



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

Dynamique de Cellules Sanguines dans des Microécoulements

Jury

Françoise Brochard-Wyart	Rapporteur
François Gallet	Rapporteur
Manouk Abkarian	Examineur
Pierre Bongrand	Examineur
Jacques Magnaudet	Examineur
Patrick Tabeling	Examineur
Annie Viallat	Directrice de recherche

Jules Dupire

École doctorale : Physique et Sciences de la Matière

Spécialité : Biophysique

Laboratoire Adhésion et Inflammation (LAI)

Remerciements

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de relire ce document et de participer à la soutenance de ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Annie Viallat de m'avoir accueilli au laboratoire et de m'avoir permis de m'impliquer dans de nombreux projets, et m'accordant toute sa confiance. Merci de m'avoir donné une place de collaborateur à part entière.

Je remercie également toute l'équipe des "jeunes", Alexandre Brodowitch, Sophie Cadra, Katia Cosentino, Roxanne Fabre, Alexia Gucciardi, Mustapha-Kamel Kheloufi, Thomas Leoni, José Geraldo Bonfim Lima, Valentina Lo Schiavo, Pascal Preira, Marius Socol, pour avoir créé et maintenu une si bonne ambiance de ce bureau. Travailler avec vous fut un plaisir. J'y aurais gagné de très bons amis.

A toute l'équipe du laboratoire, qui m'a offert beaucoup, des discussions de couloirs aux conseils scientifiques, je dis également un grand merci.

Mes pensées vont aussi aux membres du projet ANR. Les échanges et réunions aux trois coins du pays furent toujours un plaisir.

Une pensée émue va à mon "P'tit Prio". Merci de m'avoir montré que les choses peuvent être simples, malgré des situations compliquées. Le bon scientifique que je suis te dois beaucoup.

Merci Hélène pour ces réguliers petits mots de soutien. On y sera finalement arrivé!

Merci à mes grand-parents, qui ont pris en charge de s'inquiéter à ma place et me permettent ainsi de me consacrer sereinement à ce que je fais.

Enfin, merci "Momo" pour ta présence, ta logistique et ton soutien linguistique. :-*

Introduction

Grâce aux récents développements des techniques de microfabrication, le concept de "Lab-On-A-Chip" prend une place de plus en plus importante dans les perspectives scientifiques. Ces systèmes cherchent à réunir plusieurs mesures, ou plusieurs "laboratoires", sur une puce de quelques cm^2 afin d'améliorer la rapidité d'examen tout en utilisant un volume très faible de réactifs, qui sont parfois très coûteux.

Une partie de ces laboratoires sur puce cherche à développer des outils innovants pour des diagnostics médicaux. Un exemple déjà opérationnel est le test de grossesse disponible en pharmacie. Ce petit appareil est basé sur la technique du test par flux latéral (Lateral Flow assay, [4]), grâce auquel un test de présence de l'hormone HcG est effectué par liaison avec un anticorps coloré.

Les stratégies de recherche actuelles pointent vers le développement d'outils permettant une pratique de la médecine personnalisée, basée sur une analyse fine du milieu biomoléculaire des patients et potentiellement développée grâce à ces puces-laboratoires. Les enjeux portent principalement vers une meilleure détection et prévention des cancers, en recherchant les molécules spécifiques à l'apparition de tumeurs chez le patient.

Pour des diagnostics liés au cancer, le développement de biosenseurs [89] à l'échelle d'une cellule entière permettrait la détection et l'analyse des cellules tumorales circulantes (CTC). Ces outils nécessitent une très bonne compréhension du transport des cellules dans un écoulement, qu'il soit libre ou dans une géométrie confinée. Cela rejoint les travaux plus fondamentaux effectués sur la compréhension du transport des cellules sanguines et tumorales dans le système vasculaire.

Dans les deux cas, il s'agit d'un problème complexe, couplant plusieurs phénomènes physiques : un écoulement hydrodynamique, une géométrie fortement confinante et des interactions entre des corps à la rhéologie complexe. Ce genre de projet est donc très pluridisciplinaire et nécessite une expertise en mécanique des fluides, en biomécanique, en physique et en biologie. On peut ainsi citer l'exemple de la margination des globules blancs dans les vaisseaux, qui dépend de l'interaction de l'écoulement et de la rhéologie interne des globules rouges. De même, le recrutement et l'adhésion d'un globule blanc sur une paroi endothéliale est le fruit d'une interaction entre la force hydrodynamique, l'écoulement sur la cellule

et l'état biologique de la surface lorsque le globule blanc passe à proximité.

Ces recherches s'inscrivent dans le domaine de la biophysique, né dans les années 1950 et dont la communauté s'agrandit chaque année. Ainsi en France a été créé en 1966 le Comité National de Biophysique puis, en 1982, la Société Française de Biophysique, comptant plus de quatre cent chercheurs membres, répartis dans une centaine de laboratoires. On peut dégager trois axes de travail de cette communauté : observer de nouveaux phénomènes, parfois grâce aux récentes avancées de la technique (comme a pu l'être la création du microscope confocal), fournir des explications innovantes aux phénomènes biologiques et créer de nouveaux outils de caractérisation.

Dans ce contexte, mon travail de thèse porte sur l'étude de la circulation de cellules sanguines dans des micro-écoulements, par deux approches assez différentes.

J'ai tout d'abord rejoint un projet déjà mature sur l'étude du comportement de globules rouges dans des écoulements de cisaillement. En me fondant sur le travail effectué dans l'équipe depuis 2002, j'ai participé à la réalisation d'une étude détaillée des régimes de mouvements, à l'application de nouvelles conditions expérimentales ainsi qu'à la reconsidération des hypothèses du modèle associé. Ce travail est la source de deux publications, la première dans *Physical Review Letters* [26] et la seconde dans les comptes rendus de l'Académie des Sciences des États-Unis (PNAS, acceptée, à paraître).

Dans un deuxième temps, j'ai eu l'occasion de participer à la naissance d'un projet sur la circulation de globules blancs dans des réseaux de capillaires pulmonaires. Dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut de Mécanique des fluides de Toulouse, le laboratoire "Microfluidique, MEMS et Nanostructure" de l'ESPCI (Paris) et le laboratoire "Adhésion et Inflammation" (Marseille), financée par l'Agence Nationale pour la Recherche, nous avons mené un travail expérimental exploratoire sur le mouvement de monocytes dans des réseaux biomimétiques dans le but de mieux comprendre le couplage entre la rhéologie des cellules et leurs propriétés de transport.

Le présent manuscrit est organisé en trois grandes parties.

Après avoir présenté les connaissances et méthodes expérimentales nécessaires à ce travail, nous étudions dans un premier temps la rhéologie des cellules sanguines ainsi que les méthodes expérimentales existantes pour l'étudier. Nous continuons en exposant les propriétés de la circulation sanguine dans le corps humain et la rhéologie spécifique du sang. Nous présentons finalement les protocoles et méthodes expérimentales utilisés.

La deuxième partie présente les recherches effectuées sur le comportement de globules rouges dans un écoulement de cisaillement. Après avoir décrit les modèles à forme fixe utilisés pour décrire les cellules et présenté les méthodes expérimentales

tales spécifiques à cette partie, nous développons l'étude de la dynamique dans un écoulement de cisaillement oscillant dans laquelle nous mettons en évidence l'apparition d'un comportement chaotique des cellules. Nous revenons alors à une étude avec un écoulement de cisaillement constant où nous fournissons une description complète de la dynamique des cellules. Pour finir, nous proposons un changement de paradigme du modèle en introduisant une nouvelle forme non contrainte du cytosquelette élastique qui permet une meilleure correspondance entre les valeurs du module élastique de cisaillement des cellules et les comportements dynamiques observés.

La dernière partie porte sur le comportement de monocytes dans des circuits microfluidiques. Après avoir justifié les expériences menées et décrit des méthodes expérimentales spécifiques, nous présentons le travail préliminaire de calibration des réseaux microfluidiques créés. Il ressort des expériences menées sur les cellules qu'il existe trois phases du mouvement. Nous exposons ainsi successivement les résultats associés à la phase d'entrée des cellules, à leur régime transitoire et au régime stationnaire final. Pour finir, nous présentons l'étude préliminaire réalisée sur un dispositif d'écoulement élongationnel nommé "pince microfluidique".

Table des matières

Remerciements	iii
Introduction	v
I État de l’art, Matériels et Méthodes expérimentales	1
1 Rhéologie des cellules sanguines	3
1.1 Notion de Mécanique	3
1.2 Mécanique du globule rouge	6
1.3 Mécanique des leucocytes	8
1.4 Méthodes expérimentales	14
2 Circulation - Écoulement	19
2.1 Écoulement à bas nombre de Reynolds	19
2.2 Circulation sanguine	21
2.3 Rhéologie du sang	25
3 Matériels et Méthodes Communs	29
3.1 Microscopie	29
3.2 Video	31
3.3 Matlab	32
II Globules Rouges en Cisaillement	33
4 Modèles Elliptiques	37
4.1 Modèle KS	37
4.2 Modèle AFV-SS	41
4.3 Étude approfondie de la transition	42
4.4 Ouverture et présentation du travail.	46

5	Matériel & Méthodes pour RBC	47
5.1	Prélèvement et mise en solution des globules rouges	47
5.2	Écoulement	48
5.3	Microscopie	49
5.4	Résolution d'équation différentielle	49
6	RBC sous écoulement oscillant	51
6.1	Modèle	52
6.2	Observations expérimentales	56
6.3	Conclusion	59
7	RBC sous écoulements constants	61
7.1	Introduction	61
7.2	Régime solide	62
7.3	Transition vers et à partir du régime fluidisé	67
7.4	Discussion sur le rôle de la mécanique	70
7.5	Conclusion	71
8	Refonte du modèle	73
8.1	Déformation initiale	73
8.2	Contrainte dans la membrane	75
8.3	Puissance dans la membrane	76
8.4	Équation du mouvement	77
8.5	Conséquences du facteur correctif	77
8.6	Énergie de la membrane	79
8.7	Conclusion	80
9	Conclusion et perspectives	83
III	Monocytes dans un réseau de microcanaux	85
10	Choix expérimentaux	89
10.1	Création d'un réseau biomimétique adapté	89
10.2	Modification du cytosquelette des cellules	91
11	Matériels et Méthodes	93
11.1	Microfluidique	93
11.2	Écoulement dans les dispositifs	97
11.3	Cellules : lignée monocyttaire THP-1	98
11.4	Réalisation d'une expérience	99
11.5	Analyse des images	101

