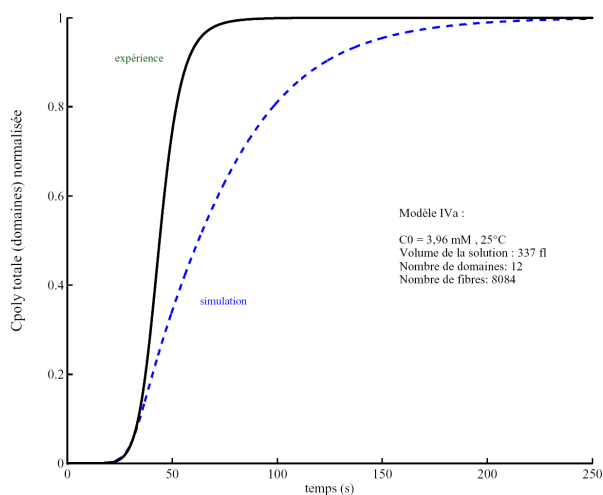


Figure 36c
 Modèle « domaines » simplifié (3,96 mM, 25°C)

Modèle « domaines » détaillé : Nous avons tenté d'améliorer la description individuelle des domaines. Essentiellement, le modèle détaillé, IVb, se différencie du modèle simplifié par le fait que chacun des domaines possède (non seulement un processus hétérogène et une vitesse d'élongation locale) mais également (voir *Annexe IV*) :

- une concentration propre de fibres, $C_{p_tot_dom}$
- une longueur moyenne propre de fibres, l_m_dom
- des paramètres B de non-idéalité et un coefficient Γ qui lui sont propres.

Nota bene : Pour les raisons de temps de calcul et/ou de mémoire vive déjà évoquées, le modèle IVb n'a pu être simulé avec le micro-ordinateur utilisé jusqu'ici (un portable Dell Latitude©, Intel Pentium R 1, 6 GHz, 1 Go RAM, avec Windows XP SP2). Les simulations que nous avons effectuées l'ont été sur une station de calcul Precision PWS690, Dell© (Intel Xeon CPU, double processeur 5110 @1,60GHz X2, 8Go RAM). Cette station est installée dans l'unité Inserm U927, Poitiers, avec MatlabR2007b, sous Windows Vista Edition Intégrale.

Avec cette configuration informatique, nous avons simulé le modèle IVb, aux conditions présentées dans le Tableau 9⁴⁸. Les résultats obtenus n'ont pas apporté d'améliorations significatives par rapport au modèle IVa. En effet, dans la gamme « 25°C » :

- à « 4 mM » ($n = 2 : 3,96$ et $4,17$), le rapport moyen des indices de sigmoïdité est de $0,35 \pm 0,05$ ($nH_sim = 3,0 \pm 0,2$), et l'écart moyen est de $0,26 \pm 0,06$;
- aux concentrations inférieures à 3,96 mM (3,4-3,7), le comportement est identique à celui du modèle simplifié, c'est-à-dire que la sigmoïdité « explose » vers des valeurs dans la gamme 50-120 ($rms > 0,5$).

Les mêmes observations sont faites à la température de « 37°C » (4,17 mM ; résultats non présentés).

⁴⁸ Les temps de simulation sont de l'ordre de la minute (pour $C_0 < 4,2$ mM, soit un nombre maximal de domaines, $d = 500$, à 25°C).

VI-5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi, K. and T. Asakura (1982). "Effect of liganded hemoglobin S and hemoglobin A on the aggregation of deoxy-hemoglobin S." J Biol Chem 257(10): 5738-44.
- Bishop, M. F. and F. A. Ferrone (1984). "Kinetics of nucleation-controlled polymerization. A perturbation treatment for use with a secondary pathway." Biophys J 46(5): 631-44.
- Boublik, T. (1974). "Statistical thermodynamics of convex molecule fluids." Molecular Physics 27: 1415-1427.
- Cao, Z. and F. A. Ferrone (1996). "A 50th order reaction predicted and observed for sickle hemoglobin nucleation." J Mol Biol 256(2): 219-22.
- Cao, Z. and F. A. Ferrone (1997). "Homogeneous nucleation in sickle hemoglobin: stochastic measurements with a parallel method." Biophys J 72(1): 343-52.
- Christoph, G. W., J. Hofrichter and W. A. Eaton (2005). "Understanding the shape of sickled red cells." Biophys J 88(2): 1371-6.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1990). "Sickle cell hemoglobin polymerization." Adv Protein Chem 40: 63-279.
- Ferrone, F. A. (2004). "Polymerization and sickle cell disease: a molecular view." Microcirculation 11(2): 115-28.
- Ferrone, F. A. (2006). "Nucleation: the connections between equilibrium and kinetic behavior." Methods Enzymol 412: 285-99.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985a). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. I. Studies using temperature-jump and laser photolysis techniques." J Mol Biol 183(4): 591-610.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985b). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism." J Mol Biol 183(4): 611-31.
- Ferrone, F. A., M. Ivanova and R. Jasuja (2002). "Heterogeneous nucleation and crowding in sickle hemoglobin: an analytic approach." Biophys J 82(1 Pt 1): 399-406.
- Ferrone, F. A. and M. A. Rotter (2004). "Crowding and the polymerization of sickle hemoglobin." J Mol Recognit 17(5): 497-504.
- Galkin, O. and P. G. Vekilov (2004). "Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia hemoglobin in deoxy state." J Mol Biol 336(1): 43-59.

- Guttman, H. J., C. F. Anderson and M. T. Record, Jr. (1995). "Analyses of thermodynamic data for concentrated hemoglobin solutions using scaled particle theory: implications for a simple two-state model of water in thermodynamic analyses of crowding in vitro and in vivo." Biophys J 68(3): 835-46.
- Hofrichter, J. (1979). "Ligand binding and the gelation of sickle cell hemoglobin." J Mol Biol 128(3): 335-69.
- Hofrichter, J. (1986). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. III. Nucleation rates determined from stochastic fluctuations in polymerization progress curves." J Mol Biol 189(3): 553-71.
- Ivanova, M., R. Jasuja, S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2000). "Nonideality and the nucleation of sickle hemoglobin." Biophys J 79(2): 1016-22.
- Marden, M. C., J. Kister, B. Bohn and C. Poyart (1988). "T-state hemoglobin with four ligands bound." Biochemistry 27(5): 1659-64.
- Medkour, T., F. Ferrone, F. Galacteros and P. Hannaert (2008). "The Double Nucleation Model for Sickle Cell Haemoglobin Polymerization: Full Integration and Comparison with Experimental Data." Acta Biotheor.
- Minton, A. P. (1977). "Non-ideality and the thermodynamics of sickle-cell hemoglobin gelation." J Mol Biol 110(1): 89-103.
- Mirchev, R. and F. A. Ferrone (1997). "The structural link between polymerization and sickle cell disease." J Mol Biol 265(5): 475-9.
- 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." Proc Natl Acad Sci U S A 90(11): 5039-43.
- Prouty, M. S., A. N. Schechter and V. A. Parsegian (1985). "Chemical potential measurements of deoxyhemoglobin S polymerization. Determination of the phase diagram of an assembling protein." J Mol Biol 184(3): 517-28.
- Rao, M. J., A. Malavalli, B. N. Manjula, R. Kumar, M. Prabhakaran, D. P. Sun, N. T. Ho, C. Ho, R. L. Nagel and A. S. Acharya (2000). "Interspecies hybrid HbS: complete neutralization of Val6(beta)-dependent polymerization of human beta-chain by pig alpha-chains." J Mol Biol 300(5): 1389-406.
- Ross, P. D., R. W. Briehl and A. P. Minton (1978). "Temperature dependence of nonideality in concentrated solutions of hemoglobin." Biopolymers 17(9): 2285-8.
- Ross, P. D., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1977). "Thermodynamics of gelation of sickle cell deoxyhemoglobin." J Mol Biol 115(2): 111-34.

- Ross, P. D. and A. P. Minton (1977). "Analysis of non-ideal behavior in concentrated hemoglobin solutions." J Mol Biol 112(3): 437-52.
- Rotter, M., A. Aprelev, K. Adachi and F. A. Ferrone (2005a). "Molecular crowding limits the role of fetal hemoglobin in therapy for sickle cell disease." J Mol Biol 347(5): 1015-23.
- Rotter, M. A., S. Kwong, R. W. Briehl and F. A. Ferrone (2005b). "Heterogeneous nucleation in sickle hemoglobin: experimental validation of a structural mechanism." Biophys J 89(4): 2677-84.
- Roufberg, A. and F. A. Ferrone (2000). "A model for the sickle hemoglobin fiber using both mutation sites." Protein Sci 9(5): 1031-4.
- Samuel, R. E., E. D. Salmon and R. W. Briehl (1990). "Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin." Nature 345(6278): 833-5.
- Szabo, A. (1988). "Fluctuations in the polymerization of sickle hemoglobin. A simple analytic model." J Mol Biol 199(3): 539-42.
- Vekilov, P. G. (2007). "Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia?" Br J Haematol 139(2): 173-84.
- Zimmerman, S. B. and A. P. Minton (1993). "Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences." Annu Rev Biophys Biomol Struct 22: 27-65.

CHAPITRE VII

Discussion

VII-1. PREAMBULE A LA DISCUSSION

VII-2. SYNOPSIS DE L'EVOLUTION DES MODELES I à IV

VII-3. MODELES I-III

VII-3-A. ANALYSE

VII-3-B. TRANSITION MODELE II A III

VII-4. MODELE IV ET DOMAINES

VII-5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VII-6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VII-1. PREAMBULE A LA DISCUSSION

Dans le cadre d'un projet de biologie intégrative, défini au niveau physiopathologique de la drépanocytose, et ciblant à terme une application clinique (projet Drépasim), la description précise et dynamique du processus physico-chimique de polymérisation de HbS est une étape indispensable. En nous basant sur l'hypothèse de la double nucléation et sur le modèle du même nom [Ferrone et coll. 1985] nous avons développé le projet présenté ici. Outre la mise à jour, la vérification et la correction du modèle initial, ainsi que l'implémentation avec un outil dédié à la modélisation-simulation des systèmes complexes (Simulink©), l'originalité du travail réalisé résident dans :

- l'intégration numérique du modèle différentiel exact, pour obtenir une dynamique complète du processus,
- l'évaluation quantitative par comparaison aux données expérimentales, sur la base de trois critères différents,
- l'amélioration des modèles construits par la prise en compte progressivement détaillée de la non-idéalité des solutions polymérisantes de HbS, et enfin par une spécification préliminaire des aspects spatiaux, *via* les domaines de polymères de HbS.

Nous avons précisé en *Introduction* que l'hypothèse d'un mécanisme à deux voies, homogène et hétérogène, pour la polymérisation et le développement des fibres de HbS a été amplement confirmé expérimentalement. Elle est donc admise. De même, le modèle de double nucléation *initial* est accepté et validé. Pour autant, celui-ci a été validé exclusivement dans les dix premiers pourcents du processus, avec une version linéarisée et statique du système différentiel. Par ailleurs, les modifications apportées au modèle entre 1985 et 2005, par ses créateurs n'ont été ni rassemblées ni testées en une version complète, mise à jour, et

dynamique du modèle¹. En conséquence, dans la perspective intégrative et dynamique du projet global, la pertinence et la fiabilité du *modèle de base* de double nucléation de la polymérisation de HbS étaient inconnues.

Notre motivation originelle était basée sur l'hypothèse que l'intégration numérique, sur toute la dynamique, du système différentiel constituerait une base de développement pour aborder « rapidement » l'influence des effecteurs physiopathologiques de la polymérisation – oxygénation et HbF en tout premier lieu². Avec cette idée directrice, nous avons implémenté et intégré le modèle de base de double nucléation. Durant cette étape, nous avons observé que diverses erreurs et incomplétudes entraînaient des dysfonctions ou des aberrations dans le comportement du modèle, y compris en dynamique. Après les (longues et) nécessaires corrections et vérifications, incluant la dérivation algébrique des différentes équations, nous avons pu disséquer le comportement du modèle assaini en dynamique.

L'intégration numérique exacte que nous avons réalisée du modèle de base établi clairement que celui-ci n'est pas en mesure de reproduire les courbes expérimentales de progression de la polymérisation de HbS, et qu'il requiert d'être complété et/ou amélioré. Dans la mesure où il n'est pas envisageable d'aborder la modélisation du niveau érythrocytaire³ sans une description réaliste de l'agrégation, nous avons été progressivement conduits à redéfinir le projet pour en refocaliser l'objectif sur le niveau physico-chimique et moléculaire de la polymérisation.

¹ Non plus que la définition et/ou la présentation/compilation des valeurs numériques de nombreux paramètres du modèle.

² Ceux-ci constituant avec la concentration de Hb et la température, des facteurs primordiaux de la variabilité interindividuelle observée en clinique (voir Chap. II et III)

³ Ni, *a fortiori* (i) la cyto-rhéologie (viscosité, déformabilité, morphologie), et (ii) le niveau microvasculaire (hémodynamique locale, interactions cellulaires et adhésions, etc...)

VII-2. SYNOPSIS DE L'EVOLUTION DES MODELES I à IV

Avant d'aborder la discussion proprement dite des apports des différents modèles présentés dans ce mémoire, il est utile d'en revoir ici les caractéristiques principales et les raisons de leur évolution. Depuis le modèle de *Base* (modèle I, section VI-1), jusqu'au modèle « Domaines » (modèle IV), le Tableau 10 décrit les caractéristiques principales de ceux-ci, en termes d'encombrement macromoléculaire et de non-idéalité de la solution.

Dans le modèle de *Base*, seuls sont pris en compte les monomères pour décrire la non-idéalité de la solution, avec la théorie SPT (« Scaled Particle Theory »). Le modèle II constitue notre version corrigée et mise à jour du modèle de double nucléation, avec l'application d'une théorie plus détaillée et plus performante de la non-idéalité, la CPT, qui permet de traiter les solutions composées de particules dissemblables et convexes (« Convex Particle Theory »). Du point de vue de la non-idéalité, il faut observer que dans ce modèle II :

- (i) la CPT est appliquée au seul le noyau hétérogène (HEN), au travers du coefficient Γ^4 , et
- (ii) le seul monomère est considéré comme espèce macromoléculaire contribuant à l'encombrement de la solution.

Or, au cours de la progression de la polymérisation de HbS :

- les monomères sont consommés (et non pas statiques à C_0),
- ils sont convertis progressivement en fibres polymères, dont la forme et l'encombrement induit (dans la solution) ne sont PAS équivalents.

En ce qui concerne ce dernier point en effet, (i) les fibres polymères peuvent, en première approximation, être assimilées à des cylindres (voir Chap. III), (ii) la densité du polymère ($\approx 0,69 \text{ cm}^3/\text{g}$) est telle que le volume occupé par un nombre donné de monomères ($\approx 0,79$

⁴ rapport du coefficient d'activité de la fibre polymère « nue » à celui de la fibre sur laquelle est fixé un HEN

cm³/g) est inférieur d'environ 15% à celui d'un polymère constitué d'un nombre équivalent de monomères.

Tableau 10

*Caractéristiques des modèles :
non-idéalité d'encombrement macromoléculaire et théorie utilisée*

Modèle	Caractéristiques principales	Coefficient du modèle pour		
		Monomères libres de HbS : γ	Noyaux homogènes : γ^{*+I}	Noyaux hétérogènes et fibres : Γ
I : Base	Une classe de particules: Monomères libres	oui (SPT)	oui (SPT)	Non ($\Gamma=1$)
II : Non-idéal, Γ	Idem I + Classe des HEN implicites* (et monomères dominants)	oui (SPT)	oui (SPT)	oui (CPT)
III : Non-idéal, 2 classes	Idem II + Deux classes explicites : monomères libres et fibres polymères	oui (CPT)	oui (CPT)	oui (CPT)
IV : Domaines	Idem III + Prise en compte des domaines individuels	oui (CPT)	oui (CPT)	oui (CPT)

(SPT) et (CPT) spécifient la théorie utilisée pour décrire la non-idéalité de la solution. *, HEN = noyaux hétérogènes : dans les modèles II, III et IV, HEN est une « classe » implicite de particules (prise en compte dans Γ cf. section VI-2).

Nous avons donc décidé de modifier le modèle II en conséquence. Dans le modèle III, nous avons défini deux classes de macro-particules « encombrantes » (cf. *Annexe II*) :

- la classe « monomère », qui reste, quantitativement, l'espèce principale à toutes les concentrations initiales, y compris en dynamique et jusqu'à la solubilité (\approx 2,8-3,3 mM, selon la température),
- la classe « fibre », considérée comme cylindrique représentant les polymères (cf. [Zimmerman and Minton 1993; Minton 2001; Hall and Minton 2004]).

Puis, nous avons étendu l'application de la CPT, avec ces deux classes dynamiques, au calcul des coefficient d'activité des autres particules « réactantes » de la solution polymérisante⁵, c'est-à-dire :

- le coefficient d'activité (γ) du monomère libre,
- le coefficient d'activité (γ_{*+l}) du noyau homogène activé, ainsi que
- le rapport Γ (cf. plus haut).

Les modèles I à III sont des modèles adimensionnels (définis par la concentration des espèce, variable intensive). Mais les expérimentalistes observent que les polymères de HbS sont le plus souvent organisés en structures spatiales caractéristiques, les domaines –y compris dans l'érythrocyte, (cf. [Mickols et coll. 1988; Corbett et coll. 1995; Christoph et coll. 2005]). C'est pourquoi nous avons, pour terminer, décliné le modèle III en une version « spatiale » qui individualise les domaines de façon exploratoire, le modèle IV.

VII-3. MODELES I-III

Pour l'essentiel, les modèles I-III constituent –séquentiellement :

- (i) l'implémentation la correction, et la vérification du modèle de base (modèle I),
- (ii) la mise à jour exhaustive et l'implémentation de l'effet de la température comme variable continue, ainsi que l'application de la non-idéalité au noyau hétérogène (modèle II), et
- (iii) l'extension, dynamique, de la non-idéalité aux autres réactants par la définition de deux classes de particules « encombrantes » (modèle III).

⁵ La dérivation des équations correspondantes est détaillée en *Annexe II*.

VII-3-A. ANALYSE

Mathématiquement, le modèle de double nucléation est un système d'équations différentielles ordinaires (EDO), à deux variables d'état C , la concentration des monomères libres d'HbS et C_p , la concentration des fibres polymères. Ces deux variables sont couplées *via* une équation algébrique qui produit la troisième variable requise pour décrire la polymérisation (et pour comparer les simulations aux expériences de paillasse), à savoir C_{poly} , la concentration des monomères inclus dans les polymères. Toutefois, la gestion, la simulation et l'évaluation du modèle de double nucléation (même dans sa version de base) est rendue particulièrement délicate par le fait que les « paramètres » définissant les équations principales (EDO et bilan) ne sont pas des constantes, mais des fonctions non-linéaires des variables d'état.

Les processus de nucléation, homogène (HON) et hétérogène (HEN), génèrent des fibres (C_p) par addition (« activation ») d'un monomère au noyau critique (i^* et j^* , respectivement), tandis que le processus d'*élongation* diminue la concentration des monomères libres en solution, par l'addition de monomères à ces mêmes fibres. Les monomères polymérisés sont calculés comme la différence entre la concentration initiale (C_0) et la concentration dynamique de monomères C , et le processus s'arrête lorsque l'activité (et non pas la concentration !) des monomères libres est égale à l'activité des monomères à la solubilité de HbS.

Dans cette construction, le facteur limitant est la concentration des noyaux HON et HEN, concentration qui dépend directement de leur taille critique *via* la concentration des monomères. Or, cette taille critique est directement conditionnée par le compromis thermodynamique qui s'établit entre l'énergie (rotationnelle et translationnelle) *perdue* et l'énergie de stabilisation *gagnée*, par les monomères quand ils passent de l'état libre en solution à l'état agrégé dans le noyau. Plus la concentration est élevée, plus les noyaux

critiques sont constitués d'un petit nombre de monomères, et *vice-versa* (cf. figures 24a et 24b). S'il semble possible qu'un agrégat⁶, supposé compact, de taille $\approx 1-15$ unités (4,5-6,0 mM) voire $\approx 20-30$ (3,5-4,5 mM), puisse se former et constituer le point de départ pour la croissance d'une fibre, cela semble peu vraisemblable pour des agrégats de taille supérieure à ≈ 60 unités (rappel : la fibre polymère de HbS est structurée en plateaux superposés de 14 monomères chacun). Ceci suggère fortement que les agrégats nucléaires de forte taille (dont le modèle et la thermodynamique statistique postulent l'existence) doivent *a minima* se réorganiser de façon à constituer véritablement une « proto-fibre » (en élongation). Nous pensons que cette difficulté « conceptuelle » est l'une des causes des échecs répétés que nous avons rencontrés avec nos différentes versions du modèle de double nucléation aux « faibles concentrations (< 4 mM).