11.6	Correction des Distorsions	103
12	Calibration des réseaux	105
12.1	Étalonnage de l'écoulement	105
12.2	Passage d'objets modèles	112
12.3	Passage de cellules	119
12.4	Conclusion	123
13	Entrée dans le réseau	125
13.1	Pression critique dans le réseau	125
13.2	Entrée globale	130
13.3	Analyse détaillée de l'entrée des cellules	134
13.4	Entrée de cellules sans tension	142
13.5	Entrée des cellules avec tension	148
13.6	Retour sur le temps d'entrée	152
13.7	Expérience de micropipettes traditionnelles	155
13.8	Discussion	159
14	Régime transitoire	163
14.1	Variabilité des trajectoires	163
14.2	Évolution des formes	166
14.3	Évolution des vitesses	168
14.4	Mécanisme de stabilisation	170
14.5	Discussion	175
15	Régime stationnaire	179
15.1	Un mouvement stable et régulier	179
15.2	Friction dans les canaux	185
15.3	Friction différentielle	192
15.4	Discussion	194
16	Pince MicroFluidique	197
16.1	Croix Microfluidique	197
16.2	Modélisation de l'écoulement dans le dispositif	199
16.3	Asservissement de la position	201
16.4	Résultats Préliminaires et Pistes	204
16.5	Perspectives	206
17	Conclusion	209
	Conclusion Générale	211

Annexes	213
Bibliographie	215

Première partie

État de l'art, Matériels et Méthodes expérimentales

Chapitre 1

Rhéologie des cellules sanguines

Les cellules sont des objets complexes, présentant des rhéologies variées et fortement empreintes de visco-élasticité. Les différents constituants cellulaires apportent chacun une contribution à la rhéologie globale (élasticité des microtubules, visco-élasticité des gels d'actine, . . .). Des modèles très détaillés prenant en compte un grand nombre de constituants existent. Ils sont toutefois difficiles à utiliser et insolubles analytiquement. Pour ces raisons, on adopte très souvent des modèles "gros grains", où l'on utilise plutôt des valeurs globales moyennes pour décrire les objets. C'est ce genre d'approche qui est utilisé dans ce travail.

Nous faisons tout d'abord quelques rappels de mécanique portant sur les différents types d'éléments auxquels nous serons confrontés. Nous présentons ensuite les rhéologies des différents types de cellules, sans noyau comme les globules rouges et nucléées comme les monocytes. Pour finir, nous présentons les différentes techniques de mesures existantes, qui permettent d'obtenir chacune à leur manière des informations sur les objets étudiés : module d'extension, viscosité, élasticité, temps de relaxation.

1.1 Notion de Mécanique

La biomécanique aborde les tissus biologiques et les cellules sous l'angle des matériaux. À ce titre, les outils de mécanique de milieux continus et de mécanique des fluides sont utilisés pour comprendre le comportement des cellules en interaction avec un fluide ou d'autres structures.

Après un bref rappel sur la mécanique des membranes et des milieux continus, nous présentons les comportements mécaniques des globules rouges puis des leucocytes. Nous exposons finalement les différentes méthodes expérimentales permettant des mesures rhéologiques sur les cellules.

1.1.1 Déformation et contrainte

En mécanique des milieux continus, les états de déformation et contrainte sont décrits par des tenseurs. Ces tenseurs peuvent s'exprimer par des matrices, qui auront une dimension reliée à l'objet qu'elles représentent : matrice 2×2 pour une membrane, 3×3 pour un objet en trois dimensions.

Déformation Le tenseur des déformations définit l'état de déformation local d'un élément de volume. Il s'exprime à l'aide du vecteur des déplacements $\vec{u}(\vec{x}_0, t)$ qui indique qu'un segment porté initialement par le vecteur \vec{x}_0 s'allonge en $\vec{x}_0 + \vec{u}$ au temps t . \vec{u} sert à marquer les déplacements relatifs des points entre eux, et donc la déformation du matériau.

Le tenseur des déformations s'exprime comme :

$$\epsilon = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial \vec{x}_0} + \frac{\partial \vec{u}^T}{\partial \vec{x}_0} + \frac{\partial \vec{u}}{\partial \vec{x}_0} \cdot \frac{\partial \vec{u}^T}{\partial \vec{x}_0} \right) \quad (1.1)$$

Dans le cas de petites déformations, c'est-à-dire quand $\frac{\partial \vec{u}}{\partial \vec{x}_0} \ll 1$, le terme croisé $\frac{\partial \vec{u}}{\partial \vec{x}_0} \cdot \frac{\partial \vec{u}^T}{\partial \vec{x}_0}$ devient négligeable devant les deux autres. L'expression de la déformation se simplifie et adopte la forme utilisée ici :

$$\epsilon = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial \vec{x}_0} + \frac{\partial \vec{u}^T}{\partial \vec{x}_0} \right) \quad (1.2)$$

Contrainte Le tenseur des contraintes représente les forces agissant sur les surfaces d'un élément de volume dans le matériau. Ce sont ces forces qui sont à l'origine des déformations que nous pourrions observer. Sur un élément de surface infinitésimale quelconque, la contrainte crée une force :

$$d\vec{F} = \sigma \vec{n} dS \quad (1.3)$$

où σ est le tenseur des contraintes, \vec{n} le vecteur normal à l'élément de surface considéré et dS sa surface.

En règle générale, les tenseurs de contrainte et des déformations sont reliés par une loi rhéologique constitutive, qui représente les caractéristiques du matériau. Cette loi n'a pas de forme particulière, et prend la forme générale :

$$\sigma = \bar{\bar{G}} \epsilon \quad (1.4)$$

où $\bar{\bar{G}}$ est, de façon très générale, un tenseur d'ordre 4. On utilise souvent des modèles rhéologiques plus simples, donnant des expressions utilisables dans les

équations. Les éléments les plus simples sont les modèles élastiques et visqueux :

$$\boldsymbol{\sigma}_{el} = k\boldsymbol{\epsilon}_{el} \quad (1.5)$$

$$\boldsymbol{\sigma}_{vis} = \eta\dot{\boldsymbol{\epsilon}}_{vis} \quad (1.6)$$

où k est le module élastique du matériau et η est la viscosité.

1.1.2 Membrane

Toutes les cellules, mais aussi des objets plus simples comme des vésicules, comportent des membranes. La membrane cytoplasmique est la plus importante car elle contraint et définit spatialement une cellule. C'est aussi le premier des composants des cellules en contact avec son environnement. Ils en existent d'autres cependant, comme, par exemple, la membrane nucléaire qui a un rôle important lorsque la cellule subit de grandes déformations.

Les membranes biologiques sont constituées d'une bicouche lipidique, sur laquelle est généralement ancrée une série de protéines. L'ensemble a une épaisseur très faible devant l'extension de la cellule, et on le considère souvent, du point de vue de la mécanique, comme un objet à deux dimensions avec des propriétés physiques moyennes.

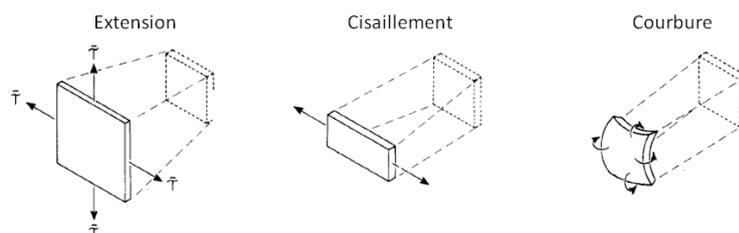


FIGURE 1.1 – Illustration des 3 déformations types d'une membrane : extension, cisaillement et courbure. Tiré de [29].

Considérons pour la suite un petit élément de la membrane, de surface A_0 et de côté L_0 . Cet élément de surface est soumis à deux contraintes σ_x et σ_y à des frontières. Plusieurs types de déformations élastiques peuvent apparaître, comme nous le montrons sur la figure 1.1 : une extension, un cisaillement, une courbure. En mécanique des surfaces, on rappelle que les contraintes sont des forces par unités de longueurs s'exprimant en $N.m^{-1}$.

Extension Une extension est une augmentation d'aire sans changement de forme (Fig. 1.1Gauche). Cette transformation crée une contrainte dans le matériau qui, pour des petites déformations, s'exprime comme :

$$\sigma_{ext} = K \times \frac{A - A_0}{A_0} \quad (1.7)$$

où K est le module de compressibilité. On parle aussi de contrainte de dilatation. La contrainte d'extension est $\sigma_{ext} = (\sigma_x + \sigma_y)/2$.

Cisaillement Le cisaillement est un changement de forme de l'élément A_0 sans changement de surface (Fig. 1.1Milieu). Dans le cas de petites déformations, la contrainte engendrée est proportionnelle à la déformation appliquée :

$$\sigma_{cis} = \mu \times \epsilon_{cis} = \mu \left(\frac{L^2}{L_0} - \frac{L_0^2}{L} \right) \quad (1.8)$$

où μ est le module de cisaillement de la membrane, L la longueur de l'élément de membrane une fois déformée et ϵ_{cis} la déformation de cisaillement. L'aire constante impose que la trace de la déformation de cisaillement soit nulle. La contrainte de cisaillement s'exprime comme $\sigma_{vis} = (\sigma_x - \sigma_y)/2$.

Courbure Il s'agit là d'une déformation hors plan. On change la courbure de l'élément A_0 sans changer sa forme générale (Fig. 1.1Droite). Dans ce cas, le moment des contraintes sera, pour une petite déformation, proportionnelle à la tension de la membrane :

$$M_{courb} = \tau_0 \cdot (c - c_0) \quad (1.9)$$

où τ_0 est la tension de la membrane, c est la courbure de l'objet et c_0 est sa courbure spontanée. Pour un petit élément de membrane, on peut définir deux directions principales. La courbure sera alors égale à la somme de l'inverse des deux rayons de courbure principaux $c = 1/R_1 + 1/R_2$. Dans le cas d'une sphère, ces deux rayons sont égaux : $c = 2/R$.

Viscosité En plus des déformations élastiques, une membrane peut avoir une capacité à dissiper de l'énergie et donc à relaxer une déformation appliquée. On associe cette dissipation à une viscosité surfacique η_s . Dans le cas d'une membrane purement visqueuse, on a :

$$\sigma_{cis} = \eta_s \cdot \dot{\epsilon}_{cis} \quad (1.10)$$

La viscosité surfacique s'exprime en $Pa.s.m = N.s.m^{-1}$.

1.2 Mécanique du globule rouge

Les globules rouges sont des cellules anucléées qui forment la majeure partie des cellules sanguines, et 45% du volume sanguin total.

1.2.1 Composition

Un globule rouge est une petite quantité de solution d'hémoglobine encapsulée par une membrane visco-élastique spécifique. Comme tous les globules rouges de mammifères, les globules rouges humains ne contiennent pas de noyaux. Ils sont fabriqués dans la moelle osseuse par érythropoïèse [68].

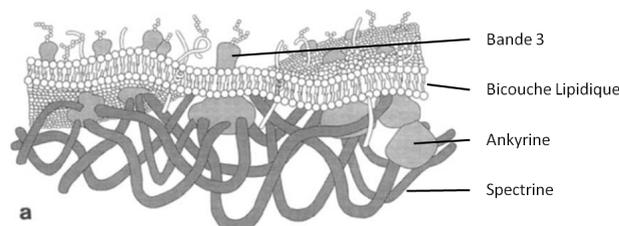


FIGURE 1.2 – Vue d'artiste de la membrane d'un globule rouge. Les différents composants sont représentés à l'échelle relative. Tiré de [68].

La figure 1.2 donne une vue schématique de la membrane d'un globule rouge. Elle est composée de trois éléments principaux : une bicouche lipidique, un cytosquelette de spectrine et des protéines transmembranaires reliant les deux.

Le cytosquelette de spectrine est un réseau grossièrement triangulaire de filaments de spectrine dont les noeuds sont formés par des complexes de jonction [68, 12]. La structure de spectrine, et particulièrement les filaments, possède des propriétés fortement élastiques, qui ont un grand rôle dans la dynamique des globules rouges.

L'ensemble encapsule une solution d'hémoglobine. Elle possède un comportement newtonien dont la viscosité moyenne à température ambiante est l'ordre de $10\text{mPa}\cdot\text{s}$. La viscosité dépend de l'âge de la cellule.

1.2.2 Valeurs rhéologiques

La bicouche est une surface organisée de lipides dont les queues hydrophobes sont orientées les unes vers les autres. La couche ainsi formée est d'épaisseur très fine par rapport à la taille de la cellule. De plus, les lipides sont mobiles les uns par rapport aux autres dans le plan de la membrane. On considère donc la bicouche comme un fluide à deux dimensions avec une viscosité surfacique de l'ordre de $10^{-7}\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}$. Pour une bicouche de 50nm d'épaisseur, cela correspond à un fluide de l'ordre de $\eta_f = \eta_s/e \approx 1\text{Pa}\cdot\text{s}$, soit une viscosité comparable à celle d'une huile alimentaire.

Le module de compressibilité de la membrane des globules rouges est de l'ordre de $500\text{mN}/\text{m}$ [68]. Si l'on considère des contraintes de lyse d'environ $20\text{mN}/\text{m}$ de ces cellules, cela implique qu'elle ne peuvent endurer qu'une déformation d'exten-

sion très faible de $\Delta A/A_0 = \sigma_{lyse}/K = 4\%$. On modélise donc souvent les bicouches lipidiques comme des objets extensionnellement indéformables.

Le réseau de spectrine forme une structure fortement élastique. Comme il est fixé sur une bicouche inextensible, on ne lui associe qu'une élasticité de cisaillement avec un module de $5\mu N/m$ [61, 62].

1.2.3 Mémoire de forme

L'élasticité du cytosquelette se manifeste par une mémoire de forme de la cellule. Fischer [33] a effectué des expériences de déformations temporaires sur des globules rouges, en appliquant une déformation avec un taux de cisaillement jusqu'à une valeur donnée, puis en arrêtant l'écoulement pour regarder la relaxation du système. Il remarque tout d'abord que les cellules récupèrent toujours leur forme biconcave. En marquant la position de la membrane avec des billes fixées sur sa surface, il observe de plus que ce sont toujours les mêmes éléments de membrane qui se placent sur l'anneau extérieur, et toujours les mêmes éléments qui forment la concavité de la cellule.

Le comportement rhéologique des globules rouges possède deux aspects importants. Ce sont des cellules très déformables, pouvant passer rapidement dans les plus petits capillaires du corps humain, afin d'approvisionner chaque partie en oxygène. Ils ont toutefois aussi une extraordinaire capacité à récupérer leur forme initiale, et donc à ne pas garder de séquelle d'une déformation subie. Ils retirent de ces deux caractéristiques la capacité de pouvoir se déformer 10^5 fois dans les petits capillaires au cours de leurs cent vingt jours de vie [68].

1.3 Mécanique des leucocytes

1.3.1 Noyaux

Le noyau cellulaire contient le matériel génétique d'une cellule, la chromatine, ainsi que l'infrastructure permettant son expression, notamment le nucléole chargé de la transcription d'un gène en ARN. Il est entouré par la membrane nucléaire, formée par l'assemblage de deux bicouches lipidiques. Le noyau est stabilisé par un squelette de filaments intermédiaires (lamine), ancré à la membrane lipidique par des protéines transmembranaires.

Les neutrophiles possèdent un noyau polylobé (Fig. 1.3) lui donnant globalement une forme allongé qui est rendu responsable de la bonne déformabilité des cellules dans les capillaires [25]. Les monocytes ont quant à eux un noyau monolobé, de taille relativement importante qui peut atteindre 80% de volume de la

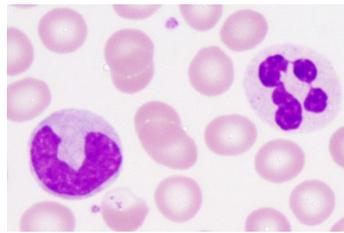


FIGURE 1.3 – Image d'un monocyte (à gauche) et d'un neutrophile (à droite).

cellule pour la lignée des THP-1 [103] que nous avons utilisé dans la deuxième partie.

Le noyau est le plus gros organe de la cellule, et parmi les plus rigides. Guilak et al. [40] ont ainsi mesuré, à l'aide d'un modèle de viscoélasticité linéaire, des élasticités de l'ordre de $1kPa$ associées à des viscosités entre 1 et $10kPa.s$. Plus récemment, Discher et al. [20] ont identifié le comportement rhéologique du noyau comme un matériau en loi de puissance, et donc associé à une infinité de temps de relaxation.

1.3.2 Cytoplasme et Cytosquelette

Le cytoplasme désigne le matériel contenu par la cellule en dehors du noyau. Il contient de nombreuses organites, dont le réticulum endoplasmique, les mitochondries ou l'appareil de Golgi. Ces organites baignent dans un fluide, le cytosol, solution aqueuse contenant beaucoup de protéines, des molécules polymériques (glucides par exemple), ainsi que des ions et des acides aminés.

Le cytoplasme contient aussi un élément très important pour la structure de la cellule : le cytosquelette. Il est composé de trois grands types de structures : les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine.

Microtubule Les microtubules sont des polymères de tubuline, d'un diamètre externe de $25nm$ [58]. Ces fibres ont la capacité de polymériser et dépolymériser très rapidement afin de pouvoir s'adapter à la forme de la cellule. Le réseau de microtubules s'organise autour du centrosome, à partir duquel les fibres croissent radialement [104]. Les microtubules interagissent avec les moteurs moléculaires auxquels ils servent de rails. Il en découle les deux rôles majeurs de microtubules pendant la vie de la cellule : maintenir l'organisation des organites à l'intérieur de la cellule et permettre le transport de cargos du centre de la cellule vers l'extérieur. Les microtubules jouent aussi un rôle primordial lors de la division cellulaire où ils participent à la séparation des deux noyaux avant la séparation des deux cellules filles [58].

Filament intermédiaire Les filaments intermédiaires sont des protéines fibreuses de $10nm$ de diamètre à forme torsadée. Ils peuvent fortement se déformer et supporter une contrainte importante. Ils jouent à ce titre un rôle important dans le maintien de la forme de la cellule. On les retrouve autour du noyau (lamine) et dans le cytoplasme, et ce pour une grande variété des cellules : muscles (desmine), épithélium (cytokératine), cheveux (kératine), etc [104, 58].

Actine Les filaments d'actine (F-actine) sont des polymères torsadés d'actine globulaire (G-actin) de $7nm$ de diamètre. Dilués en solution aqueuse, ils forment un gel aux propriétés visco-élastiques [87, 66].

Dans la cellule, l'actine est très présente à proximité de la membrane cytoplasmique où elle forme un réseau de tension, participant au maintien de la forme de la cellule et lui donnant une tension corticale [58]. Elle participe aussi à la formation et au renforcement de pseudopodes sur les cellules [111]. Dans le cas de cellules migrantes, l'actine participe à la déformation cellulaire. Une polymérisation-dépolymérisation très active a par exemple lieu dans le lamellipode d'une cellule adhérente qui lui permet d'exercer une force sur le substrat et de se déplacer [58].

Dans les muscles, l'association actine-myosine permet de créer un système contractile, responsable du mouvement de nos membres. Cette contractilité est aussi mise à contribution lors de la division cellulaire où l'actine forme un anneau contractile permettant de clivage final de la cellule [104].

Tension corticale ($pN/\mu m$)	35	[30]
	24	[71]
	27	[102]
	48 ± 10	[82]
	37 ± 4.8	[41]
Viscosité aux petites déformations (Pa.s)	6.5	[84]
	13	[93]
	89	[34]
	60	[44]
	31	[10]
Viscosité aux grandes déformations (Pa.s)	200	[30]
	139	[70]
Elasticité (Pa)	101.2 ± 5.4	[84]
	156 ± 87	[82]

TABLE 1.1 – Valeurs rhéologiques déterminés pour des neutrophiles

Valeurs rhéologiques Un récapitulatif des valeurs rhéologiques de neutrophiles trouvées dans la littérature est fourni dans le tableau 1.1. La tension corticale est de l'ordre de $30pN/\mu m$, soit 3 ou 4 ordres de grandeur inférieure à la tension de surface air/eau[42]. Les viscosités des petites déformations diffèrent d'un ordre de grandeur de celles des grandes déformations, ce qui fait apparaître l'aspect non linéaire de la rhéologie.