Un problème apparenté au précédent est soulevé, dans le cas de la nucléation hétérogène, par la notion de taille maximale (j_{max}) au-delà de laquelle la surface de contact (et en conséquence l'énergie de fixation) entre le noyau HEN et la fibre cible n'augmente plus. Si des noyaux HEN de taille supérieure à 30-50 unités existent et sont susceptibles⁷ de générer une nouvelle fibre, il est vraisemblable qu'eux aussi doivent se réorganiser pour s'adapter à la fibre, contrairement à l'hypothèse de taille HEN maximale. Enfin, dans cette même ligne de vue, en accord avec les observations expérimentales [Eaton and Hofrichter 1990; Samuel et coll. 1990; Jones et coll. 2003], la fibre HEN croît, au moins pendant un certain temps le long de la fibre qui l'a engendrée (« zippering »): la stabilisation énergétique et/ou l'accélération cinétique probable(s) qui en résulte(n)t ne sont pas pris en compte dans le modèle (non plus que la désolidarisation ultérieure).

⁶ Sans différencier HON de HEN pour ce raisonnement

⁷ Et s'ils ont, ainsi que l'on peut le postuler, une forme approximativement « compacte » en solution

Ces aspects devront être abordés pour que le modèle parvienne à décrire correctement la polymérisation résiduelle à l'approche de la solubilité de HbS, ainsi que le processus de nucléation hétérogène.

Pour quantifier les performances de nos modèles, nous avons comparé les simulations aux données expérimentales (*corpus* exploité dans la section Résultats). La première observation est que le modèle I dynamique reproduit la caractéristique expérimentale majeure de la polymérisation de HbS, le temps de latence, sur toute la gamme testée de concentrations et de température (par exemple, voir figures 26, et 27a et 27b). Cette caractéristique est préservée par nos modèles II (Medkour et al., 2008) et III. Ainsi, le rapport du temps de latence simulé au temps de latence expérimental (*td_ratio*) est-il proche de l'unité (cf. *Annexe I*, « Table 2 »). Ce résultat n'est pas surprenant en soi, puisque la version *linéarisée* (autour de t_0) du modèle initial se comporte ainsi [Ferrone et coll. 1985].

Dans notre optique dynamique, l'observation la plus pertinente est que le modèle de base intégré (modèle I et modèle II natif -cf. *Annexe I*) ne reproduit pas les courbes expérimentales. En effet, la sigmoïdité simulée –donc l'autocatalyse, s'avère très inférieure aux valeurs expérimentales ($\approx 1,2$ par rapport à 5,8 ; voir figures 27a et b), et l'écart moyen est de l'ordre de 0,5-0,6.

Le modèle initial est basé sur un jeu de cinq paramètres « principaux » (cf. Tableau 2, Chap. V). L'analyse de sensibilité à ces paramètres nous a montré que (cf. Tableau 4, *Résultats*):

- (i) le modèle est relativement peu sensible à ces paramètres à forte concentration, alors qu'il l'est davantage aux faibles,
- (ii) le modèle est particulièrement sensible aux trois paramètres qui décrivent l'énergétique de fixation du noyau hétérogène,

- (iii) en moyenne que la sensibilité du temps de latence s'avère environ deux fois inférieure ($\approx 20\%$) à celle de la concentration des polymères formés ($\approx 10\%$; Tableau 4); le temps de latence étant reproduit aussi bien par le modèle complet que par la version linéaire, ceci constitue un premier indice que le jeu de paramètres, tel qu'il est défini n'est pas adapté à la nature dynamique du processus.

Cette analyse nous a permis de réaliser une évaluation quantitative du modèle (II) dynamique et de montrer que l'ajustement numérique des deux paramètres principaux de la nucléation hétérogène améliore significativement la reproduction des courbes, tout en conservant le temps de latence (Medkour et al., 2008). Pour terminer, disons que, par elle-même et en conjonction avec l'argumentaire développé dans la section suivante, ces observations attestent encore de la nécessité d'améliorer la description de la nucléation hétérogène.

VII-3-B. TRANSITION DU MODELE II AU MODELE III

Malgré l'utilisation de la CPT pour le noyau hétérogène, le modèle II s'avère insatisfaisant, comme le montre l'examen du tableau 2 de (Medkour et al., 2008), en *Annexe I*.

L'une des caractéristiques frappantes –souvent « ignorée » des biologistes, du milieu intracellulaire (voire des solutions visant à le reproduire) est l'encombrement macromoléculaire et la non-idéalité des comportements cinétiques et thermodynamique qui en résulte (voir *Introduction, Matériel et méthodes* et *Annexe II*). En raison de leur dimensions réelles, les particules en solution ne peuvent être réduites à un point « idéal » : le volume disponible à chacune de ces particules en est réduit, en sorte que l'activité (concentration effective) augmente. Cet effet est considérable. A concentration physiologique d'hémoglobine (5-6 mM), cette protéine se comporte comme si sa concentration était près de 200 fois

supérieure. De fait, selon la forme et la dimension des particules, les coefficients d'activité peuvent atteindre de valeurs bien supérieures. Par exemple, γ_{*+I} le coefficient d'activité des noyaux homogènes activés, calculé avec la SPT dans le modèle I, évolue de :

- 10^{13} à 10^{38} entre t_0 et 99 % de la réaction, à $C_0 = 3,3$ mM, et
- 10^{11} à 10^{40} entre t_0 et 99 % de la réaction, à $C_0 = 5,8$ mM.

Avec le modèle II (et l'introduction de la CPT pour Γ), γ_{*+I} varie de :

- 10^{11} à 10^{37} entre t_0 et 99 % de la réaction, à $C_0 = 3,3$ mM, et de
- 10^9 à 10^{17} entre t_0 et 99 % de la réaction, à $C_0 = 5,8$ mM.

NB : dans les deux cas, γ_{*+I} varie de façon monotone (et approximativement quadratique) près de la solubilité (3,3 mM) ; par contre, à 5,8 mM il décroît d'environ un ordre de grandeur dans les 10-15 premiers %, pour croître ensuite jusqu'à 99% (sans saturation apparente).

En ne considérant que les valeurs initiales (à t_0), l'introduction du rapport Γ (avec CPT) se traduit par la diminution d'un facteur 100 (aux deux concentrations) de γ_{*+I} , soit une augmentation *a priori* de la vitesse homogène du même facteur (éq. V-1). Des observations équivalentes ont pu être faites avec le coefficient d'activité des monomères et Γ (cf. note de bas de page #8). Autrement dit, la non-idéalité et son influence sur les coefficients d'activité du modèle est considérable, qualitativement et quantitativement⁸ : l'encombrement des fibres en développement ne peut être ignoré, et la CPT doit être appliquée – dynamiquement- aux différents coefficients d'activité (sans se restreindre au noyau hétérogène). C'est ce que nous avons réalisé avec la mise en place du modèle III.

Nous avons évoqué la valeur numérique de la concentration totale de fibres dans les modèles I et II (Tableau 11). Le fait que cette concentration augmente d'un facteur 10 en

⁸ Ainsi, dans cet exemple, on observe un comportement différentiel (en fonction de la concentration et au cours de la dynamique) des modifications induites par le passage du modèle I à II : à forte concentration et à 99 % de la réaction, γ_{*+I} est modifié de 23 ordres de grandeur, contre 1 ordre de grandeur à faible concentration.

améliorant la non-idéalité de la nucléation hétérogène (modèle I à II), et d'un facteur 10 supplémentaire en réponse à l'application étendue de la CPT aux coefficients d'activité des monomères et du noyau homogène activé (modèle II à III), suggère fortement que ces modifications constituent des niveaux d'amélioration successifs.

Vers une description spatiale du processus de polymérisation : Nous avons observé que dans toute la gamme de températures (24-40°C) et de concentrations ($\approx 3-6$ mM) du *corpus* expérimental, la vitesse d'élongation des fibres domine toujours celle de la nucléation homogène (10^{12} à 10^3 , pour $C_0 = 3,5$ à $5,8$ mM, modèle I), et dans une moindre mesure celle de la nucléation hétérogène (10^8 à 10^{-1} , idem). Bien que les modèles I –III n'incluent pas de définition des domaines, le calcul de la taille moyenne des fibres (concentration des monomères polymérisés / concentration des fibres), nous a fourni un premier indice qu'un niveau de description additionnel, mettant en jeu les domaines et/ou la taille des fibres devrait être ajouté au modèle (voir Figure 34, modèle III). Le Tableau 11 résume les observations relatives aux modèles I-III, et aux deux concentrations extrêmes de la gamme expérimentale « 25 °C ». Les données présentées sont obtenues à 99 % de complétion du processus ($C_{poly} = 0,99 \times C_{poly_max}$; des résultats similaires, non présentés, correspondent à la gamme « 37°C »).

Tableau 11
Comparaison de la concentration et de la longueur moyenne des fibres produites par les modèles I-III

	C₀ = 3,5 mM		C₀ = 5,8 mM	
	Longueur (micromètres)	Concentration (mM)	Longueur (micromètres)	Concentration (mM)
Modèle I	$6,7 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^{-9}$	$1,7 \cdot 10^1$	$9,7 \cdot 10^{-4}$
Modèle II	$5,2 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^0$	$1 \cdot 10^{-3}$
Modèle III	$1,1 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$

On peut observer que la concentration finale des fibres polymères (C_p) correspondant aux trois modèles successifs augmente, selon le rang du modèle et aux deux concentrations, d'un facteur ≈ 10 (10^3 entre les modèles II et III à 3,5 mM). La concentration totale de monomères disponibles pour la polymérisation étant par définition constante d'un modèle à l'autre⁹, la longueur moyenne des fibres diminue.

Ainsi, l'adjonction de la non-idéalité à la nucléation hétérogène¹⁰ se traduit par la diminution d'un ordre de grandeur de la longueur moyenne des fibres.

Or, la seule référence bibliographique, que nous ayons pu identifier, et qui présente des données permettant une évaluation quantitative et exploitable de la taille moyenne des fibres est celle de [Christoph et coll. 2005]. La figure 37 compare nos résultats à ceux que nous avons extraits de cet article¹¹.

A noter que par rapport au *corpus* expérimental que nous avons exploité jusqu'à présent dans ce travail, les conditions expérimentales de Christov et coll., 2005 sont similaires en terme de température (23-35°C, mais non différenciées dans l'article), par contre, sensiblement limitées en terme de concentration, avec $C_0 = 3,5$ à 4 mM (cf. figure 37).

On peut néanmoins constater, dans cette gamme limitée, que la prise en considération, « restreinte » (Γ , CPT, modèle II) ou « étendue » (modèle III), de la non-idéalité rapproche notablement les longueurs moyennes simulées des longueurs expérimentales -le gain relatif du modèle III paraissant être supérieur d'une décade à l'approche de la solubilité.

⁹ A température constante.

¹⁰ Par hypothèse, $\Gamma = 1$ dans le modèle I. Dans le modèle II, entre t_0 et 99%, Γ varie de (i) 10^{-6} à 10^{-67} (à 3,5 mM) (ii) de 10^{-4} à 10^{-73} (à 5,8 mM), tandis que, dans le modèle III, il évolue de (i) $0,5 \cdot 10^{-5}$ à 10^{-6} à 3,5 mM, et (ii) de $3 \cdot 10^{-4}$ à $4 \cdot 10^{-4}$ à 5,8 mM (nb : dans tous les cas, l'évolution est non-monotone, croissante-maximum-décroissante).

¹¹ Nous avons calculé la taille moyenne des fibres comme le diamètre d'une sphère possédant le volume reporté dans la figure 4 de l'article Christoph, G. W., J. Hofrichter and W. A. Eaton (2005). "Understanding the shape of sickled red cells." *Biophys J* **88**(2): 1371-6..

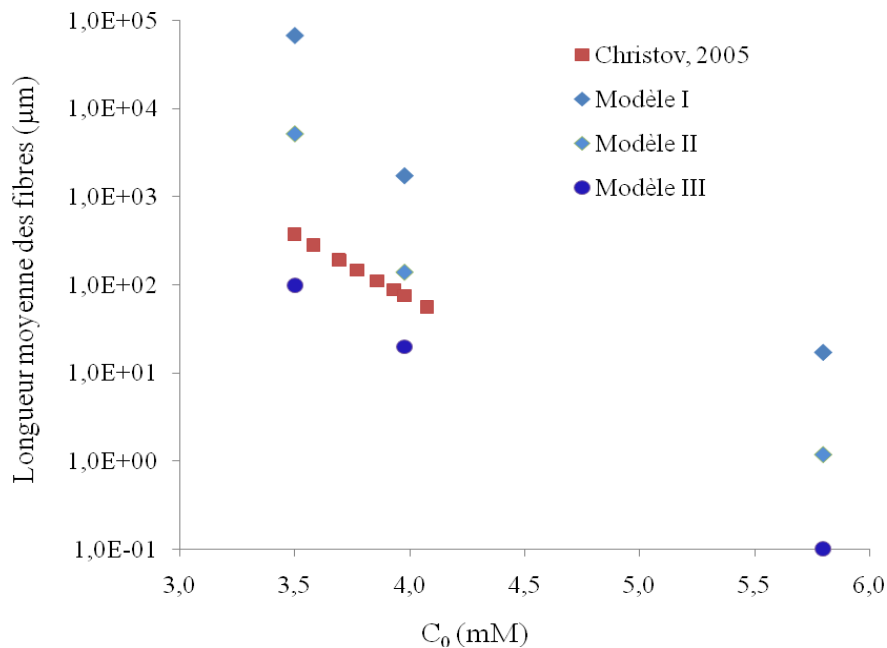


Figure 37. Longueur moyenne des fibres (25°C) et comparaison aux données de Christov et coll., 2005

A bilan, ces observations pointent une imperfection dans la description « géométrique » du processus de polymérisation. Ceci nous mènera au modèle IV, analysé plus loin.

VII-4. MODELE IV ET DOMAINES

Le modèle IV est une première tentative de prendre en compte les aspects géométriques présentés ci-dessus, en tant qu'ils sont directement liés à l'organisation spatiale des fibres polymères en domaines.

La caractéristique essentielle du modèle IV est qu'il établit une séparation fonctionnelle entre le processus homogène -qui a lieu en solution, et le processus hétérogène - qui a lieu au sein des domaines. Le processus homogène, dans le bloc *solution*, produit les

noyaux homogènes activés (« proto-fibres homogènes »), qui après élongation et franchissement d'un seuil de taille ($n = 56$)¹² deviennent des *domainses*, par activation « locale » de la nucléation hétérogène. Chaque domaine possède et calcule ses propres grandeurs hétérogènes : concentration des noyaux –et des fibres HEN, coefficient Γ et vitesse HEN.

Dans Simulink®, cette construction impose de définir à l'avance (avant de lancer la simulation numérique) un nombre maximal de domaines, ce qui entraîne des difficultés pratiques. Pour réduire les temps de calcul, et pour tenter de pallier les modestes puissance de calcul et capacité de stockage¹³, nous avons décliné le modèle IV, en une version « simplifiée » (modèle IVa), déclinaison où les constantes de non-idéalité « B » utilisées pour le calcul du rapport de non-idéalité Γ des domaines(cf. *Annexe II et IV*) sont les mêmes que celles utilisés en « solution » pour le calcul des coefficients d'activité du monomère (γ) et du noyau homogène activé ($\gamma_{i^{*+1}}$). Dans la version « détaillée » (IVb), chaque domaine possède ses propres constantes « B », ce qui permet de définir un rapport Γ « local ». La logique de ce choix est liée au fait que le coefficient Γ est une fonction de la concentration des fibres, de leur longueur (en sus de C , concentration des monomères –cette dernière variable étant considérée uniforme dans toute la solution ET au sein des domaines).

Pour des raisons techniques, le modèle « domaines » simplifié n'a pu être analysé de façon rigoureuse (par rapport au *corpus* expérimental de référence) qu'aux concentrations inférieures à 4,5 mM (voir Tableau VI-9). Pour les 3 concentrations les plus basses (3,4-3,7

¹² Valeur « arbitrairement » fixée à l'équivalent de 4 plateaux de la fibre polymère. Si l'on considère l'ampleur de la gamme des tailles atteintes par les noyaux (HON et HEN), entre ≈ 1 et ≈ 150 unités durant la dynamique, il apparaît que ce seuil devrait être ajusté continuellement et proportionnellement, à cette même taille (les plus grands des noyaux requérant, par exemple, une « surface » de polymère supérieure). Cette modification fait partie de la liste des améliorations qui seront apportées au modèle spatial.

¹³ Dans les modèles I à III, de multiples grandeurs et valeurs caractérisent le modèle (approximativement une cinquantaine, dont environ la moitié est suivie/enregistrée en dynamique) ; dans les modèle IV, le nombre est multiplié par le nombre de domaines qu'il faut initialiser à 10-10 000, pour $C_0 = 3-6$ mM ! Par ailleurs, divers tests « logiques » et « saturations » alourdissent et ralentissent encore les calculs.

mM), le temps de latence et l'indice de sigmoïdité simulés divergent des données expérimentales (écart moyen $> 0,6$). Par contre, aux environs de 4 mM (3,96 et 4,17 mM), les résultats sont relativement « acceptables » en terme d'écart, mais au prix d'un début de perte du temps de latence. Enfin, l'examen détaillé des valeurs reportées dans le Tableau VI-9 indique que le caractère « autocatalytique » du processus simulé augmente continûment et façon évidemment artificielle (voir aussi Figures 36a,b,c). Ceci est probablement dû à l'insuffisance de la description de la nucléation hétérogène et des fibres correspondantes au sein de chacun des domaines (voir figure 35).

En effet, la définition du modèle « domaines » est basée sur l'individualisation des fibres « homogènes » (donc des domaines qui en découlent). Par contre, les fibres hétérogènes de chaque domaine ne sont pas différenciées et appartiennent à un « pool » commun, défini par des « variables hétérogènes » moyennes (ex : I). De plus, elles ne sont ni discrétisées, ni seuillées, comme cela est fait pour les fibres homogènes. Or, plus la concentration initiale est faible, plus le nombre de domaines diminue et le nombre de fibres hétérogènes augmente [Eaton and Hofrichter 1990; Christoph et coll. 2005]. C'est pourquoi la description du processus de polymérisation et d'évolution des domaines telle qu'elle est implémentée dans le modèle IV s'avère insuffisante. A cet égard d'ailleurs, le fait que le modèle « détaillé » (modèle IVb) produise des résultats non différents du modèle simplifié est en accord avec cette conclusion. Enfin, le fait que le temps de latence ne soit que peu ou pas conservé avec le modèle IV est sans doute lié à ses propres imperfections.

Comment modéliser les fibres individuellement ? Pratiquement, les opérations réalisés par Simulink© dans le modèle IV sont des calculs vectoriels. Autrement dit, après initialisation de la variable « d », nombre maximal de domaines qui sera géré pendant la simulation, tous les calculs sont effectués. Ceci a entraîné, pour des raisons de puissance et temps de calcul, l'impossibilité de simuler toutes les conditions du *corpus* expérimental de

référence (voir plus haut). Avec l'idée d'initialiser chaque nouveau domaine (et donc ses paramètres et variables) uniquement en fonction des besoins au moment de son apparition, nous avons longuement exploré la possibilité de modifier la structure du modèle Simulink© pendant la simulation. Cette idée s'est avérée *in fine* impossible à mettre en œuvre¹⁴. Ajouté à cela le fait que l'individualisation des *fibres* (au même titre que les domaines) requièrerait un nombre important -et dynamique, de variables : par exemple, à 5-6 mM, pour 1-3 domaines, comme cela est observé dans un érythrocyte, le nombre de fibres requis « pourrait » atteindre quelques milliers (de plus, la gestion d'un modèle « schéma-blocs » tel qu'avec Simulink© serait au minimum délicate).

Cette réflexion nous a menés à l'idée que la programmation « orientée objet » (OO) constitue un paradigme d'implémentation plus pertinent et plus adapté, pour un tel système caractérisé par une « forte » évolution dynamique et par un petit nombre de types d'éléments (les « classes » de la programmation OO), en l'occurrence la *solution*, et les *fibres*.

La figure 38 présente le principe de l'application de cette idée à la construction en programmation objet de la double nucléation, telle que nous la concevons¹⁵.

Brièvement, l'objet « *solution* » (une instance de la *Classe* du même nom), est « simplement » caractérisé par :

- les grandeurs scalaires listées (volume, température, coefficients d'activité des particules libres en solution, ...),
- les fonctionnalités (« méthodes ») propres à la solution (expérimentale ou simulée), principalement la gestion des bilans de matière, calculs des grandeurs de la solution, ainsi que la production de « proto-fibres homogènes ».

¹⁴ Au moins avec les versions récentes de Matlab/Simulink©, au-delà de 2004.