1.3.3 Microvilli

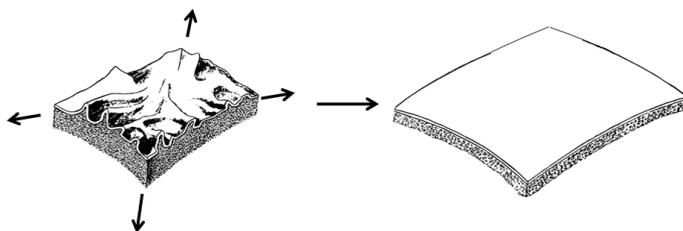


FIGURE 1.4 – Illustration de la présence de microvilli à la surface d'une cellule, et de l'extension associée. Tiré de [112].

Certaines cellules possèdent de nombreux plis à leur surface, que l'on nomme les microvilli (Fig. 1.4). Ces replis sont très riches en actine qui permet de les stabiliser [81]. Cette structure agit à l'échelle de la cellule comme un réservoir élastique de surface : une déformation extensionnelle déplie ces irrégularités sans rompre la bicouche et laisse donc la cellule intègre [112, 80]. Si la contrainte nécessaire à cette extension est relâchée, la cellule se retracte : les microvilli, une fois libres, se reforment et récupèrent l'excès de surface cédé lors d'une déformation.

1.3.4 Modèle rhéologique de cellules

Selon les conditions expérimentales et le type d'informations recherchées, la littérature propose plusieurs modèles rhéologiques pour les globules blancs. Considérons une cellule soumise à une contrainte σ , dont la déformation est ϵ et la vitesse de déformation est $\dot{\epsilon}$.

Modèle du solide linéaire standard Il s'agit d'un modèle de solide visco-élastique, utilisé principalement dans les années 1980 [84]. Il est constitué d'un ressort en parallèle avec un fluide de Maxwell (un ressort et un pot visqueux en série). Sa loi constitutive s'écrit :

$$\sigma + \frac{\eta}{k_2} \dot{\sigma} = k_1 \epsilon + \eta \left(1 + \frac{k_1}{k_2} \right) \dot{\epsilon} \quad (1.11)$$

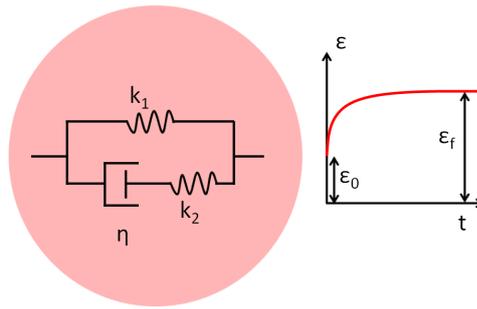


FIGURE 1.5 – Schéma du modèle solide standard. Une courbe de fluage en fonction du temps est représentée à droite.

La courbe d'une expérience de fluage est montrée figure 1.5 à droite. Trois caractéristiques de la déformation apparaissent. Il y a d'abord une élasticité instantanée du matériau, associée à la valeur initiale ϵ_0 . La déformation croît ensuite exponentiellement en fonction du temps. Cette vitesse de déformation est liée à un temps caractéristique qui dépend du rapport des élasticités et de la viscosité. Enfin, comme il s'agit d'un modèle de solide, la déformation finale est constante, et liée aux seules valeurs des modules des deux ressorts.

Ce genre de modèle solide permet de décrire des neutrophiles dans le cas de petites déformations effectuées sur des temps courts.

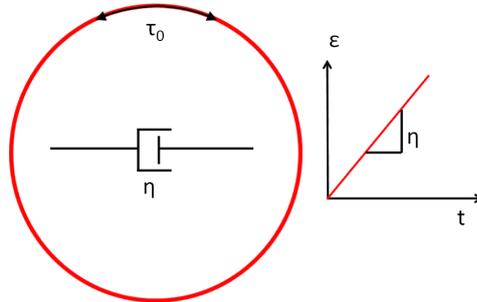


FIGURE 1.6 – Schéma du modèle de type goutte newtonienne. Droite : courbe de la déformation en fonction du temps pour expérience de fluage.

Gouttes visqueuses Le modèle de la goutte visqueuse a été utilisé par Evans et Yeung [112, 30] pour modéliser l'entrée de granulocytes dans des micropipettes. Il se compose d'une goutte de fluide newtonien de viscosité η entourée par une membrane de tension corticale τ_0 (Fig. 1.6). La présence d'une tension indique qu'il faut une certaine force pour courber l'interface de la cellule. La contrainte mettant en mouvement la goutte sera alors plus faible que la pression appliquée.

Une expérience de fluage sur un matériau visqueux engendre une déformation qui croît linéairement en fonction du temps. La dérivée de la déformation en fonc-

tion du temps est égale à la viscosité η . Contrairement au modèle standard, un modèle fluide ne fixe pas a priori de limite à la déformation.

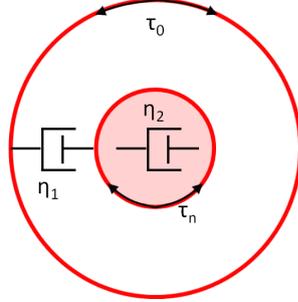


FIGURE 1.7 – Schéma du modèle de type goutte biphasique.

Gouttes biphasiques Il s’agit dans ce cas de prendre en compte les structures séparées du noyau et du cytoplasme. Il a en effet été montré sur des leucocytes [44] que les modèles de simples gouttes n’est pas suffisant pour décrire tous les aspects de la dynamique de déformation de ces cellules. Afin de modéliser la présence du noyau, un modèle biphasique a alors été imaginé [54, 53] (Fig. 1.7). Les deux composants, nucléoplasme et cytoplasme, sont représentés par des fluides newtoniens. Les deux membranes, nucléaire et cytoplasmique, sont modélisées comme des membranes à tension corticale constante.

Ce modèle est très intéressant du point de vue de la description physique des objets car il permet de prendre en compte les différences importantes de rhéologies entre les deux milieux. Il permet, de plus, de décrire un comportement du matériau variable en fonction de la déformation appliquée, ce qui est observé expérimentalement [44, 84, 30]. Il est cependant très complexe à intégrer dans une démarche de calcul explicite de la contrainte et de la déformation et a pour l’instant été appliqué uniquement dans des démarches numériques [53, 54].

Fluide en loi de puissance Le modèle précédent permet d’attribuer deux temps caractéristiques à la cellule : $\frac{\eta_1 * R_{cell}}{\tau_0}$ et $\frac{\eta_2 R_{noyau}}{\tau_n}$, et donc de tenir compte de deux constituants de la cellule.

Des expériences de rhéologie sur le noyau [20] ainsi que sur la cellule complète [102, 99, 6] ont mis en évidence une réponse des cellules dépendant des vitesses de déformation appliquées, et prenant une forme générale en loi de puissance :

$$\sigma = \eta_{eff} \dot{\epsilon} \quad , \quad \eta_{eff} = \eta_c \left(\frac{\dot{\epsilon}}{\dot{\epsilon}_c} \right)^{alpha} \quad (1.12)$$

où η_{eff} est la viscosité effective pour un taux de cisaillement donné. Les exposants

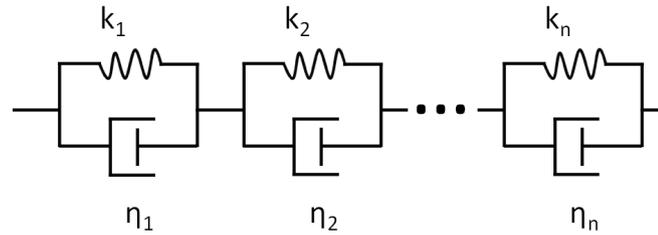


FIGURE 1.8 – Modèle visco-élastique avec une infinité de temps de relaxation. Tiré de [6].

déterminés valent environ 0.2 pour le noyau [20] et sont compris entre 0 et -0.5 [102, 99, 6] pour les cellules complètes.

Ces modèles offrent deux axes d'interprétation intéressants pour les cellules. Tout d'abord, les rhéologies en loi de puissance sont observées pour des microgels [20]. Les cellules, en raison de leur forte concentration en polymères, protéines et autres grosses molécules, pourraient entrer dans cette catégorie et montrer une rhéologie similaire. Ensuite, et plus particulièrement, une rhéologie en loi de puissance possède un nombre infini de temps de relaxation [6]. Un modèle comme celui présenté dans la figure 1.8 peut être un bon moyen de prendre en compte l'extrême complexité interne d'une cellule, pour laquelle on peut imaginer l'existence d'un temps caractéristique pour chacun de ses constituants.

1.4 Méthodes expérimentales

Il existe de nombreuses méthodes expérimentales permettant des mesures de rhéologie sur des cellules uniques. Elles ont toutes le même principe en commun : appliquer une contrainte connue et observer la réponse de la cellule en déformation. En connaissant ou en postulant ensuite un modèle rhéologique pour l'objet étudié, on peut en déduire des paramètres caractéristiques du matériau.

1.4.1 Pince optique et pince magnétique

Les deux méthodes utilisent des billes, fixées à la surface des cellules, que l'on fait bouger pour appliquer une déformation.

Les pinces optiques capturent des billes diélectriques en focalisant un laser. Il est alors possible de les déplacer pour imposer une déformation à la cellule [61, 62]. La force applicable dépend de l'intensité du rayon laser utilisé. Le lien entre force appliquée et déformation imposée par les billes dépend de la rhéologie.

Les pinces magnétiques utilisent des billes ferromagnétiques dont l'orientation peut être modifiée en appliquant un champ magnétique. La rotation de la bille pour s'aligner avec le champ magnétique appliqué dépend des propriétés mécaniques du

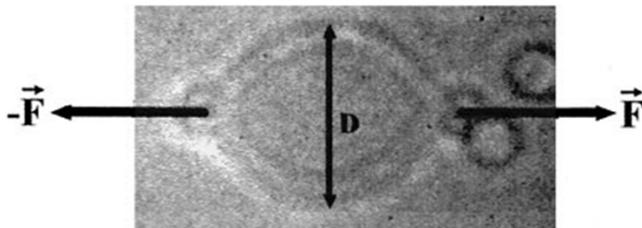


FIGURE 1.9 – Image d'une expérience de pince optique sur un globule rouge, tirée de [43].

substrat auquel elle est rattachée, et donc de la rhéologie de la cellule.

1.4.2 Microrhéologie

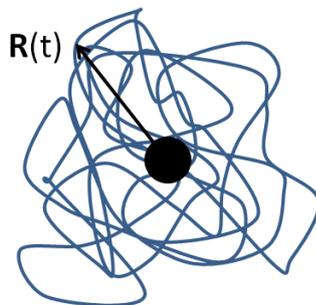


FIGURE 1.10 – Illustration du mouvement d'une bille utilisée pour des expériences de microrhéologie.

En microrhéologie, on cherche à mesurer les fluctuations $\langle [\vec{R}(t + \tau) - \vec{R}(t)]^2 \rangle$ de petits objets en fonction du temps. Grâce à la relation de Stokes-Einstein généralisée, on peut avoir accès à la rhéologie du milieu dans lequel les billes sont immergées ou auquel elles sont attachées [58]. Il existe deux approches pour les expériences de microrhéologie : une approche passive et une approche dite active.

L'approche passive ne nécessite pas de contact avec les billes. On cherche à observer leur mouvement spontané sous l'influence de la température. L'observation peut être faite directement par un microscope, ou par diffusion de lumière à travers un échantillon de la solution de billes. Cette méthode permet aussi d'observer les fluctuations simultanées de deux ou trois billes, qui seront corrélées par la rhéologie du matériau. En biophysique, cette méthode est devenue populaire car on peut remplacer les fluctuations des billes par les fluctuations des petits composants internes et ainsi mesurer *in situ* les propriétés rhéologiques d'une cellule [76].

L'approche active nécessite l'application d'une force sur une bille, souvent la pression de radiation d'un laser. Les fluctuations de la bille dans le puits de potentiel sont reliées à la rhéologie du milieu environnant. Cette technique est limitée à

l'observation d'une seule bille. La détection de la bille est cependant faite par une photodiode, ce qui permet d'accroître fortement la résolution spatiale et temporelle de la bille. On a ainsi accès à des domaines de fréquences plus élevées de la rhéologie de la cellule [58].

1.4.3 Microscopie à force atomique

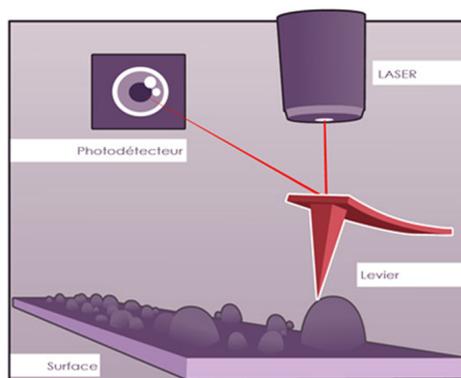


FIGURE 1.11 – Illustration d'un microscope à force atomique.

Un microscope à force atomique (AFM) est composé d'un petit cantilever dont la position est contrôlée par des cristaux piezo-électriques (Fig. 1.11). Un laser est envoyé sur le bout du cantilever et est réfléchi en direction d'une photodiode afin de déterminer la position de la pointe. Lorsque l'on appuie cette pointe sur une surface, le cantilever flambe en étant repoussé par le substrat. En le déplaçant sur chaque point d'une surface, les déviations de la pointe mesurées par la photodiode pourront être retranscrites en une image très précise de la surface. On peut ainsi obtenir des images de cellules adhérentes à un substrat, et même des images de molécules d'ADN.

Une autre utilisation de cet instrument concerne l'application et la mesure de force. Le cantilever est en effet un ressort, dont le flambage dépend de la force qu'on lui applique. La raideur du ressort peut être évaluée en mesurant par exemple sa fréquence de résonance lors d'oscillation des cristaux piezo-électriques. On peut alors effectuer de nombreux types d'expériences en connaissant le lien entre force appliquée et position, donc le lien entre contrainte et déformation.

Il est possible par exemple d'appliquer une force constante sur une cellule. En cas de relaxation, une boucle de rétroaction avec les cristaux piezo-électriques permettra d'abaisser graduellement le cantilever pour conserver une force identique. De la même manière, on peut faire osciller le cantilever sur une surface pour appliquer une force sinusoïdale. La réponse en position du cantilever permettra

finaleme nt de mesurer les modules rhéologiques complexes $G'(\omega)$ et $G''(\omega)$ pour diverses fréquences ω du cantilever.

1.4.4 Contrainte hydrodynamique

Pour appliquer une contrainte de petits objets, on peut utiliser un écoulement hydrodynamique. Les équations de la mécanique des fluides nous permettent de calculer la contrainte qui s'applique sur l'objet et une visualisation par microscopie permet de mesurer la déformation de l'objet. Si l'on peut utiliser a priori n'importe quel écoulement, plusieurs géométries particulières sont utilisées pour leur simplicité.

Les chambres à flux et les rhéoscopes sont utilisés pour appliquer une contrainte de cisaillement sur les objets. Les chambres à flux sont très faciles à utiliser mais ne permettent pas d'observation très longue des cellules. Les rhéoscopes, qui sont des rhéomètres cône-plan transparents permettant une visualisation microscopique, ont une gamme de contrainte applicables plus grande et permettent normalement de stabiliser l'objet pour permettre une observation longue. Ils sont toutefois plus difficiles à mettre en oeuvre et demandent un matériel spécifique.

L'écoulement extensionnel a été utilisé pour mesurer l'élasticité entropique de brins d'ADN [49] ou pour mesurer l'étirement critique de vésicules [55]. La difficulté ici est de maintenir l'objet au centre de l'écoulement.

1.4.5 Aspiration par micropipettes

Né en 1954 [67], cette technique expérimentale a connu son essor dans les années 80'. Au fur et à mesure, les sophistications des modèles ont permis de diversifier le champ d'application de cette méthode. Elles servent aujourd'hui à mesurer des élasticités [95, 51, 19], des viscosités [30], coefficients de diffusions [76], des temps de relaxation [96, 100], et ce sur un grand nombre d'objet : cellules, vésicules, billes de gels. Des évolutions, comme le "Biomembrane Force Probe" [28] ont été développées afin de permettre l'étude de lien entre protéines et l'application d'une force contrôlée et constante, à la manière d'une microscope à force atomique.

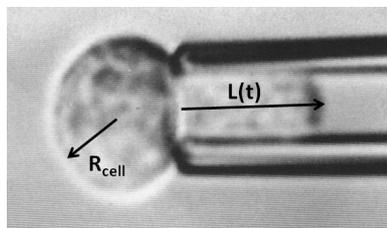


FIGURE 1.12 – Image d'une expérience de micropipette tirée de [30].

Pour réaliser une expérience, on aspire une cellule de diamètre D_{cell} dans une pipette cylindrique de rayon inférieur $2R_p < D_{cell}$ avec une dépression précisément connue et contrôlée. On mesure alors la longueur de la projection de la cellule dans la pipette L_p en fonction du temps. Le comportement de L_p dépend fortement du type d'objet testé : des chondrocytes élastiques atteignent un plateau de déformation dépendant de la contrainte appliquée [95, 51] alors que des neutrophiles fluides entrent à vitesse constante et peuvent s'introduire complètement dans la pipette [30, 70, 71, 44].

Par ailleurs, ce dispositif peut être utilisé en sens inverse : après une aspiration complète de la cellule, on la relâche et on mesure la relaxation de sa forme en fonction du temps [100, 96]

Chapitre 2

Circulation - Écoulement

2.1 Écoulement à bas nombre de Reynolds

La majorité des informations de cette section sont tirées de [42].

2.1.1 Compétition Inertie-Viscosité

Dans un écoulement hydrodynamique, deux mécanismes de transport de quantité de mouvement existent simultanément. L'un est convectif et correspond au transport global de matière lors de l'écoulement. L'autre est diffusif et prend son origine dans les chocs entre les particules à l'échelle microscopique. En fonction du type d'écoulement, c'est-à-dire en fonction de la vitesse, de la géométrie ou du fluide utilisé, ces deux phénomènes n'auront pas le même ordre de grandeur.

Pour comparer leur grandeur respective, on calcule le rapport des flux de quantité de mouvements dans les deux cas. Considérons un fluide de masse volumique ρ , de viscosité dynamique η , s'écoulant à une vitesse U dans une conduite de diamètre L . Le flux convectif est de l'ordre de ρU^2 et correspond à l'énergie cinétique volumique de l'écoulement. Le flux diffusif est de l'ordre de $\eta U/L$ et correspond à la quantité volumique d'énergie dissipée. Le nombre de Reynolds est défini comme le rapport du flux convectif sur le flux diffusif et vaut :

$$Re = \frac{\rho U L}{\eta} \tag{2.1}$$

Il existe d'autres définitions du nombre de Reynolds. On retrouve ainsi la même expression en comparant le temps caractéristique de diffusion sur le temps caractéristique de convection. De même, il apparaît naturellement dans les équations de Navier-Stokes lorsque l'on compare les valeurs relatives (en ordre de grandeur) des termes de mouvements convectifs et diffusifs.

Le nombre de Reynolds classe les écoulements en deux grandes catégories en fonction de la valeur de Re . Les écoulements à grand nombre de Reynolds $Re \gg 1$ sont les écoulements à grandes vitesses, grandes dimensions et/ou faibles viscosités. Ils correspondent au monde dans lequel nous évoluons, que l'on considère l'écoulement de l'air (vent), la façon dont on nage, le vol des avions. Les écoulements à faible nombre de Reynolds $Re \ll 1$ sont les écoulements des petites dimensions, des faibles vitesses et/ou des fortes viscosités. Ces écoulements dominés par les effets de viscosités sont prédominants dans le monde microscopique, par exemple dans la nage des bactéries.

Nous avons ici réalisé deux types d'expériences : écoulement de globules rouges dans une chambre à flux et circulation de globules blancs dans un réseau microfluidique. Le nombre de Reynolds vaut $\frac{1000 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{-3}}{10^{-2}} \propto 0.1$ pour les globules rouges et $\frac{1000 \cdot 10^{-2} \cdot 10^{-5}}{10^{-3}} \propto 0.1$ pour les globules blancs. Il s'agit dans les deux cas d'écoulements à bas nombres de Reynolds où les écoulements sont laminaires et les forces visqueuses prépondérantes.