¹⁵ Avec la collaboration active de Mr F Guillaud (Inserm U927)

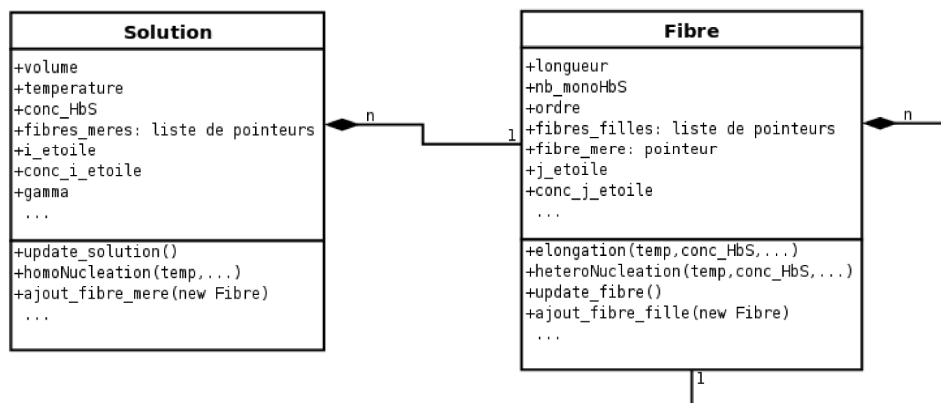
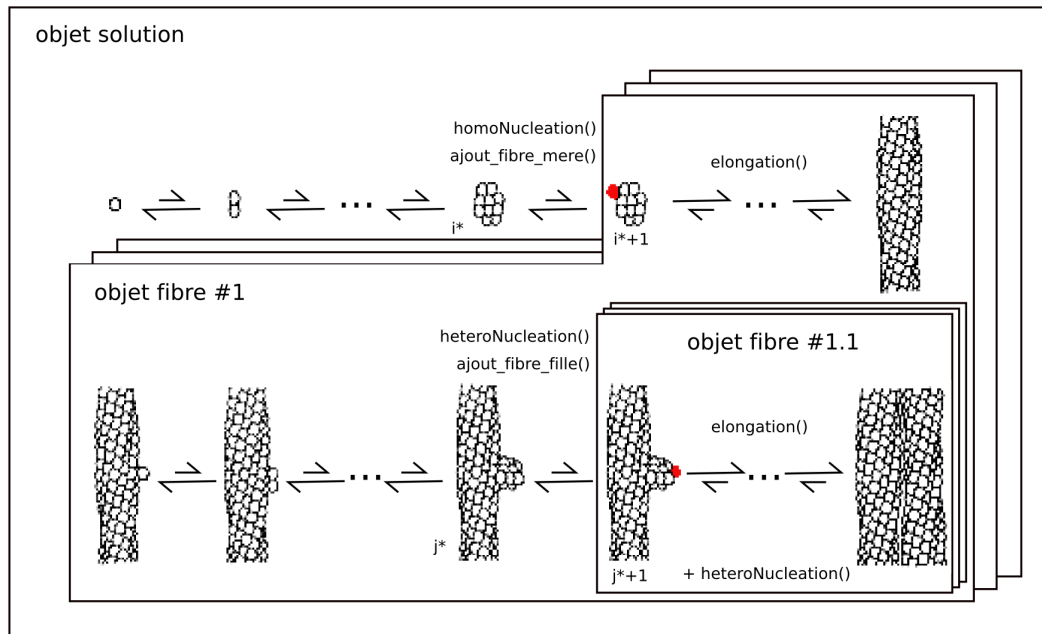


Figure 38. Application de la programmation structurée « objet » à la description de la solution d'hémoglobine polymérisante

D'autre part, chaque objet « fibre » (instance de la classe *Fibre*), créé dynamiquement en fonction des besoins de la simulation, est caractérisé par :

- sa nature : fibre d'origine *homogène* ou *hétérogène*, son ordre (« 0 » pour une fibre homogène, « 1 » pour une fibre hétérogène) et son degré de connectivité (combien de fibres hétérogènes porte-t-elle, matrice de connectivité, etc),

- sa taille (en monomères et en $\mu\text{m}, \dots$), la concentration « locale » de noyaux hétérogènes et de « proto-fibres hétérogènes » qu'elle porte (avec éventuellement un repère spatial associé), etc
- les coefficients d'activité locaux, et enfin
- les « méthodes » propres aux fibres, c'est-à-dire « élongation » et « nucléation hétérogène », principalement.

VII-5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons implémenté, puis corrigé et mis à jour, ensuite exploité en dynamique et diagnostiqué, et enfin amélioré le modèle de double nucléation de la polymérisation de HbS. Néanmoins, les améliorations apportées sont partielles. Les hypothèses que nous soulevons pour dépasser ce niveau -et les limites de l'outil qui nous a permis de réaliser ce travail, imposent maintenant de transposer notre modèle actuel dans une description informatique de type « objet ».

Cette approche conceptuelle constitue à nos yeux la perspective majeure et une évolution indispensable du modèle de double nucléation. Elle permettra de tester, sans limitations logistiques, les différentes conditions et hypothèses d'intérêt. En particulier, avec cette construction, il sera possible (et plus aisé et plus rapide¹⁶) de déterminer la pertinence des hypothèses avancées pour obtenir une description, non seulement dynamique mais aussi spatiale -donc plus réaliste, du processus de polymérisation de HbS. Celles-ci concernent en particulier la nécessaire gestion différentielle de la constante bimoléculaire d'addition des monomères (k_+) :

- au noyau homogène –et en fonction de sa taille
- au noyau hétérogène (idem), et

¹⁶ Le langage objet qui sera utilisé, le C++, est un langage compilé (c'est-à-dire traduit en un code spécifique du processeur et de la machine) donc beaucoup plus rapide.

- à la fibre en élongation (idem).

En effet, au vu des disparités de dimension, de forme et de masse (donc de vitesse moyenne) que manifestent les monomères, les deux types de noyaux, et *a fortiori* les fibres, il apparaît indispensable de lever l'hypothèse, suivie jusqu'à présent –et y compris dans ce travail, que cette grandeur k_+ soit une constante, indépendante des partenaires qu'elle met en relation cinétique. A cet égard, une exploration préliminaire de cette hypothèse, que nous avons réalisée avec une version en développement du modèle II, a montré que cette hypothèse était pertinente¹⁷.

L'examen des courbes simulées produites par les différents modèles tout au long de notre étude fait apparaître que les améliorations qui ont pu être apportées affectent essentiellement la première partie des courbes (jusqu'à 30-50 % environ). Si cela reste largement insuffisant (et frustrant), cela constitue néanmoins un gain substantiel qui permet d'envisager finalement un abord des effecteurs physiopathologiques de la polymérisation de HbS impliqués dans la variabilité clinique. Dans cet axe, l'hémoglobine F (HbF), hémoglobine non-compétente, qui est supposée retarder le processus de polymérisation, doit être abordée premier lieu puisque (voir Chap. II) :

- elle peut être présente nativement, mais dans des proportions variables entre sujets et entre érythrocytes d'un même sujet,

- elle est induite par le traitement à l'hydroxyurée, mais de façon extrêmement variables d'un patient à l'autre.

D'autre part, l'implémentation des effets dynamiques de l'oxygénation permettra de simuler le cycle respiratoire et certaines conséquences de l'exercice physique, ainsi que

¹⁷ Ces résultats, basés sur l'application primaire de la théorie des collisions, non présentés ici, l'ont été sous forme de communications affichées aux réunions RIAMS et IPG 2006, Lyon. En bref, nous avons pu montrer (par exploration numérique « manuelle ») qu'il était possible d'améliorer significativement la reproduction des courbes expérimentales en modulant, de façon différentielle en fonction de la concentration initiale (3-6mM), la constante cinétique appliquée au processus homogène (facteur 10^{-3} - 10^{-1}) et au processus hétérogène (10^{-1} - 10^1), sans modifier la constante appliquée à l'élongation.

l'amplification bouclée supposée « ralentissement érythrocytaire -> hypoxie soutenue -> polymérisation -> ralentissement accru ».

Pour en terminer avec les aspects moléculaires, qui ont constitué l'aspect essentiel de ce travail, citons quelques améliorations physico-chimiques qu'il serait approprié de mettre en place:

- la description -qui reste semi-phénoménologique, des termes énergétiques impliqués dans la nucléation d'une part et dans la stabilisation des polymères d'autre part (effet hydrophobe, et « force de déplétion »),
- une amélioration de la description géométrique/spatiale du processus hétérogène, qui confère à la polymérisation de HbS ses spécificités (dont l'autocatalyse); le facteur de non-idéalité Γ est en réalité un rapport, et le passage aux expressions CPT justes des coefficients d'activité *individuels* de la fibre et du noyau hétérogène constitueront certainement un niveau d'amélioration supplémentaire,
- une implémentation de la « dépolymérisation » (« polymer melting », [Briehl 1995 ; Turner et coll. 2006]), car celle-ci peut jouer un rôle important, en particulier au niveau du versant artériel « oxygéné »,
- une implémentation de la fragilité et de la rupture éventuelle des fibres sous l'action des contraintes mécaniques que subit l'érythrocyte ([Briehl et coll. 1990]),
- l'application d'une théorie physique reliant la viscosité du milieu intra-érythrocytaire à la concentration –et à la distribution de taille, des fibres polymères.

VII-6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Briehl, R. W. (1995). "Nucleation, fiber growth and melting, and domain formation and structure in sickle cell hemoglobin gels." J Mol Biol **245**(5): 710-23.
- Briehl, R. W., E. S. Mann and R. Josephs (1990). "Length distributions of hemoglobin S fibers." J Mol Biol **211**(4): 693-8.
- Christoph, G. W., J. Hofrichter and W. A. Eaton (2005). "Understanding the shape of sickled red cells." Biophys J **88**(2): 1371-6.
- Corbett, J. D., W. E. Mickols and M. F. Maestre (1995). "Effect of hemoglobin concentration on nucleation and polymer formation in sickle red blood cells." J Biol Chem **270**(6): 2708-15.
- Eaton, W. A. and J. Hofrichter (1990). "Sickle cell hemoglobin polymerization." Adv Protein Chem **40**: 63-279.
- Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism." J Mol Biol **183**(4): 611-31.
- Hall, D. and A. P. Minton (2004). "Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. II. Kinetic models for nucleated fiber growth." Biophys Chem **107**(3): 299-316.
- Jones, C. W., J. C. Wang, F. A. Ferrone, R. W. Briehl and M. S. Turner (2003). "Interactions between sickle hemoglobin fibers." Faraday Discuss **123**: 221-36; discussion 303-22, 419-21.
- Mickols, W. E., J. D. Corbett, M. F. Maestre, I. Tinoco, Jr., J. Kropp and S. H. Embury (1988). "The effect of speed of deoxygenation on the percentage of aligned hemoglobin in sickle cells. Application of differential polarization microscopy." J Biol Chem **263**(9): 4338-46.
- Minton, A. P. (2001). "The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media." J Biol Chem **276**(14): 10577-80.
- Samuel, R. E., E. D. Salmon and R. W. Briehl (1990). "Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin." Nature **345**(6278): 833-5.
- Turner, M. S., G. Agarwal, C. W. Jones, J. C. Wang, S. Kwong, F. A. Ferrone, R. Josephs and R. W. Briehl (2006). "Fiber depolymerization." Biophys J **91**(3): 1008-13.

Zimmerman, S. B. and A. P. Minton (1993). "Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences." Annu Rev Biophys Biomol Struct **22**: 27-65.

ANNEXE I

Medkour, Ferrone, Galactéros, Hannaert

***The Double Nucleation Model for Sickle Cell Haemoglobin
Polymerization: Full Integration and Comparison with Experimental Data***

Acta Biotheoretica, 2008

The Double Nucleation Model for Sickle Cell Haemoglobin Polymerization: Full Integration and Comparison with Experimental Data

Terkia Medkour · Frank Ferrone ·
Frédéric Galactéros · Patrick Hannaert

Received: 19 December 2007 / Accepted: 19 December 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract Sickle cell haemoglobin (HbS) polymerization reduces erythrocyte deformability, causing deleterious vaso-occlusions. The double-nucleation model states that polymers grow from HbS aggregates, the nuclei, (i) in solution (homogeneous nucleation), (ii) onto existing polymers (heterogeneous nucleation). When linearized at initial HbS concentration, this model predicts early polymerization and its characteristic delay-time (Ferrone et al. *J Mol Biol* 183(4):591–610, 611–631, 1985). Addressing its relevance for describing complete polymerization, we constructed the full, non-linearized model (Simulink[®], The MathWorks). Here, we compare the simulated outputs to experimental progress curves ($n = 6–8$ different [HbS], 3–6 mM range, from Ferrone's group). Within 10% from start, average root mean square (rms) deviation between simulated and experimental curves is 0.04 ± 0.01 (25°C, $n = 8$; mean \pm standard error). Conversely, for complete progress curves, averaged rms is 0.48 ± 0.04 . This figure is improved to 0.13 ± 0.01 by adjusting heterogeneous pathway parameters ($p < 0.01$): the nucleus stability ($\sigma_2 \mu_{cc}$: + 40%), and the fraction of polymer surface available for nucleation (ϕ), from $5e^{-7}$, (3 mM) to 13 (6 mM). Similar results are obtained at 37°C. We conclude that the physico-chemical description of heterogeneous nucleation warrants refinements in order to capture the whole HbS polymerization process.

T. Medkour
EA 2381, Pharmacochimie Moléculaire et Systèmes Membranaires, Université Denis Diderot,
Paris 7, France

F. Ferrone
Department of Physics, Drexel University, Philadelphia, PA, USA

F. Galactéros
Centre de la Drépanocytose et des Thalassémies, CHU Henri Mondor, Creteil, France

P. Hannaert (✉)
Inserm E0324, CHU La Milétrie, 2 rue de la Milétrie, BP 577, 86000 Poitiers, France
e-mail: patrick.hannaert@univ-poitiers.fr

Abbreviations

C_o	initial HbS concentration (hence it is also the total HbS concentration in the model)
C_s	HbS solubility, i.e. HbS concentration below which no polymerization can occur; varies with temperature, see Eaton and Hofrichter (1990)
HbS	Sickle cell haemoglobin, deoxygenated form (Protein Data Bank identifier: 1HBS; cf. url. http://www.rcsb.org/pdb/)
hon	“homogeneous nucleation” pathway, by which metastable HbS nuclei in solution are converted into “polymers”, C_p
hen	“heterogeneous nucleation” pathway, by which nuclei attached to existing polymer fibers are converted into “polymers”
ODE	Ordinary differential equation
td	The experimental lag-time during which no polymer is detected
url	Uniform resource locator

1 Introduction

1.1 Sickle Cell Disease and Polymerization of Haemoglobin S

Sickle cell disease is a genetic disease, resulting from a point mutation of wild-type haemoglobin, Hb, an $\alpha_2 \beta_2$ tetramer carrying oxygen in red blood cells. Molecularly, sickle cell disease haemoglobin (HbS) is characterized by the substitution, at position 6 in β -chains, of glutamic acid (Glu) for valine (Val). This *electronegative to hydrophobic* amino-acid mutation endows HbS with a strong tendency to aggregate into polymer fibers. Actually, only the deoxygenated form of HbS (the so-called *T* conformation) exposes the required hydrophobic pocket (Phe β -85/Leu β -88), thus providing the primary “binding site” for mutant β_6 -Val lateral chain (see Eaton and Hofrichter 1990).

When accumulated in sufficient amount, HbS polymers alter the mechanical and rheological properties of red cells and impedes blood circulation through small vessels. Eventually this leads to the obstruction of the microcirculation. Consequent tissue hypoperfusion induces painful vaso-occlusive episodes (further potentiated by oxygen deprivation). On the long-term, these alterations induce organ lesions, chronic anemia, and a marked reduction of life expectancy (Steinberg 2005). The main treatment of sickle cell disease aims at increasing the expression of the non-polymerizing foetal isoform of haemoglobin (HbF, $\alpha_2 \gamma_2$ tetramer) using hydroxyurea. However, such treatment is variably efficient and/or tolerated (e.g. see Maier-Redelsperger et al. 1998).

Although the molecular defect of HbS is present in all patients, the process of HbS polymerization and the ensuing vaso-occlusive events (as well as the concomitant inflammatory response) have multiple determinants, from molecular to organ level (Kaul et al. 1996; Steinberg 2005). As a consequence, the clinical profile of sickle cell disease patients is extremely variable, hampering prognosis and therapeutic decision. In such a complex situation, mathematical modeling coupled to numerical simulation offers one rational, possible approach, complementary to experimental and clinical

explorations. However, any attempt to integrate the relevant patho-physiological determinants of sickle cell disease vaso-occlusion must start with the primary, etiological event, i.e. deoxy-HbS aggregation into polymer fibers as it dynamically occurs inside red blood cells and as it is modulated by erythrocyte HbS concentration, HbF fraction (native or treatment-induced), in addition to oxygenation and temperature. Such an integrating step has yet to be undertaken.

At the molecular level, HbS polymerization is a nucleation-driven, autocatalytic process, strongly accelerated by increased concentration or temperature. It is characterized by a delay-time, td , during which no polymer can be (experimentally) detected (for an in-depth review of HbS polymerization, the reader is directed to the excellent review by Eaton and Hofrichter (1990). Numerically, the delay-time is close to the tenth-time (albeit consistently lower by about 30%), the time required for the experimental signal to reach 10% of its maximum (Eaton and Hofrichter 1990). From a pathophysiological standpoint, the delay-time can be compared to red cell transit time in (hypoxic) microvessels (usually in the 0.5–2 s). Simply put, if the delay-time is higher than transit time, then sufficient amounts of polymer cannot be formed within red cells; conversely, if td is lower than transit time, polymers form and accumulate fast enough to alter red cell deformability before lung reoxygenation, thus reducing tissue perfusion.

1.2 The Double Nucleation Model of HbS Polymerization

The double-nucleation model is a thermodynamic-kinetic description of the HbS polymerization process that was developed by Ferrone et al. (1985b; see also Sect. 2 and “Appendix”), in order to account for a series of characteristic experimental observations (see Eaton and Hofrichter 1990):

- (i) the very existence of a delay-time,
- (ii) the high concentration dependence of the delay-time,
- (iii) the stochastic appearance of the first HbS polymer fiber (as evidenced in small experimental volumes).

The double-nucleation model states that HbS polymers develop from metastable HbS aggregates, called “critical nuclei”. Such nuclei can be formed either in bulk solution from HbS free monomers (the so-called homogeneous nucleation pathway), or on pre-existing polymers (the heterogeneous nucleation pathway). The model successfully describes the polymerization of fully deoxygenated HbS (i) in the 3–6 mM concentration (Ferrone et al. 1985b), (ii) at different temperatures (15–35°C; Ferrone et al. 1985b), and (iii) in the presence of varying, clinically relevant, amounts of HbF (Rotter et al. 2005a).

On the basis of the above success, on the one hand, and direct observations of a double nucleation *mechanism* on the other hand (Samuel et al. 1990), the double nucleation model is widely acknowledged. As a model, nevertheless, it suffers, in a dynamic and integrated perspective, from the limitation that it was validated only in a linearized version, and only in the restricted, early phase of the process ($\approx 10\%$ completion).

1.3 Aim of the Work

It follows from the above rationale that the relevance of the full *double-nucleation* model to the whole HbS polymerization process, and consequently to erythrocyte/microvascular conditions, remains unknown. In order to simulate the whole HbS polymerization process, i.e. up to solubility starting from a range of initial concentrations, we numerically integrated the original, non-linearized model equations (see Ferrone et al. 1985b; Rotter et al. 2005b).

Here, we confirm that the fully integrated model performs well within the first 10% of the process. More importantly, we show that simulated polymerization curves are “slower” and strongly depart from experiments beyond the initial 10%. Finally, we report that the adjustment of model parameters linked to the heterogeneous nucleation pathway significantly reduces such divergence.

2 Material and Methods

2.1 About the Double Nucleation Model of HbS Polymerization

A double nucleation *mechanism* for HbS polymerization was first proposed in 1980, on the basis of experimental observations (Ferrone et al. 1980). It was directly observed in 1990 by differential-interference contrast (DIC) microscopy, when lateral branching upon primary fibers were evidenced (Samuel et al. 1990).

The double nucleation *model* was published in 1985 (Ferrone et al. 1985b). It is a thermodynamic-kinetic description of the HbS polymerization process, under the ODE formalism. Broadly speaking, model equations fall into two categories: (i) physico-chemical equations (e.g. monomer activity coefficient), (ii) kinetic equations (e.g. rate of polymers formation). One specific feature of this model is that many “parameters” (e.g. sizes of the nuclei) are actually dynamic parameters, because they depend on state-variables—often in a highly non-linear fashion.

In order to simplify the analysis of their experimental data (Ferrone et al. 1985a), the authors linearized the rate equations around zero-time (i.e. at constant HbS, C_o). Then, they used a global optimization procedure to identify carefully selected model parameters by fitting simulated data to experimental data (Ferrone et al. 1985b, 2002; Cao and Ferrone 1997; see also Rotter et al. 2005a, 2005b). Thus, while kept under its linearized version, the model has been refined along the years. One success of this approach was to obtain physically reasonable values for these parameters. Table 1 presents the commented list of these parameters, units and values (at a reference temperature of 20°C).

2.2 Model Variables, Units and Equations

Variables of the “double nucleation model” are (see “Abbreviations”) :

- C , concentration of free HbS monomers, ranging from C_o to C_s ,
- C_p , concentration of polymers (i.e. elongating fibers endings),
- C_{poly} , concentration of polymerized monomers.

Table 1 The main five parameters of the double nucleation model

Parameter	Value (20°C)	Units	Comment
k_+	$10^{1.5}$	$\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Second order rate constant for monomer addition to fibers and nuclei
μ_{pc}	-7.21×10^{-3}	kcal/mM	Free energy of interaction between HbS monomers within the (“infinite”) polymer
ϕ	$10^{-7.9}$	–	Fraction of polymer surface available for heterogeneous nucleation
$\sigma_1 \cdot \mu_{cc}$	0.07×10^{-3}	kcal/mM	Lumped “geometric-energetic” parameters: $-\mu_{cc}$ is the free energy per unit area of attachment of the heterogeneous nuclei to the polymer surface, $-\sigma_1$ & σ_2 are geometric parameters describing the dependence of the contact area on the size of the heterogeneous nucleus
$\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$	-5.68×10^{-3}	kcal/mM	

Units are given as used in the model. Numerical values reported correspond to the (thermodynamical) reference temperature, 20°C (for details, see Ferrone et al. 1985b, 2002; Cao and Ferrone 1997)

Mathematically, the model is a system of two ordinary differential equations, allowing for the dynamic integration of state-variables C and C_p , coupled to an algebraic equation constraining the variable C_{poly} . These core equations are presented in the “Appendix”.

Concentration are expressed in millimoles/liter (mM/l), and indicated with square brackets (e.g. [HbS]). Time is expressed in seconds (s) and reaction rate are expressed in mM/s.

Temperature is expressed in °C (in K within the model) and interaction energies are expressed in kcal/mM. Units related to “polymers” units are expressed on a “polymerized monomer” basis (e.g. “kcal/mM”).

2.3 Model Parameters

HbS solubility, as well as the five parameters listed in Table 1, are “static parameters”, i.e. they only depend on temperature, not on model state variables. Conversely, other model “parameters” are recalculated at each time-step, through their (usually highly non-linear) dependence on state-variable C . These “dynamic parameters” are listed and their corresponding equations presented in the “Appendix”.

Additional dynamic and non-linear parameters are used by the model, most of them pertaining to the physico-chemical and thermodynamical description of the solution and/or the HbS polymerization process. In particular :

- γ , the activity coefficient of the free monomer,
- γ_{i^*+1} , the activity coefficient of the “activated” homogeneous nuclei (Eq. A1.4, in Appendix 1 from Ferrone et al. 1985b),
- Γ , the ratio of the activity coefficient of the “nude polymer” to the activity coefficient of the polymer with one “activated” (i.e. $[j^* + 1]$ -sized) nucleus attached to it; as a matter of fact, this parameter, initially taken as unity, constitutes one of the refinements that were brought to the model by Ferrone’s group in order to improve the description of the heterogeneous process (see Eq. #10 in Ferrone et al. 2002).

These parameters and their equations have been amply introduced, detailed, and validated, in relevant publications (see Hofrichter et al. 1976; Minton 1981; Ferrone et al. 1985b, 2002; Eaton and Hofrichter 1990; Cao and Ferrone 1997; Ivanova et al. 2000; Rotter et al. 2005a, b).

2.4 Modeling and Computing Environment

Simulink[®] (v5, running with Matlab[®], Release 13, The MathWorks, France) was used as a modeling and numerical simulation environment. This software is a block (pre-defined and user-defined) based graphical language for describing dynamical systems. Windows[®] XP Professional was used as the operating system (2002 version, Service Pack 2) on a AMD/Athlon[®] desktop computer (2.17 GHz, 1 Go RAM). Typically, one full dynamic polymerization simulation (from initial HbS concentration C_o to solubility C_s) was completed in 2–10 s.

2.5 Model Simulations and Calculations

Numerical integrations were performed with Simulink[®], using Dormand-Prince algorithm (ode45), with a variable step and a relative tolerance set to 10^{-3} . Maximal step size was fixed at values ranging from 10^{-3} (for $C_o = 6$ mM) to 10^2 s (at $C_o = 3.3$ mM). These settings typically lead to 100–300 integration steps.

Experimental data at “25°C” (24.4–26.1°C) were taken from Ferrone et al. (1985a): eight initial concentrations, C_o varying from 0.218 to 0.373 g/cm³, i.e. 3–6 mM. Data at “37°C” (32.4–40.7°C) were unpublished data from one of us (F. Ferrone): six different C_o , ranging from 0.269 to 0.393 g/cm³ (4.17–6.10 mM).

Experimental and simulated data ($C_{poly} = f(t)$), were normalized, yielding $C'_{poly} = f(t)$. Simulated C_{poly} was normalized to $C_o - C_s$, whereas experimental C_{poly} was normalized to the signal maximal value (see Figs. 1 and 2, open circles).

For the purposes of controlling the performances of the full, non-linearized model, and for comparing its numerical outputs with the experimental data, we used three criteria:

- (i) the mean squared deviation between simulated and experimental curves (*rms*),
- (ii) the delay-time (*td*) of polymerization curves, usually expressed as the ratio of simulated to experimental *td* (“*td* ratio”),
- (iii) the degree of sigmoidicity of the curves, Hill number (n_H).

These criteria were calculated along the simulation, directly from within the Simulink[®] model. For all analysis presented, for either “initial” or “complete” polymerization, 9–18 sampled points were used (experimental and simulated).

2.5.1 Quantitative Deviation Between Simulation and Experiment

The difference between model outputs and experimental data was quantified as the “root mean square deviation” (*rms* deviation). For the “initial” part of the process,

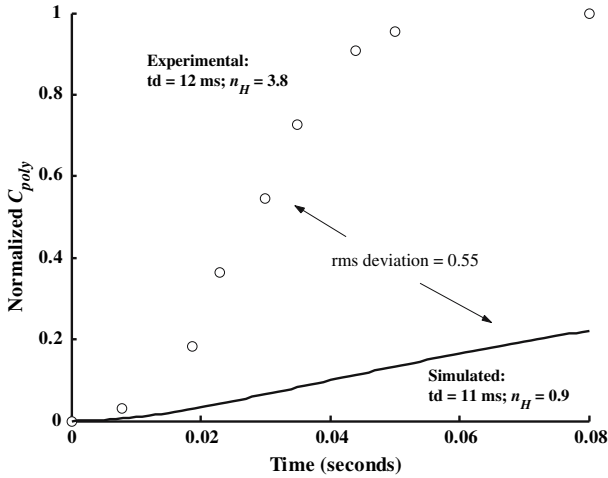


Fig. 1 Comparison of HbS polymerization whole progress curves, as produced by the seminal double-nucleation model, with experimental progress curves. Model parameters were as in Ferrone et al. (1985b; see Table 1). Simulated polymerized monomer concentration was normalized to the maximal amount of polymerization-competent HbS ($C_o - C_s$; continuous line). Reference experimental signal was extracted from Fig. 13 in Ferrone et al. (1985a) and it was normalized to signal maximum (open circles). In this illustrative example, initial HbS concentration, C_o , was 5.8 mM/l (0.373 g/cm^3) and T was 24.4°C . The *rms* deviation between simulated and experimental curves was 0.55, and delay-times were 11 and 12 ms, respectively (*td* ratio was 0.9). Shape index, n_H , was 0.9 and 3.8, respectively

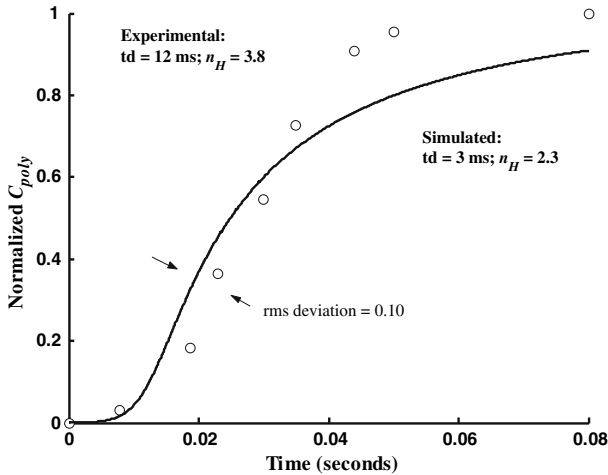


Fig. 2 Comparison of HbS polymerization produced by the modified model with experimental curves, in the same conditions as in Figure 1 (5.8 mM/l, 24.4°C ; see legend from Fig. 1). Two model parameters were adjusted: $\sigma_2 \mu_{cc}$ (main parameter driving heterogeneous nucleus stability) was multiplied by 1.4, (ii) ϕ , the fraction of polymerized monomers available for heterogeneous nucleation, was multiplied by 13. *Rms* deviation was 0.10; delay-times were 3 and 12 ms, respectively (*td* ratio was 2.7); curves sigmoidicity, n_H , was 2.3 and 3.8, respectively

rms deviation was calculated over the range between 1 and 10% completion. For whole progress curves, *rms* deviation was calculated between 1 and 99% polymerization. These limits were chosen in order to minimize the contributions of the initial and final parts of the curves (where the signals are close to “0” and “1”, respectively).

2.5.2 Delay-time of Polymerization

This parameter, expressed in seconds, was determined as follows:

- (i) determination of the maximal slope of the $C_{poly} = f(t)$ curve and corresponding time-point (inflexion point),
- (ii) determination of the equation of the tangent to the curve, at the inflexion point,
- (iii) td equated to the intercept of the maximal tangent with the horizontal, time axis.

The same procedure was used for experimental and simulated td . We have checked that for experimental data, the td values obtained by this procedure are similar, within 30% error, to the tenth-time, the time required to reach 10% completion of the polymerization (not shown).

2.5.3 Degree of Sigmoidicity of Polymerization Curves

As mentioned, HbS polymerization curves are S-shaped, or “sigmoidal”, a characteristic feature of cooperative systems (see Fig. 1, open circles). In 1910, Hill proposed the so-called “Hill equation” as an empirical description of the cooperative binding of oxygen to haemoglobin (Hill 1910; see also “Hill equation” item at url. <http://en.wikipedia.org/>). The parameter n_H , the “Hill number”, quantifies the degree of “cooperativity” of the phenomenon studied. Note however that this number is purely phenomenological and bears neither physical nor mechanistic meaning.

We used this index for the purpose of comparing the shapes of simulated to experimental curves. It was calculated as the slope of the linear regression of $\log [C_{poly} / (1 - C'_{poly})]$ as a function of $\log (t)$, with 8–12 points equally distributed below and above $C'_{poly} = 0.5$. All determination coefficients were greater than 0.93 (mean \pm sem = 0.98 ± 0.17 , $n = 28$).

2.6 Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm standard error of the mean. Standard error of the mean (sem) is equal to the standard deviation divided by the square root of the sample size (number of cases). Statistical comparisons were performed using unilateral and paired Student’s t -test, with a significance threshold set at 0.05.

3 Results

3.1 Behavior of the Integrated Model Around Zero-time

Only the linearized version of the double-nucleation model, under initial conditions (t_o , C_o), has been validated (e.g. Rotter et al. 2005b). Therefore, we first checked whether the non-linearized, fully integrated model exhibited predictive potency within the initial 10% of the polymerization process. The *rms* deviation between simulated and experimental data was used as a criterion.

For the “25°C” data set, the average *rms* deviation (sim. versus exp.) was 0.04 ± 0.01 ($n = 8$ “ C_o ”, range: 0.01–0.07). At “37°C”, the *rms* deviation was 0.05 ± 0.01 [0.02–0.07] ($n = 6$ “ C_o ”). Thus, within 10% completion of the polymerization reaction, the fully integrated model deviated by less than 5% from the experimental data. The proper (i.e. statistically) behavior of the integrated model in the early phase of polymerization was further supported by the fact that the simulated tenth-time (time required for the signal to reach 10% of its maximal value) was similar, within a factor of 1.1–2.0, to experimental tenth-time (and thus to experimental delay-time; data not shown). Nota bene: by definition, the rigorous determination of the delay-time, as described in Sect. 2, relies on complete polymerization curves.

3.2 Behavior of the Integrated Model up to Solubility

How does the “full model” behave in terms of *whole* HbS polymerization i.e. when the process is brought to solubility? For comparison purpose, two more criteria were used in addition to the *rms* deviation (from 1 to 99% completion; see Sect. 2): (i) the “Hill number”, n_H , as an index to describe curve sigmoidicity, (ii) delay-time, expressed as the ratio of “simulated to experimental” *td*.

Figure 1 shows a typical comparison of simulated with experimental polymerization. In this example, the initial HbS concentration was $C_o = 5.8$ mM/l (0.373 g/cm³) and temperature was 24.4°C. Data are presented as C'_{poly} , i.e. concentration of polymerized monomer normalized to the maximal amount of polymerization-competent HbS ($C_o - C_s$). The reference experimental signal (circles) was extracted from Ferrone et al. (see Fig. 13, in Ferrone et al. 1985a). In this case, *rms* deviation between simulated and experimental curves was 0.55. Delay-times were 11 ms (sim.) and 12 ms (exp.), yielding a *td_ratio* of 0.9. The shape index, n_H , was 0.9 and 3.8, respectively. Thus, although delay-time was well reproduced, simulated curve was very different, polymerization being less sigmoid, and “slower”, than in experiment.

At all concentrations and at all temperatures, similar discrepancies were observed. Indeed, simulated whole progress curves markedly departed from experiments beyond initial 10% completion. Table 2 (left part, “Native model”) summarizes the results. It can be seen that the average “simulation versus experiment” *rms* deviation was 0.48 ± 0.04 , at “25°C”. This is highly significant ($p < 10^{-4}$) when compared to 0.04 ± 0.01 , i.e. the *rms* deviation yielded by the full model, but within the first 10%

(see section above Sect. 3.1). Similarly, at “37°C” the *rms* deviation was 0.62 ± 0.02 (see Table 2, left part “Native model”). Again, this figure is significantly different ($p < 10^{-6}$) from the *rms* deviation calculated for the “initial 10%” (0.05 ± 0.01 ; see preceding section).

On the other hand, Table 2 (left part) also shows that delay-time was well-conserved by the full model. Indeed, average “simulated to experimental” *td* ratio was equal to 1.0 ± 0.2 at “25°C” ($n = 8$), and equal to 1.3 ± 0.5 at “37°C” ($n = 6$). Although individual values of delay-time ratio (i.e. corresponding to the different C_o) at “37°C” were more dispersed (0.1–2.6) than at “25°C” (0.5–1.7), none of the average *td* ratios (at “25°C” and at “37°C”) was significantly different from unity ($p < 0.31$).

Departure of model outputs from experimental data were further evidenced through differences in curve shape, i.e. sigmoidicity index, n_H . Table 2 summarizes the results concerning curve shape (left part, “Native model”, column “ n_H ”). At “25°C”, Hill number n_H was 1.5 ± 0.1 [0.9–1.8] ($n = 8$) for the curves generated by the reference model, versus 5.8 ± 0.6 [3.6–8.0] in experiments ($p < 2.10^{-4}$). At “37°C”, n_H was 1.0 ± 0.1 [0.8–1.2] ($n = 6$) for the curves generated by the reference model, versus 5.9 ± 0.7 [3.6–7.9] in experiments ($p < 5 \times 10^{-4}$).

In conclusion of this section, while maintaining proper delay-times, the fully integrated model strongly deviates from experiments after the initial 10% of the HbS polymerization process.

3.3 Numerical Adjustment of the Integrated Model

Because of the unavoidable numerical uncertainty about the model parameters, we reasoned that adjustments of their values could improve the integrated model outputs with respect to experiments. We defined a “gain” as the improvement of both the *rms* deviation and the shape index.

A thorough, albeit non-automated, search through the parameter space (data not shown), indicated that the simulated whole progress curves could be brought significantly closer to experimental’s by simultaneously adjusting two model parameters (among five, see Table 1). These two parameters are exclusively linked to the heterogeneous nucleation process: (i) $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$, an energetic term conditioning polymer-attached nucleus stability, (ii) ϕ , a geometric term, linked to polymerized monomers surface area fraction available for heterogeneous nucleation (Table 1).

The $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$ parameter relative change yielding a significant gain was +40% (+50%) at “25°C” (respectively “37°C”), constant throughout the corresponding set of HbS concentrations, C_o . On the other hand, we did not succeed in improving simulated data with respect to experiments using a single value for the parameter ϕ . Indeed, the changes required to obtain a significant gain, ranged from 5×10^{-7} (at 3.3 mM/l) to 13 (at 5.8 mM/l) for “25°C”. The required changes ranged from 3.5×10^{-1} (at 4.2 mM/l) to 30 (at 6.1 mM/l) for “37°C” data. The right part of Table 2 (“With adjustment”) summarizes the polymerization conditions (C_o and T), numerical changes, and ensuing results. When carrying these modifications, “simulation versus experiment” *rms* deviation was improved to

Table 2 Summary of simulated versus experimental data, at “25°C” and at “37°C”

<i>T</i> (°C)	<i>C</i> ₀ mM	Native model				Adjusted model ($\sigma_2\mu_{cc}$ and ϕ)								
		<i>rms</i>	<i>n_H</i>	Delay-time (s)		<i>rms</i>	Adjustment	<i>n_H</i>	Delay-time (s)		ratio			
				sim.	exp.				sim.	exp.				
25	3.38	0.58	1.6	3.6	28,000	17,000	1.7	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 5e^{-7}\phi$	0.15	2.9	3.6	16,000	17,000	0.9
25	3.52	0.22	1.7	4.7	2,700	5,000	0.6	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 5.5e^{-7}\phi$	0.13	2.6	4.7	3,700	5,000	0.7
25	3.66	0.44	1.8	6.8	550	520	1.1	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 2.5e^{-5}\phi$	0.15	3.3	6.8	430	520	0.8
25	3.96	0.52	1.6	7.9	37	33	1.1	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 1e^{-3}\phi$	0.15	3.6	7.9	28	33	0.8
25.6	4.17	0.56	1.6	6.1	8.7	6.3	1.4	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 1.8e^{-2}\phi$	0.09	3.6	6.1	4.2	6.3	0.7
26.1	4.81	0.48	1.3	5.5	0.3	3.9	0.8	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 2e^{-1}\phi$	0.12	2.9	5.5	0.27	3.9	0.7
24.9	5.14	0.5	1.2	8	0.93	0.19	0.5	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 7e^{-1}\phi$	0.14	2.7	8	0.095	0.19	0.5
24.4	5.79	0.55	0.9	3.8	0.011	0.012	0.9	$1.4\sigma_2\mu_{cc} 13\phi$	0.1	2.3	3.8	0.003	0.012	0.3
Mean		0.48	1.5*	5.8	nc	nc	1.0	Mean	0.13**	3.0***	5.8	nc	nc	0.7
sem		0.04	0.1	0.6			0.2	sem	0.01	0.2	0.6			0.3
37.1	4.17	0.59	1.2	6.8	1.9	0.8	2.3	$1.5\sigma_2\mu_{cc} 3.5e^{-1}\phi$	0.09	3.9	6.8	0.7	0.8	0.5
40.7	4.17	0.68	1.2	5.2	1.8	0.7	2.6	$1.5\sigma_2\mu_{cc} 2\phi$	0.12	3.3	5.2	0.6	0.7	0.7
39.2	5.14	0.59	1	6.1	0.05	0.09	0.6	$1.5\sigma_2\mu_{cc} 5\phi$	0.18	2.6	6.1	0.03	0.08	0.7
35.1	5.46	0.57	1	5.6	0.011	0.077	0.2	$1.5\sigma_2\mu_{cc} 6e^{-1}\phi$	0.3	2.2	5.6	0.02	0.077	0.8
36.4	5.79	0.68	0.9	7.9	0.005	0.003	1.7	$1.5\sigma_2\mu_{cc} 2\phi$	0.36	1.8	7.9	0.007	0.003	0.8

Table 2 continued

T (°C)	C _o mM	Native model			Adjusted model ($\sqrt{\text{var}(\sigma_{2\mu_{cc}})}_{[2]}$ and $\sqrt{\text{var}(\phi)}$)									
		rms	n_H		Delay-time (s)			Adjustment	rms	n_H		Delay-time (s)		
			sim.	exp.	sim.	exp.	ratio			sim.	exp.	sim.	exp.	ratio
32.4	6.1	0.61	0.8	3.6	0.0004	0.005	0.1	1.5 $\sigma_{2\mu_{cc}}$	0.15	2	3.6	0.002	0.005	0.7
Mean		0.62	1.0*	5.9	nc	nc	1.3	Mean	0.20**	2.6***	5.9	nc	nc	0.7
sem		0.02	0.1	0.7			0.5	sem	0.05	0.4	0.7			0.1

Result obtained with the “Native model” are presented in the left part of the table, while results from the “Adjusted model” are in reported in the right part of the table. Reference experimental conditions are given in the “T” (temperature) and “C_o” (HbS total concentration) columns (far left). Root mean squared deviation (“rms” column), sigmoidicity index (“ n_H ” column), and delay-time are given in corresponding columns. The upper part of the table gives data at “25°C” (experimental data extracted from Ferrone et al., 1985a); the lower part gives the data at “37°C” (unpublished data from F. Ferrone’s group). Modifications of the heterogeneous pathway parameters used in the modified model ($\sigma_{2\mu_{cc}}$ and ϕ , see text for details) are explicated in the “Adjustment” column : e.g. “1.4 $\sigma_{2\mu_{cc}}$ 5e⁻⁷ ϕ ” means that the parameter $\sigma_{2\mu_{cc}}$ was multiplied by 1.4 and the parameter ϕ was multiplied by 5e⁻⁷. For clarity, the statistical comparison of n_H from “Native” and “Adjusted model” with experimental n_H are not reported here, but given in the text (see Sect. 3)

* sim. n_H versus exp. n_H ; $p < 10^{-3}$

** “Adjusted model” rms versus “Native model” rms; $p < 5.10^{-4}$

*** “Adjusted model” n_H versus “Native model” n_H ; $p < 5.10^{-3}$

nc, not calculated

- (i) 0.13 ± 0.01 (vs. 0.48 ± 0.04 , $n = 8$; $p < 10^{-4}$) at “25°C”, and to
- (ii) 0.20 ± 0.05 (vs. 0.62 ± 0.02 , $n = 6$; $p < 5 \times 10^{-4}$) at “37°C”.