2.1.2 Équation de Stokes

Pour des écoulements à faible nombre de Reynolds, l'équation de Navier-Stokes peut être simplifiée : on peut enlever tous les termes convectifs car ils sont de grandeur négligeable par rapport aux autres. On obtient alors l'équation de Stokes :

$$\vec{\nabla} P = \eta \Delta \vec{v} + \rho \vec{f} \quad (2.2)$$

où P est le champ de pression dans le fluide, \vec{v} le champ des vitesses et \vec{f} un champ de force extérieur éventuel s'appliquant sur les particules de fluides.

Négliger les effets convectifs permet d'exclure les dépendances explicites en temps de l'équation du mouvement. Ainsi, dans la limite des écoulements à bas nombres de Reynolds, l'application d'une différence de pression sur un dispositif met instantanément le fluide en mouvement. De même, la suppression de la différence de pression stoppe instantanément le déplacement du fluide. IL existe ainsi un lien direct entre différence de pression appliquée et vitesse du fluide.

2.1.3 Résistance hydrodynamique

Pour un système de conduites où l'écoulement est à bas nombre de Reynolds, une différence de pression entraîne l'établissement d'un champ de vitesse, et donc d'un débit volumique de matière circulant dans le dispositif. On introduit alors le concept de résistance hydrodynamique, qui relie la pression ΔP et le débit Q selon

la relation suivante :

$$\Delta P = R_H Q \quad (2.3)$$

Dans des conditions d'expériences simples, c'est-à-dire avec un dispositif indéformable dans lequel circule un fluide newtonien, la résistance hydrodynamique est constante et dépend de la géométrie du système et de la viscosité du fluide.

Dans ce cas, on fait généralement une analogie avec les systèmes électriques et la loi d'Ohm. La différence de pression est reliée à la différence de potentiel, c'est-à-dire la tension ; le débit volumique de fluide est relié au débit d'électron, donc au courant électrique. L'analogie persiste à propos des propriétés d'additivité des résistances. Si l'on considère deux résistances hydrodynamiques R_1 et R_2 , les résistances équivalentes en série R_{--} et en parallèle $R_{=}$ se calculent de la façon suivante :

$$R_{--} = R_1 + R_2 \quad (2.4)$$

$$\frac{1}{R_{=}} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \quad (2.5)$$

Ces propriétés d'additivité des résistances hydrodynamiques sont un moyen d'analyse puissant des systèmes microfluides complexes.

2.2 Circulation sanguine

La majorité des informations de cette section sont tirées de [27].

2.2.1 Vaisseaux de grandes tailles

La vasculature humaine est composée d'un très grand nombre de vaisseaux, aux tailles très variables (Fig. 2.1). De cette grande dispersité résultent des comportements hydrodynamiques du sang très différents d'un type de vaisseau à un autre.

Coeur Le sang est mis en mouvement dans le corps par le coeur, une pompe musculaire d'environ 15cm de diamètre. Pour mettre le sang en mouvement, le coeur se contracte entre 60 et 120 fois par minute et génère ainsi un écoulement pulsé. Sur une journée, il effectue ainsi environ 100 000 contractions et pompe l'équivalent de 8 000 litres de sang.

La contraction du coeur est un cycle en trois parties. La systole auriculaire est la contraction des oreillettes qui éjecte le sang vers les ventricules. Ceux-ci se contractent ensuite lors de la systole ventriculaire. Le sang est alors envoyé

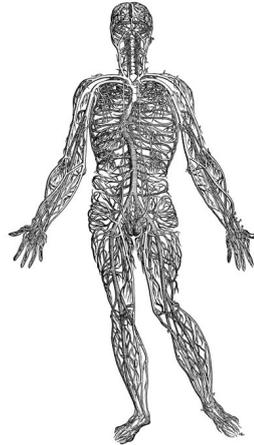


FIGURE 2.1 – Gravure Montrant le réseau vasculaire dans un corps humain.
Réalisé par Andreas Visalius, 1543

vers le système circulatoire par l'aorte. Finalement, la diastole marque une relaxation complète du coeur, qui permet son remplissage avant de recommencer un cycle. Chez une personne en bonne santé, les valeurs de pression sont d'environ $120\text{mmHg} \approx 160\text{mbar}$ pour la pression systolique et $80\text{mmHg} \approx 100\text{mbar}$ pour la pression diastolique.

La double contraction du coeur est à l'origine du bruit caractéristique des battements cardiaques et du pouls que l'on peut sentir en touchant certains vaisseaux.

Aorte Le plus grand vaisseau sanguin du corps humain est l'aorte. C'est une conduite d'environ 2.5cm de diamètre capable de transporter 50 à 100mL de sang par seconde. La vitesse du sang y est de 18cm/s en moyenne, mais peut atteindre plus de 1m/s au pic de pression systolique. Le taux de cisaillement à la paroi est d'environ $2V/R$, soit 10s^{-1} en moyenne et jusqu'à 40s^{-1} .

Ramification vasculaire Le système circulatoire est séparé en deux parties. Les vaisseaux pulmonaires forment le réseau par lequel le sang va relâcher le dioxyde de carbone et s'approvisionner en oxygène. Les vaisseaux systémiques irriguent le reste du corps pour fournir l'oxygène aux différents organes.

Les deux réseaux ont une architecture commune. Les artères se divisent en artérioles, qui se divisent elles-mêmes en capillaires pour irriguer les organes. Une fois sortis, elles se regroupent en veinules, qui se regroupent en veines pour ensuite aller vers le coeur. La figure 2.2 montre les variations de pressions, vitesse et section vasculaire totale en fonction du type de vaisseau traversé. Par conservation de la matière, le débit sanguin total doit être conservé dans chaque zone du système vasculaire. Ainsi, dans les capillaires, l'augmentation de la section totale de

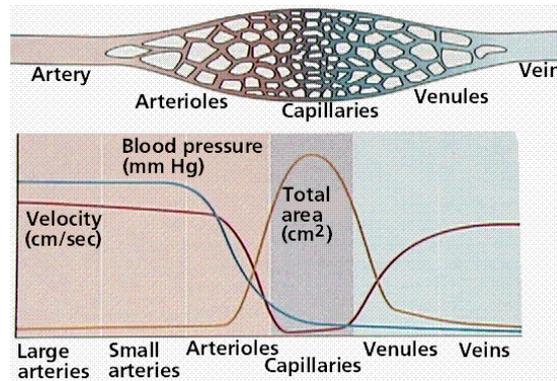


FIGURE 2.2 – Schéma de la variation de la pression sanguine, de la vitesse sanguine et de la section vasculaire totale en fonction du type de vaisseaux sanguins considéré. Purves et al., Life : The Science of Biology.

vaisseau sanguin impose une diminution de la vitesse dans ces vaisseaux.

2.2.2 Microcirculation

La microcirculation désigne l'écoulement dans les plus petits des vaisseaux sanguins. Elle se produit dans les capillaires, réseau hautement ramifié situé entre les artérioles et les veinules. On trouve des réseaux de capillaires dans de nombreux organes. En raison de leur grande surface de contact avec les tissus, les réseaux de capillaires sont le lieu privilégié des échanges gazeux. Le dioxygène est transporté par le sang jusqu'aux organes où il est délivré. Les globules rouges se chargent alors en dioxyde de carbone et sont transportés vers les poumons. Ils rejettent alors le CO_2 pour se réapprovisionner en O_2 .

Diamètre (μm)	1 – $[7.5 \pm 2.3]$ – 15
Longueur (μm)	1 – $[14.4 \pm 5.8]$ – 38
Nb segments / Alvéole	1000
Nb segments / traversée	40 – $[50]$ – 100
Distance moyenne parcourue (mm)	1
Volume capillaire total (mL)	100

TABLE 2.1 – Valeur géométrique des capillaires pulmonaires. Valeurs tirées de [25, 45].

Les capillaires pulmonaires forment un réseau qui serpente autour des alvéoles. Chaque cellule passe par 8 et 17 alvéoles en moyenne à chaque traversée des poumons [25]. Les dimensions des capillaires sont données en table 2.1. La différence de pression aux bornes d'un capillaire est de l'ordre de $10Pa$ [48, 10]. Par conservation du débit sanguin, on trouve une vitesse du fluide d'environ $0.1mm.s^{-1}$ [27].

2.2.3 Variation du flux et chaos

L'écoulement sanguin a une vitesse variable en fonction du vaisseau dans lequel il passe, mais aussi en fonction du temps. Le coeur produit un écoulement pulsé dépendant du temps. La vitesse maximale correspond à l'instant de contraction systolique ventriculaire associé à une pression maximale, la vitesse minimale est atteinte lors de la diastole.

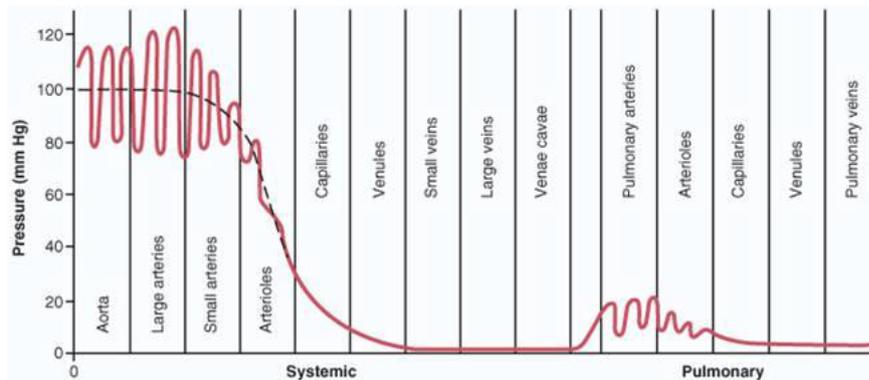


FIGURE 2.3 – Variation de la pression en fonction du type de vaisseau sanguin. Guyton & Hall, Textbook of medical physiology.

Atténuation des pulsations Les pulsations de l'écoulement sont très fortes dans les grands vaisseaux sanguins comme l'aorte ou les artères. Cependant, les variations sont atténuées au fur et à mesure de la réduction de section des vaisseaux. Ainsi, la pression varie de 40 mmHg dans l'aorte, de 20 mmHg à l'entrée des artérioles et n'est plus pulsée dans les capillaires (Fig. 2.3). Ces pulsations entraînent des variations de flux non négligeables. Elles sont cependant absorbées par la déformation dynamique des vaisseaux sanguins et ne sont ainsi plus ressenties par les vaisseaux situés très en aval du coeur. La différence de pression ressentie dans les capillaires est donc stable et non-perturbée par les pulsations du coeur.