Similarly, the shape index was significantly increased by the numerical adjustments. Indeed, n_H increased:

- (i) to 3.0 ± 0.2 (vs. 1.5 ± 0.1 , $p < 10^{-5}$) at “25°C”, and
- (ii) to 2.6 ± 0.4 (vs. 1.0 ± 0.1 , $p < 5 \times 10^{-3}$) at “37°C”.

Table 2 presents data summary and statistics. For a representative result, see Fig. 2 as compared to Fig. 1.

At “25°C”, the simulated delay-time was in the 3 ms –16,000 s range, as compared to the 12 ms –17,000 s range of experimental delay-time. Thus, the “simulated to experimental” td ratio was 0.7 ± 0.3 (a figure significantly lower than unity, $p < 0.001$; cf. right part of Table 2). On the other hand, at “37°C”, the simulated td was in the 2 ms–0.7 s range, whereas the experimental one was the 5 ms–0.8 s. As a consequence, the average td ratio was 0.7 ± 0.1 s ($p < 0.001$). Thus, in terms of delay-time and with both temperature sets, the modified model was faster than experiments (by 30% on the average, 10–70% range).

Figure 2 illustrates the results obtained with an initial HbS concentration of 5.8 mM/l, at 24.4°C, i.e. in the same conditions as in Fig. 1, when the above parameters modifications are used. The continuous line represents model output, whereas open circles represent the experimental signal. It can be seen that the *modified* model is closer to experimental data: *rms* deviation was 0.10, and delay-times were 3 and 12 ms, respectively; curves n_H were 2.3 and 3.8, respectively.

Finally, although the adjustments did improve model outputs in comparison to the unmodified model (Table 2), the modified model did not fully reproduce the experimental curves and residual differences did persist. Simulated shape index remained significantly lower than experimental index. At “25°C”, simulated n_H was 3.0 ± 0.2 , vs. 5.8 ± 0.6 , and at “37°C” it was 2.6 ± 0.4 , vs. 5.9 ± 0.7 ($p < 0.001$ for both cases; see Table 2, column “ n_H ”). Residual *rms* deviations were 0.13 ± 0.01 at “25°C”, and 0.20 ± 0.05 at “37°C”.

4 Discussion

4.1 Why Model HbS Polymerization? What Are Its Main Determinants?

From a pathophysiological point of view, within microcirculation as well as in erythrocytes, HbS polymerization is primarily modulated by three factors (for a extensive review, see Eaton and Hofrichter 1990):

- (i) oxygenation, since only deoxygenated HbS can polymerize,
- (ii) total HbS concentration, since polymerization is highly sensitive to concentration,
- (iii) HbF fraction, since HbF cannot polymerize.

Oxygen-haemoglobin liganding varies along with the erythrocyte circulatory cycle, making this process tightly space and time-dependent. HbS concentration

depends on red cell density, through water content and ion transporters (e.g. potassium channels). Indeed, these features define erythrocyte subpopulations, differentially prone to sickling (Lew et al. 1997; Lew and Bookchin 2005). Regarding HbF, it is worthy to note that it can be therapeutically induced by hydroxyurea treatment, as well as natively present, in the so-called “F-cells” erythrocytes (Maier-Redelsperger et al. 1998). All these factors are strongly dependent on the addressed patient and on the erythrocyte subgroups. From a clinical point of view, they constitute influential factors of variability, which heavily hamper both patient diagnosis and therapeutical choices (see Steinberg 2005; Maier-Redelsperger et al. 1998).

It is our long-term project to integrate into a predictive model the dynamical influence of the above factors upon HbS polymerization, and thereof cellular, rheological and microcirculatory consequences. Obviously, one crucial substrate for such a construction will be a mathematical model covering the whole process of HbS polymerization, taking into account time and concentrations. Thus, the present study depicts the quantitative evaluation of the double nucleation model for HbS polymerization (Ferrone et al. 1985b), in its native, fully integrated form. This approach represents one step beyond the linear version, presented, validated and exploited until now (Ferrone et al. 1985b; Cao and Ferrone 1997; Rotter et al. 2005b).

4.2 Behavior of the Integrated Model

In our hands, when limited to the initial part of the process, the fully integrated double-nucleation model for HbS polymerization performs as accurately as its linear counterpart. This was quantitatively supported by the low root mean square deviation between simulations and experiments (about 5%). An additional support was provided by the agreement between simulated and experimental tenth-time, a quantity known approximate delay-time (Eaton and Hofrichter 1990). Of course, from a mathematical point of view, one expects that the integrated model tends towards its linear form when time tends to zero (C tending toward C_0).

The primary question was: how does the fully dynamic model fit the whole process of HbS polymerization when the free monomer concentration is allowed to reach its thermodynamical limit, i.e. the HbS solubility? In order to evaluate, as accurately as possible, model outputs with respect to experimental data, we have referred to three criteria (see Sect. 2). First, the delay-time was used since it is a fundamental characteristic of the process, from both experimental and mechanistic standpoints (see Galkin and Vekilov 2004; Eaton and Hofrichter 1990; Ferrone et al. 1980). Second, we used the “Hill number” as an index of the curves sigmoidicity, since experimental progress curves are markedly S-shaped. Third, we considered the “simulated versus experimental” *rms* deviation, as calculated in this case over the full dynamic range.

As shown in Table 2, the delay-time was consistently reproduced by the integrated model over the whole data set (within a factor of ~ 2). Thus, from this point of view, the fully integrated model behaves as the linearized one.

In contrast, when considered from initial HbS concentration to unsolubility, simulated polymerization curves strongly departed from experimental profiles. Indeed, the simulated curves were less “cooperative” than experimental’s, with a significantly lower index of sigmoidicity (n_H 1–2 vs. 4–6, see Table 2). As a consequence, the model is “slower” than experimental data. A close examination of the comparative data within the initial 10% phase already revealed some differences (see Fig. 1), despite the “reasonably” low *rms* deviation. This significant divergence between simulation by the fully integrated model and the experiments is the crucial observation of this study. Should one considers the predictive accuracy of the linearized model (see for instance Rotter et al. 2005a, b), this observation is somewhat surprising.

Simulated whole progress curves were less cooperative than the experimental ones. We hypothesized that the heterogeneous nucleation pathway, which endows the double-nucleation model with its autocatalytic property, was in some way underestimated. This could be due either to quantitative (and/or qualitative) errors and lacks in the thermo-kinetic description. In our view, to solve these discrepancies, many complementary paths will have to be explored, pertaining to the chemical-physics. Among them, we anticipate that the influence of the polymers, in terms of their shapes, sizes and concentrations, upon the activity coefficients of model species) will prove decisive and significant in better describing HbS polymerization.

Before resorting to this approach, we explored the possibility that the uncertainties about the five “optimized” parameters could explain part of the divergence of the simulated polymerization from experimental data.

4.3 Numerical Adjustment of the Integrated Model

We reasoned that adjustments of the parameters values could improve the output of the integrated model with respect to experiments. Presentation and analysis of the various sources of errors and uncertainties in the model can be found in the seminal model (Ferrone et al. 1985b) and in subsequent published modifications (see Table 2). The main points are listed below :

- (i) experimental errors per se,
- (ii) errors derived from the original fit of experimental data to the linear model (initial 10%),
- (iii) errors derived from subsequent optimizations (e.g. constrained with an experimentally derived value for the bimolecular addition rate constant, k_+),
- (iv) uncertainties inherent to the double nucleation model assumptions and simplifications.

The fact that the delay-time was preserved by the model in whole progress curves, together with a close inspection of relevant publications, strongly suggest that the homogeneous pathway is well described (e.g. Cao and Ferrone 1997; see also Table 2).

One of the reasons why the homogeneous pathway proved to be easier to analyze than the heterogeneous one resides in the fact that it can be “straightforwardly”

evidenced and quantified in experiments (e.g. Galkin and Vekilov 2004; Cao and Ferrone 1997; Samuel et al. 1990). Conversely, the heterogeneous pathway proved to be much more difficult to describe (Ferrone et al. 1985b, 2002; Rotter et al. 2005b).

Thus, it appears most likely that the marked divergence between simulated and experimental progress curves is due to an underestimation of the heterogeneous pathway rate. Our view is supported by the significant improvement of the fit, *via* the phenomenological adjustment of the model parameters involved in the heterogeneous pathway. These parameters are $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$, an energetic term describing the stability (and thus the concentration) of the heterogeneous nuclei, and ϕ , a geometric term describing the fraction of polymerized monomers involved in the attachment of such nuclei to a polymer fibre (see Table 1).

As shown in Table 1, in addition to $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$ and ϕ , another model parameter is involved in heterogeneous process, $\sigma_1 \cdot \mu_{cc}$. However, we observed that modifications of this one parameter (up to $\pm 50\%$), alone or in combination with others, did not significantly improve the fit of simulation to experiment (data not shown). We interpret this as due to the low value of this parameter ($\ll 10^{-3}$ kcal/mM), that would restrain its numerical influence upon the model, especially as compared to $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$, (about 6×10^{-3} kcal/mM, i.e. more than 50-fold greater, see Table 1).

Concerning the other two parameters (k_+ and μ_{pc} , see Table 1), a manual and extensive, search revealed the simulation to experiment fit could not be improved through them. In other words, among all the tested combinations, those that proved efficient to some extent consistently involved a modification of $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$ and/or ϕ . Simultaneous modifications of both of these parameters, as reported in Table 2, were the most efficient and significant. This is the second main observation of this study.

Both $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$ and ϕ directly control the heterogeneous nuclei concentration, hence the heterogeneous pathway rate, via the equilibrium constant of heterogeneous nuclei attachment to pre-existing polymers. At “25°C”, the first one parameter, $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$, has to be modified by a constant factor of “1.4”, for optimal gain. At “37°C”, the modification factor is 1.5 instead. Although this value did yield a better fit “improvement” than “1.4”, the difference between the two factors is likely circumstantial, for two reasons :

- (i) their relative difference is small (less than 10%),
- (ii) the thermodynamical equations used to describe the temperature dependence of the heterogeneous pathway parameters (equations first introduced in Cao and Ferrone 1997) led to the addition of six new parameters (enthalpic and entropic terms), that were in turn identified by optimization (see Ferrone et al. 2002, and Table 1 therein).

By the rationale above, and for the sake of simplicity, we will ignore the effect of temperature in the following part of the discussion.

Whereas the changes brought to $\sigma_2 \cdot \mu_{cc}$ could be kept constant all over the concentration range (C_o), the parameter ϕ had to be differentially corrected along C_o . Our interpretation is that the global optimization procedures, as carried out upon all five parameters in the seminal model (Ferrone et al. 1985b) or upon four of them (Cao and Ferrone 1997: k_+ fixed by experiments), yielded strongly interdependent values. Even more, this (otherwise unescapable) flaw has been combined with the

use of zero-time linearized model(s), bringing forth several unrealistic consequences. For one, it constrained HbS monomer concentration to a constant value (C_o). In turn, this forced static sizes for the nuclei (i^* and j^*) and actually static values for all “dynamic parameters” depending on monomer concentration (see “Appendix”). Secondly, the linear model ignored the various, dynamic as well, contributions and effects of polymers. Indeed, during the polymerization process, monomers are consumed and their concentration decreases (eventually reaching solubility).

By the same rationale, polymers (fibers and polymerized monomers) increase along the process and they likely modify, in a profound way, the properties of the monomers–polymers–water “solution” (e.g. molecular crowding: Minton 1981, 1998; see also Boublik 1974). Indeed, it is worthwhile to recall here is that one major achievement of the double nucleation model, both from a qualitative and quantitative standpoint, is the explicit and analytic inclusion of the excluded volume-dependent activity coefficients of (i) the free HbS monomers, (ii) the homogeneous and heterogeneous nuclei (see Ferrone et al. 1985b; Rotter et al. 2005b).

5 Conclusion

In fine, our project and studies aim at exploiting the double-nucleation model in order to quantitatively predict HbS polymerization, as it occurs under the actual, dynamic conditions prevailing in erythrocytes and microvessels. We anticipate that this would provide a useful tool for the clinical management of the sickle cell disease patients and the prevention of vaso-occlusive episodes. The results reported here show that the (otherwise validated) double-nucleation model for HbS polymerization cannot be used as such and must be adapted. The first line of modifications concerns the inclusion of relevant physico-chemical aspects. A more realistic description of molecular crowding and activity coefficients is under current evaluation.

Acknowledgements We wish to thank Prof. Lionel Lelièvre and Prof. Françoise Heymans (EA 2381, *Pharmacochimie Moléculaire et Systèmes Membranaires*) for their support to Ms. Terkia Medkour. This work was supported by the CNRS (Patrick Hannaert & Terkia Medkour), the INSERM (Patrick Hannaert), and the University of Paris 7 Denis Diderot (Terkia Medkour). For the initial part of this work (2004, model implementation with Simulink[®]) Terkia Medkour was supported by a research grant from the EFS (*Etablissement Français du Sang*).

Appendix

The Double Nucleation Model

As mentioned in Sect. 2, the core equations of the double nucleation model of HbS polymerization relate to the three main kinetic equations involving monomers and polymers:

- removal of free HbS monomers from the solution by the elongation of polymers (or “fibers endings”; see Eaton and Hofrichter 1990); this corresponds to core equation 1,
- production of polymers by the two nucleation pathways; this corresponds to core equation 2, which is actually sub-described into (2a), for homogeneous pathway, and (2b) or (2c) for heterogeneous pathway (depending on j^*),
- conservation of total concentration of HbS monomer; this corresponds to core equation 3.

1. Removal of HbS monomers from the solution by the elongation (core equation 1):

$$\frac{-dC}{dt} = k_+ \cdot (\gamma \cdot C - \gamma_S \cdot C_S) \cdot C_p \quad (1)$$

Along time-wise integration, this equation yields C ; the process stops at solubility, C_S .

2. Generation of polymer fibers (elongating fibers endings; core Eq. 2) by homogeneous (2a) and heterogeneous (2b) pathways:

$$\frac{dC_p}{dt} = v_{hon} + v_{hen} \quad (2)$$

with

$$v_{hon} = \left(\frac{k_+ \cdot K_{i^*}}{\gamma_{i^*+1}} \right) \cdot (\gamma \cdot C)^{i^*+1} \quad (2a)$$

(v_{hon} , homogeneous pathway, i.e. addition of a monomer to the homogeneous nucleus, in solution) where,

- i^* represents the size of the critical nucleus (on a monomer basis)

$$i^* = \frac{-(4 \cdot R \cdot T + \delta_1 \cdot \mu_{pc})}{R \cdot T \cdot \ln(S)}$$

For brevity, equations for activity coefficients (“gamma’s”) are omitted here; they are detailed in Ferrone et al. 1985b.

- S , supersaturation = $\gamma \cdot C / \gamma_S \cdot C_S$
- δ_1 and δ_2 are parameters describing the fraction of contacts, as normally present in the “infinite” polymer, that are actually formed in an homogeneous aggregate of size “ i^* ” $\delta_1 = 1.29$, $\delta_2 = 0.84$ (see Ferrone et al. 1985b)
- K_{i^*} , apparent equilibrium constant for the aggregation of “ i^* ” monomers into the critical homogeneous nucleus (F. Ferrone, unpublished: modified form of Eq. A3.13 in Ferrone et al. 1985b):

$$\ln(K_{i^*}) = \xi \cdot \ln(\ln(S)) - \frac{\xi}{\ln(S)} \cdot \ln(\gamma \cdot C) + \xi \cdot (1 - \ln(\xi)) + \ln(\gamma_S \cdot C_S) + \ln\left(\frac{\sqrt{8}}{\rho}\right) + (\delta_2 - 1) \frac{\mu_{pc}}{R \cdot T}$$

Calculation of the Heterogeneous Pathway Rate

For the calculation of v_{hen} , rate of addition of a monomer to the heterogeneous nucleus (onto existing polymers), two cases are distinguished, depending on j^* , the actual size of

the heterogeneous nucleus, as compared to the j_{max} limit ($j_{max} = -\sigma_2\mu_{cc}/\sigma_1\mu_{cc}$), corresponding to the size beyond which its attachment area to the polymer (thus the chemical interaction potential) does not increase any more (Ferrone et al. 1985b):

- case 1 : $j^* < j_{max}$

$$j^* = \frac{\xi_2}{\ln(S) + \xi_1}$$

with

$$\xi_1 = \frac{-\sigma_1 \cdot \mu_{cc}}{R \cdot T}, \quad \xi = -(4 + \frac{\delta_1 \mu_{pc}}{R \cdot T}), \quad \xi_2 = \xi + 4 + \frac{\sigma_2 \mu_{cc}}{R \cdot T}$$

in which case,

$$v_{hen} = k_+ \cdot \left[\frac{\ln(S + \xi_1)}{\xi_2} \right]^{\xi_2} \cdot e^{\xi_2} \cdot \gamma \cdot C \cdot \Gamma \cdot C_{poly} \tag{2b}$$

- case 2: $j^* \geq j_{max}$

$$j^* = i^* + (1/\ln S)$$

in that case,

$$v_{hen} = k_+ \cdot C_{j^*} \cdot (\gamma \cdot C) \cdot \Gamma \tag{2c}$$

with

$$\ln(C_{j^*}) = \ln(\Phi \cdot (C_0 - C)) + j^* \cdot \ln(S) + \frac{\delta_1 \cdot \mu_{pc} + 3 \cdot R \cdot T}{R \cdot T} \cdot \ln(j^*) + \frac{\delta_2 \cdot \mu_{pc}}{R \cdot T} - \frac{\mu_{jCmax}}{R \cdot T} - 3 \cdot \ln(j_{max})$$

μ_{jCmax} , the chemical potential of the critical heterogeneous nucleus (F. Ferrone, unpublished correction of a typographical error of Eq. A3.22, in Ferrone et al. 1985b), is

$$\mu_{jCmax} = \frac{-\sigma_2 \mu_{cc}}{\ln(\frac{1}{j_{max}}) + 1}$$

3. Concentration of polymerized monomers, calculated from total HbS conservation (core equation 3):

$$C_{poly} = C_o - C \tag{3}$$

Model variables and units are presented in Sect. 2. Main HbS-related constants used:

- V , monomer specific volume = 0.0497 l/mM (0.767 cm³/g)
- C_{pp} , monomer concentration in polymer phase = 10.8 mM/l (0.69 g/cm³)
- ρ , monomer density, relative to polymer = 0.537 ($C_{PP} \times V$)

References

Boublik T (1974) Statistical thermodynamics of convex molecule fluids. Mol Phys 27:1415–1427
 Cao Z, Ferrone FA (1997) Homogeneous nucleation in sickle haemoglobin: stochastic measurements with a parallel method. Biophys J 72(1):343–352

- Eaton WA, Hofrichter J (1990) Sick cell haemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem* 40:63–279
- Ferrone FA, Hofrichter J, Sunshine H, Eaton WA (1980) Kinetic studies on photolysis induced gelation of sickle cell haemoglobin suggest a new mechanism. *Biophys J* 32:361–377
- Ferrone FA, Hofrichter J, Eaton WA (1985a) Kinetics of sickle haemoglobin polymerization. I. Studies using temperature-jump and laser photolysis techniques. *J Mol Biol* 183(4):591–610
- Ferrone FA, Hofrichter J, Eaton WA (1985b) Kinetics of sickle haemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism. *J Mol Biol* 183(4):611–631
- Ferrone FA, Ivanova M, Jasuja R (2002) Heterogeneous nucleation and crowding in sickle haemoglobin: an analytic approach. *Biophys J* 82(1):399–406
- Galki O, Vekilov PG (2004) Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia haemoglobin in deoxy State. *J Mol Biol* 336:43–59
- Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Lond)* 40:iv–vii
- Hofrichter J, Ross PD, Eaton WA (1976) Supersaturation in sickle cell haemoglobin solutions. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:3035–3039
- Ivanova M, Jasuja R, Kwong S, Briehl RW, Ferrone FA (2000) Nonideality and the nucleation of sickle haemoglobin. *Biophys J* 79(2):1016–1022
- Kaul DK, Fabry ME, Nagel RL (1996) The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes. *Blood Rev* 10(1):29–44
- Lew VL, Bookchin RM (2005) Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiol Rev* 85(1):179–200
- Lew VL, Ortiz OE, Bookchin RM (1997) Stochastic nature and red cell population distribution of the sickling-induced Ca²⁺ permeability. *J Clin Invest* 99(11):2727–2735
- Maier-Redelsperger M, de Montalembert M, Flahault A, Neonato MG, Ducrocq R, Masson MP, Girot R, Elion J (1998) Fetal haemoglobin and F-cell responses to long-term hydroxyurea treatment in young sickle cell patients. The French Study Group on Sickle Cell Disease. *Blood* 91(12):4472–4479
- Minton AP (1981) Excluded volume as a determinant of macromolecular structure and reactivity. *Biopolymers* 20:2093–2120
- Minton AP (1998) Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. In: Johnson GK AaML (ed), *Methods in enzymology*. Academic Press, San Diego, pp 127–149
- Rotter M, Aprelev B, Adachi K, Ferrone FA (2005a) Molecular crowding limits the role of fetal haemoglobin in therapy for sickle cell disease. *J Mol Biol* 347(5):1015–1023
- Rotter MA, Kwong S, Briehl RW, Ferrone FA (2005b) Heterogeneous nucleation in sickle haemoglobin: experimental validation of a structural mechanism. *Biophys J* 89(4):2677–2684
- Samuel RE, Salmon ED, Briehl RW (1990) Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin. *Nature* 345:833–835
- Steinberg MH (2005) Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 129(4):465–481

ANNEXE II

Ajustement de la non-idealité d'encombrement moléculaire :

Application de la CPT

et dérivation des équations des coefficients d'activité

AII-1. LA THEORIE « CPT » DES PARTICULES CONVEXES

AII-1-A. VOLUME EXCLU ET CO-VOLUME

AII-1-B. VOLUME EXCLU ET ACTIVITE

AII-2. LES EQUATIONS CPT DES COEFFICIENTS D'ACTIVITE

AII-3. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AII-1. LA THEORIE « CPT » DES PARTICULES CONVEXES

La SPT (« Scaled Particles Theory ») a été étendue en CPT (« Convex Particle Theory ») pour traiter le cas d'une solution avec des particules solides de différentes tailles et formes [Boublik 1974; Minton 1998; Hall and Minton 2002; Hall and Minton 2003; Hall and Minton 2004]. Nous avons utilisé la CPT pour décrire la non-idéalité d'encombrement moléculaire dans les modèles III et IV (cf. *Résultats*, sections VI-3 et VI-4).

AII-1-A. VOLUME EXCLU ET CO-VOLUME

Si l'on considère une molécule individuelle « test », dans un environnement moléculaire d'arrière-plan (c.a.d. non-réactif), le « volume exclu » se réfère au volume de solution qui est non-accessible au centre de masse de cette molécule [Zimmerman and Minton 1993].

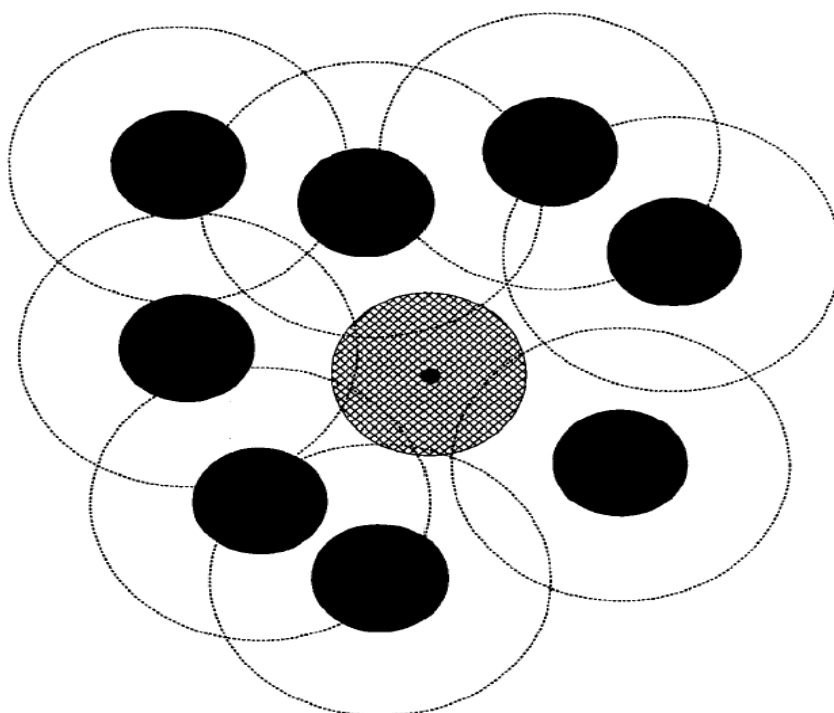


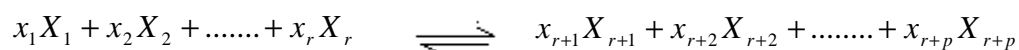
Figure AII-1 : Illustration du concept de volume exclu
(Zimmerman and Minton, 1993)

La figure AII-1 illustre le volume disponible à une particule *test* (disque central hachuré) dans une solution contenant des particules arrière plan (sphères solides). Chaque particule se trouve au centre d'une région sphérique, indiquée dans le plan de la figure par un cercle discontinu. Cette région représente le *covolume* de la particule *test* et des particules d'arrière-plan, volume effectivement inaccessible au centre de masse de la particule (point noir). Le volume accessible à la particule *test*, est défini comme égal au volume total de la solution, diminué du *covolume* [Zimmerman and Minton 1993]. Par exemple, à la concentration standard de l'hémoglobine (5 mM), avec un volume spécifique de 0,73 cm³/g et un poids moléculaire de 64 000 g/mol (cf. Matériel et méthodes), la fraction de volume de la solution occupé par l'hémoglobine elle-même est de 27% environ.

AII-1-B. VOLUME EXCLU ET ACTIVITE

Toutes les données expérimentales et toutes les analyses théoriques portant sur les propriétés thermodynamiques et fonctionnelles des protéines, en milieux ou solutions non-idéaux, indiquent que le volume exclu (par des macromolécules, protéines, polymères,...) à ces mêmes protéines est un facteur déterminant majeur de leur conformation et de leur fonction (pour revues et références, [Zimmerman and Minton 1993 ; Minton 1998]). La thermodynamique et la thermodynamique statistique sont exploitées pour quantifier le volume exclu, et son influence sur l'équilibre et la cinétique des réactions.

Thermodynamique préliminaire : influence des solutés d'arrière-plan. Considérant la réaction générale suivante, se produisant en solution :



où X_i représente la $i^{\text{ème}}$ espèce de réactant ou de produit, x_i représente le coefficient stoechiométrique de cette espèce, r et p représente respectivement le nombre total des

réactants et des espèces produits. L'unité de réaction correspond à la conversion stœchiométrique de chaque réactant en produit. La constante d'équilibre thermodynamique, à température et pression constantes est donnée par [Minton 1998]:

$$K^\circ(T, P) = \frac{\prod_{i=\gamma+1}^{\gamma+p} a_i^{x_i}}{\prod_{i=1}^{\gamma} a_i^{x_i}} \quad (\text{AII-7})$$

où a_i représente l'activité thermodynamique de la $i^{\text{ème}}$ espèce.

Bien que l'activité puisse être définie *a priori* dans toute échelle de concentration, il convient d'utiliser la concentration molaire pour C , car elle est directement proportionnelle à la densité numérale (« number density » ; Minton, 1998) :

$$a_i(\{C\}) = \gamma_i(\{C\})C_i \quad (\text{AII-8})$$

où C représente un ensemble de concentrations de solutés définissant la composition de la solution. Il faut souligner que la spécification de C inclus les concentrations des espèces « d'arrière-plan » aussi bien que les espèces en réaction. Le coefficient d'activité γ_i est une mesure de la différence entre le potentiel chimique des espèces i à composition définie de la solution et le potentiel chimique *idéal* [Minton 1998] :

$$RT \ln \gamma_i(\{C\}) \equiv \mu_i(\{C\}) - \mu_i^{ideal} \quad (\text{AII-9})$$

où

$$\mu_i \equiv \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{T, P, \{C\}}$$

et

$$\mu_i^{ideal} \equiv \lim_{\{C\} \rightarrow 0} \mu_i$$

Les équations (VI-7) et (VI-8) peuvent être réarrangées en une expression de la constante apparente d'équilibre de la réaction, constante définie comme fonction de la concentration au lieu de l'activité :

$$K(T, P, \{C\}) \equiv \frac{\prod_{i=\gamma+1}^{\gamma+p} C_i^{x_i}}{\prod_{i=1}^{\gamma} C_i^{x_i}} \quad (\text{AII-10})$$

où,

$$\Gamma \equiv \frac{\prod_{i=\gamma}^r \gamma_i^{x_i}}{\prod_{i=\gamma+1}^{\gamma+p} \gamma_i^{x_i}} \quad (\text{AII-11})$$

Suivant cette analyse, l'effet des espèces solutés sur l'équilibre est manifesté au travers de l'effet de ces solutés sur les coefficients d'activité de chacun des solutés et des espèces réactant et donc sur le facteur de la « non idéalité » Γ .

Calcul des coefficients d'activité via les modèles de thermodynamique statistiques. Suivant la théorie de la mécanique statistique des solutions de McMillan et Mayer (cité par [Zimmerman and Minton 1993]), le coefficient d'activité de la $i^{\text{ème}}$ espèce de soluté peut être écrit comme une expansion en terme des concentrations de toutes les espèces :

$$\ln \gamma_i \sum_j B_{ij} C_j + \sum_{j,k} B_{ijk} C_j C_k + \dots \quad (\text{AII-12})$$

où les coefficients d'interaction (« virial coefficient ») B_{ij}, B_{ijk}, \dots peuvent être formellement calculés comme une fonction du potentiel effectif des forces (« champ moyen ») agissant entre un nombre arbitraire de solutés. Pour « deux corps », le coefficient d'interaction est donné par :

$$B_{ij} = 4\pi N_A \int_{r=0}^{\infty} \left\{ 1 - \exp[-U_{ij}(r_{ij}) / kT] \right\} r_{ij}^2 dr_{ij} \quad (\text{AII-13})$$

où N_A est le nombre d'Avogadro, r_{ij} est la distance entre les centres de masse des deux particules en interaction, et U_{ij} est le potentiel moyen des forces agissant entre les molécules de soluté de la $i^{\text{ème}}$ et de la $j^{\text{ème}}$ espèces. Pour la cas spécial d'une seule espèce de particule, l'équation (VI-12) se réduit à :

$$\ln \gamma = B_2 C + B_3 C^2 + \dots \quad (\text{AII-14})$$

où $B_2 = B_{ii}, B_3 = B_{iii}, \text{etc}$

Modèles de particules solides. Les propriétés colligatives des solutions de protéines globulaires est très bien approximé, dans une très large gamme de concentrations, par un modèle dans lequel le potentiel moyen des forces est représenté par un simple potentiel de sphères solides « dures », mutuellement impénétrables:

$$U(r_{ij}) = \begin{cases} \infty & r_{ij} \leq r_i + r_j \\ 0 & r_{ij} > r_i + r_j \end{cases} \quad (\text{AII-15})$$

Cette approximation mène au modèle de particules solides des solutions à macro-solutés rigides (Ross and Minton, 1977), suivant lequel chaque molécule de soluté est représentée par une particule solide « équivalente ».

Application de la SPT. La SPT (*Scaled Particle Theory*, cf. Chap. III, section III-4)) peut être appliquée à des solutions contenant une seule espèce (taille et forme uniques). Pour un ensemble de particules solides sphériques, les coefficients d'interaction au-delà de B_7 ont été évalués analytiquement et *via* intégration numérique, et les deux types de résultats coïncident de façon satisfaisante ([Zimmerman and Minton 1993; Hall and Minton 2003]) :

$$\begin{array}{ll} B_2 = 8v & B_5 = 35,30v^4 \\ B_3 = 15v^2 & B_6 = 47,4 v^5 \\ B_4 = 24,48v^3 & B_7 = 65,9 v^6 \end{array}$$

Il a été observé que B_6 et B_7 peuvent être calculé de B_5 en utilisant la relation empirique suivante :

$$B_n = 0.171B_2B_{n-1} \quad (\text{AII-16})$$

Ceci suggère que les coefficients d'interaction, entre sphères solides dures, d'ordre « élevé » peuvent être estimés de façon fiable avec cette extrapolation empirique. La combinaison des équations (VI-14) et (VI-15) donne :

$$\begin{aligned} \ln \gamma &= B_2C + B_3C^2 + B_4C^3 + B_5C^4 \sum_{i=0}^{\infty} (0.171B_2C)^i \\ &= B_2C + B_3C^2 + B_4C^3 + B_5C^4 \left(\frac{1}{1-0.171B_2C} \right) \end{aligned} \quad (\text{AII-17})$$

L'équation (VI-17) prédit que le potentiel chimique d'une sphère dans une solution de sphères solides peut diverger quand le dénominateur du dernier terme s'annule, c'est-à-dire quand $0.171B_2C \rightarrow 1$. B_2C est égal à 8Φ , où Φ est la fraction du volume total occupé par les sphères. Enfin, l'équation (VI-17) prédit que Φ ne peut pas excéder la valeur $1/(0.171 \times 8) = 0.73$, en accord avec la fraction de volume occupé par des sphères solides identiques dans un empilement compact de type « *hexagonal close packing* » (HCP ; densité 0,74).

AII-2. LES EQUATIONS « CPT » DES COEFFICIENTS D'ACTIVITE

Application de la CPT. Le domaine d'application de la SPT (décrite ci-dessus) a été étendu pour traiter le cas d'une solution avec des particules solides de différentes tailles et formes. La théorie résultante est la « théorie des particules convexes », CPT (« Convex Particle Theory » ; cf. [Boublik 1974] ; pour revues, cf. [Minton 1998; Hall and Minton 2002;

Hall and Minton 2003; Hall and Minton 2004]). Nous avons utilisé la CPT pour calculer les coefficients d'activité des particules (ainsi que Γ), dans l'hypothèse où la solution est composée de deux classes géométriques de particules « dures » (ie. non interpénétrables), à savoir des sphères « dures » (monomères de HbS et noyaux homogènes) et de cylindres (fibres polymères).

La non-idéalité induite par des particules convexes dépend de la fonction de longueur (décrite ci-après), ainsi que de la surface S_i et du volume V_i [Boublik 1974]. L'indice i représente la classe de la particule décrite (exemple : monomère ou polymère ou toute autre espèce spécifique de morphologie spécifique convexe). La fonction de longueur, notée H_i (« Helper », appelée aussi fonction de Kihara), est égale à une demi-projection de la particule « i » sur un axe directionnel, moyenné sur toutes les orientations possibles de la particule relativement à cet axe. L'expression analytique du coefficient d'activité d'une particule « i » est :

$$\ln \gamma_i = -\ln(1 - \langle\langle V \rangle\rangle) + \frac{H_i \langle\langle S \rangle\rangle + S_i \langle\langle H \rangle\rangle + V_i \langle\langle 1 \rangle\rangle}{1 - \langle\langle V \rangle\rangle} \quad (\text{AII-18})$$

$$+ \frac{H_i^2 \langle\langle S \rangle\rangle^2 + 2V_i \langle\langle H \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle}{2(1 - \langle\langle V \rangle\rangle)^2} + \frac{V_i \langle\langle H^2 \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle^2}{3(1 - \langle\langle V \rangle\rangle)^3}$$

où $\langle\langle X \rangle\rangle \equiv \sum \rho_k X_k$ et $\langle\langle 1 \rangle\rangle \equiv \sum \rho_k$.

ρ_k représente la densité numérale de la $k^{\text{ième}}$ classe présente en solution.

Nota bene : Nous avons utilisé la CPT pour le calcul des coefficients d'activité (et de « big gamma », Γ) dans les modèles II, III et IV.

Hypothèses générales :

H1. La concentration des noyaux est faible par rapport aux concentrations des monomères et des fibres, leur densité numérale est donc négligée (pas de classe « noyaux »).

H2. Les monomères et les noyaux ont une forme sphérique.

H3. Les fibres ont une forme de cylindre droit.

Deux classes ont donc été définies, les monomères (sphères, « i » = 1) et les fibres polymères (cylindres droits, « i » = 2), et l'équation générale suivante a été utilisée :

$$\ln \gamma_i = -\ln(1 - \langle\langle V_i \rangle\rangle) + \frac{H_i \langle\langle S \rangle\rangle + S_i \langle\langle H \rangle\rangle + V_i \langle\langle 1 \rangle\rangle}{1 - \langle\langle V \rangle\rangle} + \frac{H_i^2 \langle\langle S \rangle\rangle^2 + 2V_i \langle\langle H \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle}{2(1 - \langle\langle V \rangle\rangle)^2} + \frac{V_i \langle\langle H^2 \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle^2}{3(1 - \langle\langle V \rangle\rangle)^3}$$

(AII-19)

$$\text{où, } \langle\langle X \rangle\rangle = \sum \rho_k X_k \text{ et } \langle\langle 1 \rangle\rangle = \sum \rho_k$$

ρ_k : densité numérale = $N_a \cdot C$

N_a : nombre d'avogadro

C : concentration

H_i : fonction de Kihara de la particule i

S_i : aire de la particule i

V_i : volume de la particule i

Monomères : Les monomères de HbS sont assimilés à des sphères (H2) de rayon r

La surface des monomères : $S = 4 \pi r^2$

Le volume des monomères : $v = \frac{4}{3} \pi r^3$

La fonction de Kihara associée aux monomères : $H = r$

Noyaux : Les noyaux activés, homogènes (i^*+1), sont assimilés à des sphères (H2), de volume :

$$V_{i^*+1} = (i^*+1) \frac{v}{\rho} \quad (\text{éq A1,3 pp625, Ferrone et coll., 1985b})$$

ρ : est la densité relative du monomère dans le polymère

i^* : la taille en nombre de monomères du noyau critique homogène

$$\frac{V_{i^*+1}}{v} = \frac{i^*+1}{\rho} = \left(\frac{R_{i^*+1}}{r} \right)^3 \Rightarrow R_{i^*+1} = \left(\frac{i^*+1}{\rho} \right)^{\frac{1}{3}} r$$

$$\frac{H_{i^*+1}}{H} = \frac{R_{i^*+1}}{r} = \left(\frac{i^*+1}{\rho} \right)^{\frac{1}{3}}$$

$$\frac{S_{i^*+1}}{S} = \left(\frac{R_{i^*+1}}{r} \right)^{\frac{2}{3}}$$

Fibres polymères : Les fibres polymères sont assimilées à des cylindres droits (H3) de volume :

$$V_f = \frac{C_{poly}}{C_p} \frac{v}{\rho}$$

C_{poly} : concentration des monomères polymérisés

C_p : concentration des fibres polymères

NB : le rapport des monomères polymérisés à la concentration de fibres polymères (C_{poly}/C_p) représente la taille moyenne des fibre, exprimée en nombre de monomères

$$\frac{H_f}{H} = \frac{\left(\frac{\pi}{4} + \frac{L}{2}\right)R_f}{r}$$

$$R_f = 3.3r$$

$$\frac{H_f}{H} = \left(\frac{\pi}{4} + \frac{L}{2}\right)3.3$$

$$\frac{S_f}{S} = \frac{2\pi(2L+1)R_f^2}{4\pi r^2} = \frac{1}{2}(2L+1)(3.3)^2$$

$$L = \frac{\left(\frac{C_{poly}}{14C_p}\right)6.4}{2R_f} = \frac{C_{poly}}{C_p}(0.02177)$$