Chaos Plusieurs études ont observé et mesuré des écoulements chaotiques dans la microcirculation [38, 7, 101]. Le flux sanguin et la pression mesurée étaient alors variables et non-périodiques. Ces caractéristiques ont été observées chez des lapins et des chiens, dans différentes parties du réseau vasculaire.

Les auteurs attribuent le chaos observé à un couplage entre la contraction/dilatation des vaisseaux sanguins et la rhéologie complexe des cellules sanguines et du sang. Plusieurs variables biochimiques de contrôle de l'apparition du chaos ont été identifiées, laissant penser que le chaos est lié à un contrôle de l'écoulement sanguin

par l'organisme. Sans pour autant avoir tranché sur le caractère favorable ou défavorable du chaos sanguin, les auteurs estiment que l'extrême sensibilité aux conditions expérimentales du chaos pourrait être exploitée par le corps pour effectuer de grands changements d'état circulatoire en utilisant un minimum d'énergie.

2.3 Rhéologie du sang

2.3.1 Composition

Le sang est une suspension de cellules dans une solution aqueuse d'électrolyte, de protéines et de molécules organiques diverses. Il est composé d'environ 55% de plasma, 45% de globules rouges, le reste étant partagé entre les leucocytes et les plaquettes. Le plasma est une solution contenant en masse 90% d'eau, 7% de protéines, 1% de substance inorganique et 1% de substance organique [35]. En temps normal, la concentration de globules rouges est d'environ $5.10^6 \text{cellules}/\text{mm}^3$, la concentration de globules blancs de $6000 \text{cellules}/\text{mm}^3$ et la concentration de plaquettes de $300000 \text{cellules}/\text{mm}^3$, pour un volume sanguin corporel d'environ 6L [35]. Ces valeurs varient selon le sexe, et peuvent évoluer avec l'apparition d'une maladie chez le patient.

2.3.2 Comportement rhéologique

Le plasma est une solution newtonienne d'une viscosité d'environ 1.2mPa.s . Le sang total possède une rhéologie complexe, variant en fonction de plusieurs paramètres.

Tout d'abord, sa viscosité augmente avec le taux de globules rouges (l'hématocrite) [9]. Cette variation est non-linéaire et peut avoir des effets lors d'anémies ou de transfusions sanguines.

Par ailleurs, le sang est une solution au comportement rhéofluidifiant : plus on augmente le taux de cisaillement, plus sa viscosité apparente diminue. On mesure ainsi une viscosité de 0.1Pa.s à 100s^{-1} , 20mPa.s à 1s^{-1} et 10mPa.s à 100s^{-1} . On lui associe de plus une contrainte seuil d'écoulement de 3mPa environ. Cette rhéofluidité est principalement due au comportement des globules rouges en solution. A faible taux de cisaillement, les globules rouges sont désordonnés et nécessitent une force importante pour laisser l'écoulement s'établir. Ils forment même parfois des empilements de cellules, appelés rouleaux, qui augmentent la taille des grains de la suspension et donc sa viscosité [8]. La formation des rouleaux est due à un phénomène de déplétion, influencé directement par la composition du plasma [72]. A plus fort taux de cisaillement, ils tendent à s'aligner et facilitent ainsi l'écoulement global de la suspension [85].

Pour finir, la rhéologie du sang dépend aussi de la viscosité des globules rouges. Comme nous le développerons dans la deuxième partie de ce document, les globules rouges ont deux régimes de mouvements quand ils sont soumis à une contrainte de cisaillement : un régime de bascule où ils tournent sur eux-mêmes et un régime dit de chenille de char où leur orientation reste constante en fonction du temps. Or, le seuil de cette transition dépend crucialement de la viscosité interne des cellules. Plus celle-ci est importante, plus la transition aura lieu à un fort taux de cisaillement, et donc plus la viscosité globale du sang sera importante. Il y a un effet à grande échelle non-négligeable de la rhéologie des cellules à petite échelle.

2.3.3 Comportement en écoulement

L'écoulement du sang dans un vaisseau présente plusieurs caractéristiques particulières.

Vaisseaux de grandes tailles On vient de voir que l'orientation des globules rouges dépend de la vitesse d'écoulement du sang. Cette vitesse modifie aussi la répartition spatiale des cellules dans la conduite. Il existe, en effet, une force hydrodynamique qui repousse les petits objets de la paroi[3]. A une vitesse suffisante, les globules rouges se décollent de la paroi du vaisseau et créent une couche de déplétion. On observe alors un écoulement de type bouchon pour lequel la vitesse des éléments au centre forme un plateau. Physiologiquement, cette déplétion a pour effet de diminuer la contrainte sur les parois du vaisseaux et de faciliter l'écoulement du sang.

Une interaction spécifique existe aussi entre les globules rouges et blancs. Par effet de ségrégation, similaire à ce qui est rencontré pour les milieux granulaires, les globules blancs sont repoussés contre les parois des vaisseaux par le flux de globules rouges. Dans des vaisseaux assez grands, on trouve ainsi les globules rouges au centre circulant avec une vitesse très élevée, et les globules blancs roulant sur les parois à une vitesse très inférieure. D'un point de vue physiologique, cette ségrégation force les globules blancs à circuler au plus près des potentiels sites de recrutement en vue d'une réponse immunitaire.

Microcirculation Dans la microcirculation, il existe de grandes différences entre le transport des deux types de globules [25]. Les globules rouges, disques de $8\mu m$ de diamètre, ont un temps de transit dans le réseau des alvéoles pulmonaires compris entre 1.4 et 4.2s . Leur très grande déformabilité leur permet de traverser le réseau de capillaires sans problème. Dans ce mêmes réseau, les globules blancs, sphéroïdes de diamètre compris entre 8 et $25\mu m$ en fonction du type de cellule, ont un temps de transit moyen de 26s et un temps de transit médian de 6.1min. La nécessité

pour eux de beaucoup se déformer les ralentit par rapport aux globules rouges. De 35% et 50% des neutrophiles s'arrêtent ainsi au moins une fois au cours du mouvement. On dit qu'ils circulent par saut. Ce fort ralentissement des neutrophiles par rapport aux rouges génère une surconcentration de neutrophiles dans les capillaires pulmonaires, nommée phénomènes de marginalisation. La concentration dans les poumons est ainsi 45 à 60 fois supérieur à celle observée dans le reste du corps. On pense que ce surcroît de cellules immunitaires dans les poumons crée une veille immunitaire qui aide le corps à se défendre contre les agents pathogènes aéroportés.

Chapitre 3

Matériels et Méthodes Communs

3.1 Microscopie

La visualisation des expériences est réalisée à travers un microscope inversé. Deux modèles sont disponibles : un Leica DMIRB et un Olympus IX71.

Le Leica est utilisé pour les expériences de globules rouges. On réalise l'image avec des objectifs 40x et 50x.

L'Olympus est utilisé pour les expériences de microfluidique sur les globules blancs. On utilise pour faire les images des objectifs 0x et 40x.

3.1.1 Visualisation en fond clair

Nous observons simplement l'échantillon à travers le microscope avec un éclairage de Köhler. Les niveaux de gris sont créés par l'absorption de l'échantillon et/ou la redirection des rayons lumineux (sur les bords des objets transparents par exemple). Plusieurs paramètres permettent de modifier la qualité de l'image. Le diaphragme de champ modifie la taille de la zone éclairée. Le diaphragme d'ouverture modifie l'ouverture numérique de l'éclairage. En le fermant, on diminue la quantité de lumière traversant l'échantillon, mais on augmente le contraste et la profondeur de champ. Un diaphragme trop fermé fait apparaître des franges d'interférences sur l'image, indiquant que l'on a atteint la limite de résolution du microscope.

3.1.2 Visualisation en contraste de phase

La microscopie à contraste de phase permet de visualiser les différences d'indice optique entre deux milieux, en leur donnant une luminosité différente. Cette méthode est basée sur un filtrage passe-haut de l'image et sur un déphasage contrôlé. L'échantillon est éclairé avec un cône de lumière blanche créé par un diaphragme

circulaire placé dans le condenseur. La lumière est alors filtrée par un anneau noir, conjugué du diaphragme, contenu dans l'objectif. L'objectif contient aussi une lame quart d'onde qui va déphaser la lumière restante pour en améliorer le contraste final. Cette méthode réalise donc un filtrage spatial de l'image pour enlever le mode de Fourier $n^{\circ}0$.

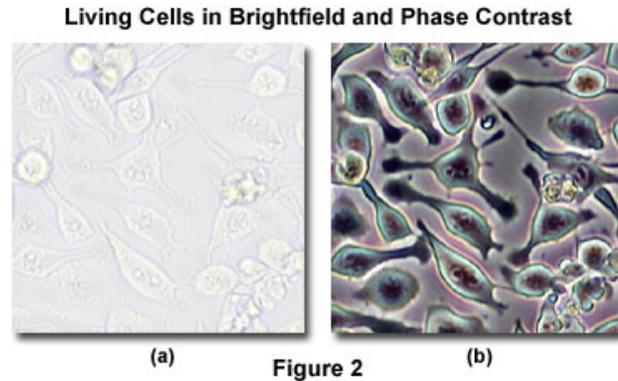


FIGURE 3.1 – Image de cellule cérébrale gliale par microscopie optique. A : microscopie en fond clair. B : microscopie en contraste de phase. (site web éducatif, Nikon MicroscopyU).

Ainsi, comme le montre la figure 3.1b, les images obtenues par contraste de phase sont plus sombres en moyenne mais présentent un contraste plus important. La limitation de cette technique vient de l'effet de halo qui apparaît lors de la visualisation.

3.1.3 Microscopie à contraste interférentiel

La microscopie à contraste interférentiel permet aussi de visualiser des différences d'indice optique très faible, mais de façon plus précise et plus puissante.

Le système est composé successivement d'un polariseur, d'une filtre de Wollaston, de l'échantillon, d'un deuxième prisme de Wollaston et enfin d'un analyseur. Il crée 2 faisceaux de lumière polarisés perpendiculairement qui vont chacun traverser l'échantillon pour en créer une image. Ces 2 faisceaux sont réunis en sortie où ils interfèrent, ce qui réalise l'image finale.

L'image créée donne l'impression de voir l'échantillon en relief et éclairé en biais. Les niveaux de luminosité sont simplement le résultat d'interférences constructives ou destructives.