On pose $l = \frac{C_{poly}}{C_p}$

$$V_f = \frac{l.v}{\rho}$$

$$H_f = (0.03592.l + 2.5905)H$$

$$S_f = (0.2371.l + 5.445)S$$

Coefficient d'activité des monomères :

$$1 - \langle\langle v \rangle\rangle = 1 - v\left(C + \frac{l}{\rho}C_p\right)$$

$$\underline{H_i \langle\langle S \rangle\rangle + S_i \langle\langle H \rangle\rangle + V_i \langle\langle 1 \rangle\rangle} :$$

$$H_i \langle\langle S \rangle\rangle + S_i \langle\langle H \rangle\rangle + V_i \langle\langle 1 \rangle\rangle = H[S.C + S_f.C_p] + S[H.C + H_f.C_p] + v[C + C_p]$$

$$H.S = 3v$$

$$H_i \langle\langle S \rangle\rangle + S_i \langle\langle H \rangle\rangle + V_i \langle\langle 1 \rangle\rangle = v.[7C + (0.81906.l + 25.1065).C_p]$$

$$\underline{H_i^2 \langle\langle S \rangle\rangle^2 + 2V_i \langle\langle H \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle} :$$

$$H_i^2 \langle\langle S \rangle\rangle^2 + 2V_i \langle\langle H \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle = H^2 [S.C + S_f.C_p]^2 + 2.v.[H.C + H_f.C_p][S.C + S_f.C_p]$$

$$H^2.S^2 = 9.v^3$$

$$H_i^2 \langle\langle S \rangle\rangle^2 + 2V_i \langle\langle H \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle = v^2 [C + (0.2371.l + 5.445).C_p] [15C + (2.34942.l + 64.548).C_p]$$

$$\underline{V_i \langle\langle H^2 \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle^2} :$$

$$V_i \langle\langle H^2 \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle^2 = v.[H^2.C + H_f^2.C_p][S.C + S_f.C_p]^2$$

$$V_i \langle\langle H^2 \rangle\rangle \langle\langle S \rangle\rangle^2 = 9v^3 [C + (0.03592.l + 2.5905)^2 C_p] [C + (0.2371.l + 5.445)C_p]^2$$

$$\begin{aligned} \ln \gamma = & -\ln \left[1 - v \left(C + \frac{l}{\rho} C_p \right) \right] + \frac{v [7C + (0.81906.l + 25.1065)C_p]}{1 - v \left(C + \frac{l}{\rho} C_p \right)} \\ & + \frac{v^2 [C + (0.2371.l + 5.445)C_p] [7.5C + (1.17471.l + 32.274)C_p]}{[1 - v \left(C + \frac{l}{\rho} C_p \right)]^2} \\ & + \frac{3v^3 [C + (0.03592.l + 2.5905)^2 C_p] [C + (0.2371.l + 5.445)C_p]^2}{[1 - v \left(C + \frac{l}{\rho} C_p \right)]^3} \end{aligned} \quad (\text{AII-20})$$

Le coefficient d'activité des noyaux homogènes :

$$\underline{H_{i^{*+1}} \ll S \gg + S_{i^{*+1}} \ll H \gg + V_{i^{*+1}} \ll 1 \gg} :$$

$$H_{i^{*+1}} \ll S \gg + S_{i^{*+1}} \ll H \gg + V_{i^{*+1}} \ll 1 \gg = H_{i^{*+1}} [S.C + S_f.C_p] + S_{i^{*+1}} [H.C + H_f.C_p] + V_{i^{*+1}} [C + C_p]$$

$$H_{i^{*+1}} \ll S \gg + S_{i^{*+1}} \ll H \gg + V_{i^{*+1}} \ll 1 \gg = 3v \left[\frac{(i^{*+1})}{\rho} \right]^{\frac{1}{3}} [C + (0.2371l + 5.445)C_p]$$

$$+ 3v \left[\frac{(i^{*+1})}{\rho} \right]^{\frac{2}{3}} [C + (0.03592l + 2.5905)C_p] + \frac{(i^{*+1})}{\rho} v [C + C_p]$$

$$\underline{H_{i^{*+1}}^2 \ll S \gg^2 + 2V_{i^{*+1}} \ll H \gg \ll S \gg} :$$

$$H_{i^{*+1}}^2 \ll S \gg^2 + 2V_{i^{*+1}} \ll H \gg \ll S \gg = H_{i^{*+1}}^2 [S.C + S_f.C_p]^2 + 2.V_{i^{*+1}} \cdot [H.C + H_f.C_p] [S.C + S_f.C_p]$$

$$H_{i^{*+1}}^2 \ll S \gg^2 + 2V_{i^{*+1}} \ll H \gg \ll S \gg = 9.v^2 \left[\frac{(i^{*+1})}{\rho} \right]^{\frac{2}{3}} [C + (0.2371l + 5.445)C_p]^2$$

$$+ 6.v^2 \frac{(i^{*+1})}{\rho} [C + (0.03592l + 2.5905)C_p] [C + (0.2371l + 5.445)C_p]$$

$$\underline{V_{i^{*+1}} \ll H^2 \gg \ll S \gg^2} :$$

$$V_{i^{*+1}} \ll H^2 \gg \ll S \gg^2 = V_{i^{*+1}} \cdot [H^2.C + H_f^2.C_p] [S.C + S_f.C_p]^2$$

$$V_{i^{*+1}} \ll H^2 \gg \ll S \gg^2 = 9.v^3 \cdot \frac{(i^{*+1})}{\rho} [C + (0.03592l + 2.5905)C_p]^2 [C + (0.2371l + 5.445)C_p]^2$$

$$\ln \gamma_{i^{*+1}} = -\ln\left[1 - v\left(C + \frac{l}{\rho} C_p\right)\right]$$

$$\begin{aligned} & + \frac{3v \left[\frac{(i^{*+1})}{\rho}\right]^{\frac{1}{3}} [C + (0.2371l + 5.445)C_p] + 3v \left[\frac{(i^{*+1})}{\rho}\right]^{\frac{2}{3}} [C + (0.03592l + 2.5905)C_p] + \frac{(i^{*+1})}{\rho} v [C + C_p]}{[1 - v(C + \frac{l}{\rho} C_p)]} \\ & + \frac{4.5v^2 \left[\frac{(i^{*+1})}{\rho}\right]^{\frac{2}{3}} [C + (0.2371l + 5.445)C_p]^2 + 3v^2 \frac{(i^{*+1})}{\rho} [C + (0.03592l + 2.5905)C_p] [C + (0.2371l + 5.445)C_p]}{[1 - v(C + \frac{l}{\rho} C_p)]^2} \\ & + \frac{3v^3 \frac{(i^{*+1})}{\rho} [C + (0.03592l + 2.5905)C_p]^2 [C + (0.2371l + 5.445)C_p]^2}{[1 - v(C + \frac{l}{\rho} C_p)]^3} \end{aligned} \quad (\text{AII-21})$$

Le rapport des coefficients d'activité du polymère nu et du polymère portant un noyau activé (Γ) :

$$\ln \Gamma = \frac{\gamma_p}{\gamma_{j^{*+1}}}$$

$$\ln \Gamma = \frac{\Delta S \ll H \gg \Delta V \ll 1 \gg}{1 - \ll V \gg} + \frac{\Delta V \ll H \gg \ll S \gg}{(1 - \ll V \gg)^2} + \frac{\Delta V \ll H^2 \gg \ll S \gg^2}{3(1 - \ll V \gg)^3}$$

(eq. 10, pp402, Ferrone et coll., 2002)

ΔS : aire du noyau hétérogène activé

ΔV : volume du noyau hétérogène activé

$$\Delta V = (j^* + 1) \frac{v}{\rho}$$

$$\frac{\Delta V}{v} = \frac{(j^* + 1)}{\rho}$$

$$\frac{\Delta S}{S} = \frac{4\pi R_{j^*+1}^2}{4\pi r^2} = \left[\frac{(j^* + 1)}{\rho} \right]^{\frac{2}{3}}$$

$$\underline{\Delta S \ll H \gg} + \Delta V \ll 1 \gg :$$

$$\Delta S \ll H \gg + \Delta V \ll 1 \gg = \Delta S \cdot [H \cdot C + H_f \cdot C_p] + \Delta V [C + C_p]$$

$$\Delta S \ll H \gg + \Delta V \ll 1 \gg = 3 \cdot v \cdot \left[\frac{(j^* + 1)}{\rho} \right]^{\frac{2}{3}} [C + (0.03592 \cdot l + 2.5905) C_p] + v \cdot \left[\frac{(j^* + 1)}{\rho} \right] [C + C_p]$$

$$\underline{\Delta V \ll H \gg \ll S \gg} :$$

$$\Delta V \ll H \gg \ll S \gg = \Delta V \cdot [H \cdot C + H_f \cdot C_p] [S \cdot C + S_f \cdot C_p]$$

$$\Delta V \ll H \gg \ll S \gg = 3 \cdot v^2 \cdot \left[\frac{(j^* + 1)}{\rho} \right] \cdot [C + (0.03592 \cdot l + 2.5905) \cdot C_p] [C + (0.2371 \cdot l + 5.445) \cdot C_p]$$

$$\underline{\Delta V \ll H^2 \gg \ll S \gg^2} :$$

$$\begin{aligned}
\Delta V \ll H^2 \gg \ll S \gg^2 &= \Delta V \cdot [H^2 \cdot C + H_f^2 \cdot C_p] \cdot [S \cdot C + S_f \cdot C_p]^2 \\
\Delta V \ll H^2 \gg \ll S \gg^2 &= 9 \cdot v \cdot \left[\frac{(j^*+1)}{\rho} \right] \cdot [C + (0.03592 \cdot l + 2.5905)^2 C_p] [C + (0.2371 \cdot l + 5.445) \cdot C_p]^2 \\
\ln \Gamma &= \frac{3 \cdot v \cdot \left[\frac{(j^*+1)}{\rho} \right]^{\frac{2}{3}} [C + (0.03592 \cdot l + 2.5905) C_p] + v \cdot \left[\frac{(j^*+1)}{\rho} \right] \cdot [C + C_p]}{[1 - v \cdot (C + \frac{l}{\rho} C_p)]} \\
&+ \frac{3 \cdot v^2 \cdot \left[\frac{(j^*+1)}{\rho} \right] \cdot [C + (0.03592 \cdot l + 2.5905) \cdot C_p] [C + (0.2371 \cdot l + 5.445) \cdot C_p]}{[1 - v \cdot (C + \frac{l}{\rho} C_p)]^2} \\
&+ \frac{3 \cdot v \cdot \left[\frac{(j^*+1)}{\rho} \right] \cdot [C + (0.03592 \cdot l + 2.5905)^2 C_p] [C + (0.2371 \cdot l + 5.445) \cdot C_p]^2}{[1 - v \cdot (C + \frac{l}{\rho} C_p)]^3}
\end{aligned} \tag{AII-22}$$

AII-3. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Boublik, T. (1974). "Statistical thermodynamics of convex molecule fluids." Molecular Physics **27**: 1415-1427.
- Hall, D. and A. P. Minton (2002). "Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. I. Equilibrium models." Biophys Chem **98**(1-2): 93-104.
- Hall, D. and A. P. Minton (2003). "Macromolecular crowding: qualitative and semiquantitative successes, quantitative challenges." Biochim Biophys Acta **1649**(2): 127-39.
- Hall, D. and A. P. Minton (2004). "Effects of inert volume-excluding macromolecules on protein fiber formation. II. Kinetic models for nucleated fiber growth." Biophys Chem **107**(3): 299-316.
- Minton, A. P. (1998). "Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion." Methods Enzymol **295**: 127-49.
- Zimmerman, S. B. and A. P. Minton (1993). "Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences." Annu Rev Biophys Biomol Struct **22**: 27-65.

ANNEXE III

Dérivation des équations du modèle linéarisé

AIII-1. LES EQUATIONS PRINCIPALES DU MODELE LINEARISE

AIII-2. LES EQUATIONS SECONDAIRES DU MODELE LINEARISE

AIII-3. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIII-1. LES EQUATIONS PRINCIPALES DU MODELE LINEARISE

Nous avons évoqué qu'au premier ordre, la partie initiale des courbes de progression de la polymérisation peut être décrite par l'équation suivante (éq. VI-1, cf. section VI-2-A. ; cf. [Bishop and Ferrone 1984]):

$$C_{poly} = A \cdot [\cosh(B.t) - 1]$$

où, $A = f_0 / (g_0 - df_0/dC_0)$ (AIII-1)

$$B^2 = J_0 \cdot (g_0 - df_0/dC_0)$$
 (AIII-2)

et, en corollaire, $B^2 A = J_0 \cdot f_0$ (AIII-3)

avec : f_0 , vitesse initiale de la voie homogène ; g_0 , vitesse initiale de la voie hétérogène ; J_0 , vitesse initiale d'élongation.

→ Par définition, la vitesse de nucléation homogène est (cf. membre droit, premier terme de l'éq. V-1, *Matériel et méthodes*):

$$f_0 = \frac{k_+ \times K_{i^*} \times (\gamma \times C_0)^{i^*+1}}{\gamma_{i^*+1}}$$
 (AIII-4)

et, la dérivée est:

$$\frac{df_0}{dC_0} = [(i^* + 1) \times (1 - \frac{d \ln \gamma}{d \ln C_0}) - \frac{d \ln \gamma_{i^*+1}}{d \ln C_0}] \times \frac{f_0}{C_0}$$
 (AIII-5)

→ La vitesse d'élongation des polymères est (cf. éq. V-2, *Matériel et méthodes*):

$$J_0 = k_+ (\gamma \times C_0 - \gamma_s \times C_s)$$
 (AIII-6)

→ La vitesse de nucléation hétérogène est (cf. second terme à droite, de l'éq. V-1, *Matériel et méthodes*):

$$g_0 = k_+ \times C_{j^*} \times \gamma \times C_0 \times \Gamma \quad (\text{AIII-7})$$

AIII-2. LES EQUATIONS SECONDAIRES DU MODELE LINEAISE

Température : Les équations décrivant l'effet de la température sur la constante cinétique, la solubilité, et le potentiel des liaisons intermoléculaires au sein du polymère ont été présentées :

- k_+ (équation VI-18, remplace VI-2 du modèle de base)
- C_s (équation VI-4)
- μ_{PC} (équation VI-20, remplace VI-3 du modèle de base)

Par ailleurs les équations, VI-21 à VI-23 (cf. Résultats, section VI-4-A) sont utilisées pour le calcul de $\sigma_1\mu_{cc}$, $\sigma_2\mu_{cc}$, et ϕ .

Monomère :

- Pour le calcul des coefficient d'activité du monomère, et du monomère à la solubilité, l'équation suivante est utilisée (cf. *Matériel et méthodes*) :

$$\gamma = \exp\left(\sum_{k=1}^6 B_{k+1} C^k\right) \quad (\text{AIII-8})$$

- Les B_{k+1} sont :

$$B_2 = 8V_{cpt}$$

$$B_3 = 15V_{cpt}^2$$

$$B_4 = 24.48V_{cpt}^3$$

$$B_5 = 35.30V_{cpt}^4$$

$$B_6 = 47.4V_{cpt}^5$$

$$B_7 = 65.9V_{cpt}^6$$

avec $V_{cpt} = 0,05054226$ l/mmeole

Noyau homogène :

- Pour la taille critique du noyau homogène, l'équation V-6 (cf. *Matériel et méthodes*) est utilisée :

$$i^* = -(4RT + \delta_1 \times \mu_{pc}) / RT \times \ln S$$

- Pour le calcul du coefficient d'activité du complexe activé (noyau + 1 monomère) :

$$\begin{aligned} \gamma_{i^*+1} = & \exp\{ -\ln(1-V_{spt} \times C) + [3 V_{spt} \times C / (1 - V_{spt} \times C)] \rho^{-1/3} (i^* + 1)^{1/3} \\ & + [3(V_{spt} \times C + \frac{9}{2} (V_{spt} \times C)^2 / (1 - V_{spt} \times C)^2)] \rho^{-2/3} (i^* + 1)^{2/3} \\ & + [V_{spt} \times C (1 + V_{spt} \times C + (V_{spt} \times C)^2) / (1 - V_{spt} \times C)^3] \rho^{-1} (i^* + 1) \} \end{aligned}$$

NB : Cette équation est identique à l'équation V-5, avec $V_{spt} = 0,0477$ l/mmeole.

- La constante d'équilibre de formation du noyau homogène (mM^{-1}) est calculée selon :

$$\ln K_{i^*} = \xi \ln \ln S - \frac{\xi}{\ln S} \ln(\gamma \times c) + \xi(1 - \ln \xi) + \ln(\gamma_s \times C_s) + \frac{\ln \sqrt{8}}{\rho} + (\delta_2 - 1) \frac{\mu_{pc}}{RT}$$

avec $\xi = -(4 + \delta_1 \times \mu_{pc} / RT)$,

Noyau hétérogène :

- Taille du noyau hétérogène critique:

$$- j^* = \frac{\xi_2}{\ln S + \xi_1} \quad \text{pour } j^* < j_{\max}$$

avec $\xi_1 = -\frac{\sigma_1 \mu_{cc}}{RT}$, $\xi_2 = \xi + 4 + \frac{\sigma_2 \mu_{cc}}{RT}$

$$- j^* = - [\delta_1 \times \mu_{pc} + 3RT] / RT \times \ln S = i^* + (1 / \ln S) \quad \text{pour } j^* > j_{\max}$$

- La taille de l'agrégat hétérogène au-delà de laquelle l'addition des monomères n'augmente plus la surface de contact avec le polymère :

$$j_{\max} = -\frac{\sigma_2 \mu_{cc}}{\sigma_1 \mu_{cc}}$$

- Potentiel chimique du noyau critique hétérogène :

$$\mu_{j_{c \max}} = \frac{-\sigma_2 \mu_{cc}}{\ln(1/j_{\max}) + 1} \quad (\text{kcal/mmmole})$$

- Concentration des noyaux hétérogènes :

$$- \ln C_{j^*} = \ln \phi + \xi_2 (1 - \ln \xi_2) + \delta_2 \frac{\mu_{pc}}{RT} + \xi_2 \ln(\ln S + \xi_1) \quad \text{pour } j < j_{\max}$$

$$- \ln C_{j^*} = \ln \phi + j^* \times \ln S + \frac{(\delta_1 \times \mu_{pc} + 3RT)}{RT} \times \ln j^* + \frac{\delta_2 \times \mu_{pc}}{RT} - \frac{\mu_{j_{c \max}}}{RT} - 3 \times \ln j_{\max}$$

pour } j^* > j_{\max}

- Rapport du coefficient d'activité du polymère nu à celui du polymère *ayant fixé* un noyau hétérogène (de taille j^*) :

$$\ln \Gamma = - \left(\frac{(j^*+1)}{\rho} \right)^{2/3} \frac{3 \times C \times V_{spt}}{1 - C \times V_{spt}} - \frac{(j^*+1)}{\rho} \times \frac{C \times V_{spt} (1 + C \times V_{spt} + (C \times V_{spt})^2)}{(1 - C \times V_{spt})^3}$$

Les dérivées des coefficients d'activité :

Coefficients utilisés pour le calcul des dérivées

$$a = - \frac{V_{spt}}{(V_{spt} \times C - 1)}$$

$$b = f^{-1} \times g + f^{-\frac{2}{3}} \times f' \times \frac{V_{spt} \times C}{(1 - V_{spt} \times C)}$$

$$c_1 = f^{\frac{2}{3}} \times h + 2 \times \frac{f^{-\frac{1}{3}} \times f' \times [V_{spt} \times C + \frac{9}{2} \times (V_{spt} \times C)^2]}{(1 - V_{spt} \times C)^2}$$

$$g = \frac{3V_{spt}^2 \times C}{(V_{spt} \times C - 1)^2} - \frac{3V_{spt} \times (V_{spt} \times C - 1)}{(V_{spt} \times C - 1)}$$

$$d = f \times i + f' \times \frac{[(V_{spt} \times C)^2 + V_{spt} \times C + 1] \times V_{spt} \times C}{(1 - V_{spt} \times C)^3}$$

$$f = i^* + 1$$

$$f' = \frac{-(4RT + \delta_1 \times \mu_{pc})}{RT} \times \frac{\left[-\frac{d \ln \gamma}{d \ln C} - \frac{1}{C} \right]}{S^2}$$

$$h = \frac{(3V_{spt} + 27V_{spt}^2 \times C)}{(V_{spt} \times C - 1)^2} - [27(V_{spt} \times C)^2 + 6V_{spt} \times C] \times \frac{V_{spt}}{(V_{spt} \times C - 1)^3}$$

$$i = 3 \times V_{spt}^2 \times C \times \frac{[(V_{spt} \times C)^2 + V_{spt} \times C + 1]}{(V_{spt} \times C - 1)^4} - \frac{(2 \times V_{spt}^2 \times C + V_{spt}) \times V_{spt} \times C - [(V_{spt} \times C)^2 + V_{spt} \times C + 1] \times V_{spt}}{(V_{spt} \times C - 1)^3}$$

Monomère

Dérivée du coefficient d'activité du monomère :

$$\frac{d \ln \gamma}{d \ln C} = \exp\left(\sum_{k=1}^6 B_{k+1} C^k\right)$$

$$B_2 = 8V_{cpt}$$

$$B_3 = 30V_{cpt}^2$$

$$B_4 = 73.44V_{cpt}^3$$

$$B_5 = 141.2V_{cpt}^4$$

$$B_6 = 237V_{cpt}^6$$

$$B_7 = 395.4V_{cpt}^6$$

Noyau homogène

Dérivée du coefficient d'activité du complexe activé (noyau + 1 monomère) (SD) :

$$\frac{d \ln \gamma_{i^{*+1}}}{d \ln C} = [a + b \times \rho^{-\frac{1}{3}} + c_1 \times \rho^{-\frac{2}{3}} + d \times \rho^{-1}] \times C$$

AIII-3. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Bishop, M. F. and F. A. Ferrone (1984). "Kinetics of nucleation-controlled polymerization. A perturbation treatment for use with a secondary pathway." Biophys J 46(5): 631-44.

ANNEXE IV

Le modèle « Domaines »

AIV-1. PRINCIPE

AIV-2. PARAMETRES ET EQUATIONS

IV-2-A. PARAMETRES DES CŒFFICIENTS D'ACTIVITE

IV-2-B. EN SOLUTION

IV-2-C. DANS LES DOMAINES

AIV-3. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AIV-1. PRINCIPE

Cette annexe complète la présentation du modèle « Domaines » (ou modèle IV) qui est faite dans le chapitre VI (section VI-4-B.). Elle présente les équations spécifiques de ce modèle et leur dérivation. Les équations spécifiques concernent :

- le calcul du nombre de *domaines* (dans la *solution*),
- le calcul des paramètres et variables « locaux » des domaines, à savoir
 - la longueur moyenne des fibres (par domaine pour le modèle IVb)
 - le coefficients d'activité Γ (par domaine pour le modèle IVb)
 - les vitesses d'élongation et hétérogène
- γ et $\gamma_{i^{*}+1}$, en solution.

Comme nous l'avons précisé dans les Résultats (section IV), nous avons mis en place deux modèles « domaines » (modèle IVa et modèle IVb). On peut résumer leur caractéristiques comme suit.

Dans les deux modèles, la concentration des noyaux hétérogènes, $C_{j^{*}}$, est une variable propre à chaque domaine (voir *Annexe IV*).

Le modèle IVa : Dans ce modèle « spatial simplifié », « big gamma », Γ est calculé à partir de la longueur moyenne des fibres et de leur concentration (moyennes sur la solution).

Le modèle IVb : Dans ce modèle « spatial détaillé », le nombre de fibres dans chaque domaine et leur longueur permettent de calculer la longueur moyenne des fibres de ce domaine ; la longueur moyenne des fibres est utilisée pour le calcul local de « big gamma », Γ). Comme nous le détaillerons ci-après, chaque domaine possède en propre, et est caractérisé par :

- une concentration de noyaux HEN, $C_{j^{*}}$
- une concentration de fibres, $C_{p_tot_dom}$

- une longueur moyenne de fibres, l_{m_dom}
- des paramètres B de non-idéalité et un coefficient Γ
- une vitesse d'élongation et une vitesse hétérogène.

AIV-2. PARAMETRES ET EQUATIONS

Nous ne présentons ici que les équations et paramètre principaux, en tant qu'ils se différencient de ceux qui ont été déjà définis, en particulier (i) dans le Chap. VI (Matériel et méthodes), (ii) dans le Chap. V (*Résultats*), ainsi que (iii) dans les *Annexes* précédentes.

AIV-2-A. PARAMETRES DES COEFFICIENTS D'ACTIVITE

Les paramètres « B_x » des coefficients d'activité sont calculés comme suit (CPT, deux classes monomères et fibres, cf. Annexe II).

Longueur des fibres (en # de monomères) $l_i = \frac{C_{poly_i}}{C_{p_i}}$ (éq. IV-1)

avec i : indice du domaine.

B1 à B5 (paramètres de non-idéalité) :

$$B_1 = \sum_{i=1}^n [C_{p_i} \times (25.1065 + 0.8192 \times l_i)]$$

$$B_2 = \sum_{i=1}^n [C_{p_i} \times (5.445 + 0.2371 \times l_i)]$$

$$B_3 = \sum_{i=1}^n [C_{p_i} \times (32.274 + 1.17471 \times l_i)]$$

$$B_4 = \sum_{i=1}^n [C_{p_i} \times (2.5905 + 0.03592 \times l_i)^2]$$

$$B_5 = \sum_{i=1}^n [Cp_i \times (2.5905 + 0.03592 \times l_i)] \quad (\text{éqs. IV-2})$$

Enfin, nous posons :

$$un_vc = \left(1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n (Cpoly_i)}{\rho} \right) \times V \right)$$

Ce terme correspond à la fraction du volume total.

→ **Dans le modèle IVa**, un seul jeu de paramètres de non-idéalité ($\{B_x\}$, éqs. IV-2) est déterminé et utilisé pour le calcul de γ , γ_{*+I} ¹, et de Γ ²; $\{B_x\}$ est calculé à partir de la concentration des fibres de la solution et de leur longueur moyenne.

→ **Dans le modèle IVb**, deux jeux de paramètres « B_x » sont calculés.

⊖ Le premier jeu correspond à la solution simulée (paramètres de modèle $\{B_{x_sol}\}$); il est calculé à partir de la concentration des fibres de la solution et de leur longueur moyenne.

C'est avec $\{B_{x_sol}\}$ que sont calculés :

- (i) le coefficient d'activité γ des monomères (considérés comme uniformément et également répartis dans la solution ET au sein des domaines => pas de limite diffusionnelle),
- (ii) le coefficient d'activité γ_{*+I} des noyaux homogènes activés (*idem*).

¹ voir *Annexe II*, éq. II-3 et II-4 pour le calcul de γ et de γ_{*+I} , respectivement.

² voir *Annexe II*, éq. II-5 pour le calcul de Γ .

⊖ Le second jeu de paramètres correspond aux domaines individualisés (paramètres de modèle $\{B_{x_dom(i)}\}^3$) ; il est calculé à partir de la concentration locale des fibres du domaine⁴ i et de leur longueur moyenne (*ie.* moyenne locale au domaine i). C'est avec $\{B_{x_dom(i)}\}$ qu'est calculé le coefficient $\Gamma(i)$ ², propre au domaine i .

AIV-2-B. EN SOLUTION

Définition du volume de solution simulée : Le volume expérimental utilisé lors de l'obtention des courbes de polymérisation est fixé (le plus souvent, $\approx 400 \mu\text{m}^3$; par exemple, cf. [Ferrone et coll. 1980; Ferrone et coll. 1985]) : V_S (l).

Le « polymère » initial (ou proto-fibre homogène) se forme en solution *via* le processus homogène ; puis, cette fibre s'allonge, et devient un *domaine*, avec l'initiation du processus hétérogène, lorsqu'un seuil de taille est atteint (56 monomères⁵).

Coefficient d'activité des monomères :

$$\gamma = \exp \left[-\ln(un_vc) + \frac{(B_1 + 7 \times C) \times V}{un_vc} + \frac{(B_2 + C) \times (B_3 + 7.5 \times C) \times V^2}{(un_vc)^2} + \frac{(B_2 + C)^2 \times (B_4 + C) \times V^3}{(un_vc)^3} \right]$$

Coefficient d'activité des noyaux homogènes activés :

$$i_{etoile1} = \frac{i^* + 1}{\rho}$$

³ $x=1-5$, i = nombre (variable) de domaines.

⁴ Soit, la fibre homogène « mère » + les fibres hétérogènes « filles »

⁵ La nucléation hétérogène est possible lorsque la « proto-fibre » est constituée d'au moins 56 monomères, ou 4 plateaux.

$$\gamma_{i^{*}+1} = \exp \left[\frac{(i\text{etoil}\delta)^{\frac{1}{3}} \times 3 \times V \times (B_2 + C) + (i\text{etoil}\delta)^{\frac{2}{3}} \times 3 \times V \times (B_5 + C) + (i\text{etoil}\delta) \times V \times \left(C + \sum_{i=1}^n C_{p_i} \right)}{un_vc} + \frac{4.5 \times (i\text{etoil}\delta)^{\frac{2}{3}} \times V^2 \times (B_2 + C)^2 + (i\text{etoil}\delta) \times 3 \times V^2 \times [(B_2 + C) \times (B_5 + C)]}{(un_vc)^2} + \frac{3 \times (i\text{etoil}\delta) \times (B_4 + C) \times (B_2 + C)^2}{(un_vc)^3} \right]$$

Vitesse homogène (mM/s) : $V_{\text{hom}o} = \frac{dC_{p\text{-hom}o}}{dt}$ où

$$dc_{p\text{-hom}o} / dt = \left(k_+ K_{i^*} / \gamma_{i^*+1} \right) (\gamma_c)^{i^*+1} \quad (\text{éq. IV-3})$$

Il s'agit de la vitesse de production des fibres homogènes « mères », ou « proto-fibres homogènes ». L'équation IV-3 correspond au premier terme du membre de droite (terme *homogène*) de l'éq. V-1. (*Matériel et méthodes*).

Production des domaines :

$$\text{Nombre_domaines} = \text{Partie_Entière} (C_{p\text{-hom}o} \cdot V_s \cdot NA) \quad (\text{éq. IV-4})$$

où $C_{p\text{-hom}o}$ est la concentration des proto-fibres homogènes (mM)

et NA est le nombre d'Avogadro ($6,02 \cdot 10^{20}$ mmol/l)

Les bilans de matière :

Fibres et monomères polymérisés : De façon triviale, la concentration totale de fibres polymères (C_p) dans solution simulée est égale à la somme des fibres présentes dans tous les

domaines (C_{pi} , avec $i = 1$ à n) ; et similairement pour la concentration totale de monomères polymérisés dans la solution (C_{poly}):

$$Cp = \sum_{i=1}^n Cp_i$$

$$Cpoly = \sum_{i=1}^n Cpoly_i$$

Monomères de HbS : Un bilan détaillé des monomères a été mis en place. Il vise à mieux rendre compte des monomères consommés. En effet, dans le modèle initial -et dans nos modèles précédents⁶, seuls les monomères incorporés dans les polymères et les monomères libres sont comptabilisés (éq. V-3).

Dans notre approche, originale, de la dynamique complète par intégration numérique, on trouve en solution après la formation de la première fibre polymère quatre espèces :

- 1- l'espèce monomère (C)
- 2- l'espèce noyau (homogène, C_{i^*} ou hétérogène C_{j^*})
- 3- l'espèce noyau activé (homogène, $C_{i^{*+1}}$ ou hétérogène $C_{j^{*+1}}$)
- 4- l'espèce fibre polymère (Cp , homogène ou hétérogène)

Les deux termes correspondants aux noyaux (normaux et activés) du bilan de HbS étaient négligés dans la version linéaire, où toutes les variables que nous suivons étaient statiques. Nous avons raisonné et vérifié que ceci conduit à des erreurs de bilan. Par exemple, à forte concentration (ex : 4,8 mM), où les noyaux (HON et HEN) ont une taille critique (initiale) de 5 monomères et une concentration élevée les monomères intervenant dans ces assemblages représentent une concentration équivalente (voire supérieure d'un facteur 10 à 100) à celle des monomères polymérisés, dans les premiers pourcents de la réaction.

⁶ Nous n'avons pas testé les conséquences d'un tel bilan de matière dans les modèles précédents.

Afin de prendre en compte les monomères intervenant dans la constitution des noyaux et noyaux activés, nous avons procédé comme suit.

A tout instant :

- la concentration des monomères incorporés dans les noyaux HON est :

$$C_{i^*} \times i^*$$

- La concentration des monomères incorporés dans les noyaux HEN est :

$$C_{i^*} \times j^*$$

- La concentration des monomères incorporés dans les noyaux HON activés est :

$$\sum_{i=1}^n Cp_{i-1} \times (i^* + 1)$$

- La concentration des monomères incorporés dans les noyaux HEN activés est :

$$\sum_{i=1}^n Cp_{i_heter} \times (j^* + 1)$$

- La concentration des monomères incorporés dans les polymères est :

$$C_{poly}$$

Et donc la concentration des monomères libres est :

$$C = C_0 - [(C_{i^*} \times i^*) + (C_{i^*} \times j^*) + (\sum_{i=1}^n Cp_{i-1} \times (i^* + 1)) + (\sum_{i=1}^n Cp_{i_heter} \times (j^* + 1)) + C_{poly}]$$

AIV-2-C. DANS LES DOMAINES

La croissance de chaque *domaine* est assurée par (i) l'élongation des fibres de ce domaine ($v_{ELO}^{(i)}$), et (ii) la nucléation hétérogène sur les fibres de ce même domaine ($v_{HEN}^{(i)}$).

Nous avons déjà précisé que dans ce modèle « spatial », le nombre de domaine –donc de fibres homogènes, était discrétisé. Or, les équations cinétiques (vitesses : v_{HON} , v_{HEN} et

v_{ELO}) dépendent des concentrations des espèces partenaires (et non pas de leur nombre).

Ainsi, C_{p_homo} (concentration des proto-fibres HON) la concentration équivalente à une seule particule, dans le volume V_S est donc égale à :

$$C_{p_{i-1}} = \frac{1}{NA \times V_S}$$

L'indice i représente ici le rang du domaine (ordre d'apparition), le « $_1$ » rappelant qu'il s'agit de la première concentration (au sens de la dynamique du processus).

Concentration locale des noyaux hétérogènes (HEN) :

$$\ln C_{j^*-i} = \ln \phi \times C_{poly_i} + \xi_2 (1 - \ln \xi_2) + \delta_2 \frac{\mu_{pc}}{RT} + \xi_2 \ln(\ln S + \xi_1)$$

pour $j < j_{max}$ (éq. IV-5a)

$$\ln C_{j^*-i} = \ln \phi \times C_{poly_i} + j^* \times \ln S + \frac{(\delta_1 \times \mu_{pc} + 3RT)}{RT} \times \ln j^* + \frac{\delta_2 \times \mu_{pc}}{RT} - \frac{\mu_{jC_{max}}}{RT} - 3 \times \ln j_{max}$$

pour $j^* > j_{max}$ (éq. IV-5b)

avec

C_{j^*-i} : concentration des noyaux hétérogènes formés dans le domaine i

$C_{p_{i_heter}}$: concentration des fibres polymères hétérogènes formés dans le domaine i

C_{poly_i} : concentration des monomères polymérisés dans le domaine i

Vitesse locale de nucléation hétérogène :

En reprenant l'équation V-1 (deuxième terme du membre de droite), la vitesse de formation des fibres hétérogènes (locale au domaine) est :

$$\frac{dCp_{i_heter}}{dt} = k_+ \times C_{j^*_i} \times \gamma \times C \times \Gamma \quad (\text{éq. IV-6})$$

Vitesse locale d'élongation :

En reprenant l'équation V-2, la vitesse d'élongation locale au domaine « i » est :

$$\frac{dCpoly_i}{dt} = -k_+ (\gamma \times C - \gamma_s \times C_s) \times Cp_i \quad (\text{éq. IV-7})$$

avec la concentration totale de fibres⁷ $Cp_i = Cp_{i-1} + Cp_{i_heter}$

« **Big gamma** » Γ (rapport du coefficient d'activité du polymère sur le coefficient d'activité du polymère activé par un noyau hétérogène) :

$$\Gamma = \exp \left[\frac{-3 \times (jetoile1)^{\frac{2}{3}} \times V \times (B_5 + C) - (jetoile1) \times V \times \left(C + \sum_{i=1}^n Cp_i \right)}{un_vc} - \frac{3 \times (jetoile1) \times V^2 \times (B_5 + C) \times (B_2 + C)}{(un_vc)^2} - \frac{3 \times (jetoile1) \times V^3 \times (B_4 + C) \times (B_2 + C)^2}{(un_vc)^3} \right]$$

avec $jetoile1 = \frac{j^* + 1}{\rho}$

⁷ Soit, concentration équivalente à 1 particule (la fibre homogène mère) + plus la concentration des fibres hétérogènes locales (C_{pi_hetero})

AIV-3. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ferrone, F. A., J. Hofrichter and W. A. Eaton (1985). "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization. II. A double nucleation mechanism." J Mol Biol **183**(4): 611-31.

Ferrone, F. A., J. Hofrichter, H. R. Sunshine and W. A. Eaton (1980). "Kinetic studies on photolysis-induced gelation of sickle cell hemoglobin suggest a new mechanism." Biophys J **32**(1): 361-80.

Sickle cell disease pathology exhibits a strong interindividual variability, which depends upon multiple, dynamic and interacting factors, from the molecular to the patient level. Sickle hemoglobin, hemoglobin S (HbS, $\alpha_2\beta_2^S$ tetramer), is a mutant of HbA ($\alpha_2\beta_2$), with a surface *valine* (hydrophobic) substituting a native *glutamic acid* (negatively charged). Such a mutation endows deoxygenated HbS with the propensity to aggregate into polymers, altering erythrocyte properties –including its rheology and its interactions with vascular and circulatory cells. Thus HbS polymerization is a key etiological factor of sickle cell disease, if not *the primum movens*. Indeed, one therapeutical hypothesis (supported by observation) postulates that the reduction of intra-erythrocytic HbS fibers could improve patients clinical status by lowering the frequency and the severity of vasoocclusive crisis. In order to better understand and manage sickle cell disease variability, it is essential to have a realistic description of HbS polymerization.

This work aims at developing and validating a mathematical model of deoxygenated HbS polymerization, as a kinetic and thermodynamic process under the influence of concentration and temperature –the two most important modulators.

Building on an existing, but linearized and uncomplete (Ferrone et al., 1985) model, we have implemented, corrected and updated, and quantitatively evaluated its dynamical performances: this was done by full numerical integration using Simulink©. This allowed us to make several improvements, related in particular to: (i) the heterogeneous nucleation pathway (seeding and formation of new fibers from pre-existing ones), (ii) the non-ideality of the HbS protein solution, caused by polymer fibers excluded volume (activity coefficients were calculated with the CPT, *Convex Particle Theory*), and (iii) the spatial organization of polymers into *domains*.

The model developed in this work will ground the description of the dynamic influence (i) oxygenation and non-polymerizing hemoglobins, (ii) HbS polymers interactions with membrane and consequences upon rheological properties of sickle cell erythrocyte.

Key-words: sickle cell disease- hemoglobin S – polymerization – protein aggregation – macromolecular crowding - non-ideality – excluded volume – activity coefficient – kinetics - thermodynamics – mathematical modeling – numerical simulation

La drépanocytose, ou anémie falciforme, présente une variabilité interindividuelle considérable, conditionnée par de multiples facteurs, dynamiques et interactifs, depuis le niveau moléculaire jusqu'au niveau du patient. L'hémoglobine drépanocytaire, ou hémoglobine S (HbS, tétramère $\alpha_2\beta^S_2$), est un mutant de l'hémoglobine A ($\alpha_2\beta_2$) : elle possède à sa surface une *valine* (hydrophobe) substituant un *acide glutamique* natif (négativement chargé). Cette mutation entraîne l'agrégation de l'HbS désoxygénée en polymères, ainsi que l'altération des propriétés de l'érythrocyte -dont sa rhéologie et ses interactions avec les différentes cellules vasculaires. C'est pourquoi la polymérisation de l'HbS constitue un facteur étiologique clef, sinon le *primum movens*, de la drépanocytose, et une hypothèse thérapeutique (étayée par l'observation) postule que la réduction des fibres intra-érythrocytaires de HbS pourrait améliorer le statut clinique des patients en abaissant la fréquence et la sévérité des crises vasoocclusives. Dans l'optique de mieux comprendre et de mieux gérer la variabilité individuelle drépanocytaire, il apparaît donc indispensable de disposer, en premier lieu, d'une description réaliste de la polymérisation de l'HbS.

L'objectif de ce travail de thèse est la mise en place et la validation d'un modèle mathématique de la polymérisation de l'HbS désoxygénée, en tant que processus cinétique-thermodynamique, sous l'influence de la concentration et de la température –les deux facteurs modulateurs les plus importants. A partir d'un modèle existant, mais linéaire et incomplet (Ferrone et al., 1985), nous avons procédé à son implémentation, à sa correction et à sa mise à jour, ainsi qu'à l'évaluation quantitative de ses performances dynamiques, par intégration complète et simulation numérique (Simulink©). Ceci nous a permis de réaliser un diagnostic et d'effectuer un certain nombre de raffinements, concernant en particulier (i) la voie de nucléation hétérogène (formation de néo-fibres sur les fibres préexistantes), (ii) la non-idéalité de la solution protéique de HbS, induite par le volume exclus des fibres polymères (coefficients d'activité calculé à partir de la « théorie des particules convexes »), ainsi que (iii) la structuration spatiale des polymères en *domainses*.

Le modèle développé dans ce travail servira de base pour une description (i) de l'influence dynamique de l'oxygénation et des hémoglobines non-polymérisantes sur la polymérisation de HbS, puis (ii) des polymères de HbS sur les propriétés membranaires et rhéologiques de l'érythrocyte drépanocytaire.

Mots-clés : drépanocytose - hémoglobine S – polymérisation – agrégation protéique - encombrement macromoléculaire - non-idéalité - volume exclus - coefficient d'activité – cinétique - thermodynamique - modélisation mathématique - simulation numérique