Bien que permettant des visualisations exceptionnelles, cette méthode possède deux limitations. Tout d'abord, du fait du jeu de polariseur-analyseur croisé, elle diminue fortement la quantité de lumière obtenue. Ensuite, les différences de luminosité entre la gauche et la droite de l'objet par exemple rendent le traitement

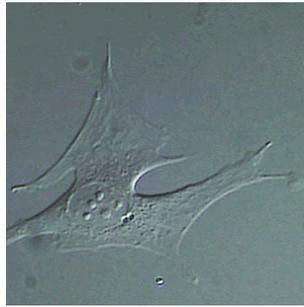


FIGURE 3.2 – Image d’une cellule fixée en microscopie à contraste interférentiel. JPK Instruments.

automatisé de l’image beaucoup plus délicat qu’en fond clair ou en contraste de phase.

3.2 Video

L’aquisition de films est réalisée grâce à des caméras vidéos reliées à un ordinateur. Nous disposons de quatre caméras qui possèdent chacune leurs propriétés particulières.

3.2.1 Caméra Vidéo

Il s’agit d’une caméra de marque COHUE. Elle réalise des films à $25\text{image}/s$ que l’on enregistre sur l’ordinateur au moyen d’une carte Hauppauge WINTV-Express.

3.2.2 Caméra Ultra-rapide

Cette catégorie compte une PCO 1200hs et une Photron SA-4. Les deux caméras enregistrent les images dans une mémoire embarquée. La proximité entre le capteur et la mémoire, ainsi que l’optimisation de l’électronique, permet un enregistrement très rapide. La quantité de mémoire est cependant réduite et ne permet pas de réaliser des films très longs.

La Photron possède un capteur de 1024×1024 pixels et peut atteindre la vitesse de $3600\text{image}/s$ en plein capteur.

La PCO possède un capteur de 1280×1024 pixels et peut atteindre la vitesse de $636\text{images}/s$ en plein capteur.

Dans les deux cas, la vitesse d’aquisition est inversement proportionnelle à la taille de la zone sélectionnée sur le capteur : un capteur deux fois plus petit permettra d’obtenir un film deux fois plus rapide.

3.2.3 Caméra rapide pour film longue durée

Il s'agit ici d'une solution hybride entre caméra vidéo et caméra ultra-rapide. Une caméra à interface CameraLink est reliée à un ordinateur équipé d'un système de disque dur optimisant la vitesse d'écriture des données. Avec ce système, on peut enregistrer un film de 1280×1024 pixels à 160images/s en continu. Avec la mémoire contenue dans l'ordinateur, une durée théorique de 45 min de film était disponible dans ces conditions.

3.3 Matlab

Matlab est un logiciel de la société Mathworks créée en 1984. Il contient un nouveau langage de programmation mis au point principalement pour le calcul scientifique et l'interfaçage entre des ordinateurs et des instruments de mesure. Les programmes s'écrivent en ligne de commande, dans des fichiers faisant office de script.

Le logiciel est composé d'une base fixe ainsi de multiples greffons (toolboxes). Ceux-ci peuvent être vendus par Mathworks, mais aussi développés par des utilisateurs et fournis en téléchargement sur le site web de la société.

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé ce logiciel pour tous les aspects numériques et de traitement d'images.

Deuxième partie

Globules Rouges en Cisaillement

Nous étudions ici le mouvement de globules rouges dans un écoulement de cisaillement. Ce travail prend la suite d'une étude faite au laboratoire [1] où le mouvement de Swinging-TankTreading a été étudié et relié à la rhéologie de la cellule.

Les globules rouges sont les principales cellules contenues dans le sang dont elles représentent 50% du volume. Elles sont responsables de la bonne oxygénation des tissus et doivent pour cela traverser chaque vaisseau du corps. Dans les grandes conduites, leur rhéologie influe sur leur comportement dans l'écoulement et modifie ainsi leur vitesse [9]. Dans les capillaires, leur bonne déformabilité est cruciale pour traverser des segments dont le diamètre descend jusqu'à $2\mu m$. De plus, il est montré que la rhéologie des globules rouges est altérée par certaines pathologies comme la malaria [75] qui perturbe ainsi la circulation sanguine. D'un point de vue physique, un globule rouge dans un écoulement de cisaillement est aussi un bon modèle pour l'étude de l'interaction fluide-structure, dont les domaines des vésicules et des suspensions peuvent profiter. Enfin, si nous disposons d'un modèle conforme aux observations expérimentales, nous pouvons alors l'utiliser comme moyen de mesure des propriétés rhéologiques des cellules de manière non invasive.

Dans un premier temps, nous présentons les modèles à forme fixée existant pour décrire le mouvement des globules rouges. Nous fournissons, de plus, une étude détaillée de la transition observée. Après une présentation des méthodes expérimentales utilisées, nous étudions le mouvement de globules rouges sous un écoulement de cisaillement oscillant. Nous interprétons les résultats obtenus avec le modèle AFV-SS modifié pour tenir compte de la dépendance temporelle de l'écoulement et nous mettons en évidence l'existence d'un comportement chaotique des cellules, dans certaines conditions. Nous effectuons alors un retour sur les écoulements constants afin d'analyser et d'élucider certains régimes de mouvement non prévus par le modèle AFV-SS. Ces régimes, ainsi que les transitions dynamiques qui y sont associées, sont étudiés et mis en lien avec la rhéologie cellulaire. Pour finir, nous proposons une refonte du modèle AFV-SS afin d'inclure dans les calculs le choix de la forme d'énergie élastique nulle et ainsi corriger une erreur faite sur la détermination du module élastique de cisaillement.

Cette partie nécessite de décrire de nombreux mouvements complexes et différents, pour lesquels nous utilisons les anglicismes suivants :

- Tumbler : faire du Tumbling
- Tanktreader : faire du TankTreading
- Swinguer : faire du Swinging
- Roller : faire du Rolling
- Spinner : faire du Spining

Chapitre 4

Modèles Elliptiques

Dans ce chapitre, nous revenons en détail sur les deux modèles elliptiques à forme fixée applicables aux globules rouges : le modèle de Keller-Skalak (KS) puis le modèle développé par Abkarian - Faivre - Viallat et Secomb-Skotheim (AFV-SS). Ce rappel nous permet ensuite de présenter les résultats d'une étude approfondie de la transition entre les deux régimes de mouvement du modèle AFV-SS, réalisée pendant cette thèse.

4.1 Modèle KS

Modèle purement visqueux En 1982, Keller et Skalak [56] développent un modèle de mouvement de capsules ellipsoïdales oblates dans un écoulement de cisaillement, ce qui leur permet, à partir de principes physiques simples, d'extraire des solutions analytiques pour des objets représentant les globules rouges. Ces capsules sont des gouttes de fluide newtonien, immergées de façon non-miscible dans un autre fluide newtonien. Le but est d'arriver à décrire le mouvement de TankTreading observé pour des globules rouges [32]. Les auteurs mentionnent que l'ajout d'une membrane fluide ne change pas les comportements observés, mais fait simplement apparaître une viscosité effective définie comme la moyenne de la viscosité interne η_i et la viscosité de la membrane η_m pondérée par le rapport des volumes respectifs. Par souci de concision, nous nous placerons directement dans ce second cas.

Choix de la forme Bien que la forme de la capsule sélectionnée diffère du profil biconcave, elle est très simple à décrire et montre la même symétrie de révolution. Les expériences [32] montrent de plus que des globules soumis à un fort taux de cisaillement changent d'aspect et s'approchent de l'ellipsoïde. Les équations sont développées pour une forme fixe : si le rapport d'aspect peut prendre initiale-

ment une valeur quelconque, il ne peut pas évoluer sous l'action du mouvement. Cette approximation est justifiée si l'on cherche à étudier les états stationnaires du mouvement des cellules. L'orbite de la cellule est contraint : si les rotations sont autorisées, l'axe de révolution de la cellule demeure dans le plan de cisaillement. Cette hypothèse est justifiée dans le cas de capsules visqueuses pour lesquelles les mouvements où l'axe de symétrie de la cellule est dans le plan de cisaillement sont les plus stables [50, 21, 22]. Nous verrons au chapitre 7 que cette contrainte doit être abandonnée pour des objets élastiques.

Écoulement à l'intérieur des capsules La membrane tourne autour de la capsule selon un mouvement de TankTreading : les petits éléments de surface se déplacent autour du centre de la capsule en conservant la forme de la cellule. On suppose que l'écoulement du fluide à l'intérieur de la capsule est imposé par le mouvement de la surface. Le mouvement des particules de fluide est homothétique au mouvement des éléments de membrane : elles décrivent des trajectoires elliptiques. Si ce champ de vitesse n'est pas physiquement correct - il ne conserve pas les surfaces [97, 86], sa simplicité permet toutefois de rendre les équations solubles et donc d'obtenir un résultat analytique. De plus, sans permettre de mesurer des quantités physiques avec précision, il rend compte du rôle de chaque élément rhéologique dans le mouvement global de la capsule.

Équilibre des couples, conservation de l'énergie Le modèle KS est basé sur deux principes physiques. Tout d'abord, l'équilibre des forces : dans un cisaillement pur, la somme des forces exercées sur la cellule est nulle. Sa position est stable, et l'éventuel mouvement de rotation n'est créé que par le couple de cisaillement. L'énergie du système doit ensuite être conservée : le travail apporté par le cisaillement doit être égal à la dissipation visqueuse générée par l'écoulement à l'intérieur de la cellule. Comme tout se passe à des nombres de Reynolds faibles, il n'y a aucune énergie cinétique à considérer.

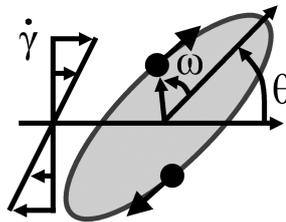


FIGURE 4.1 – Définition des angles.

Equation de KS Les définitions de la forme de la capsule, du déplacement de la membrane et deux angles d'importance du système sont données en figure

4.1. L'angle θ est l'angle d'inclinaison du globule, défini comme l'angle entre l'axe principal de la capsule et la direction de l'écoulement. L'angle de la membrane, ω , est défini comme l'angle existant entre la position d'un élément de membrane à l'instant t et sa position au repos. Les calculs donnent les équations d'évolution suivantes :

$$\begin{aligned}\frac{\dot{\theta}}{\dot{\gamma}} &= -\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \frac{a_1^2 - a_2^2}{a_1^2 + a_2^2} \cos(2\theta) - \frac{2a_1a_2}{a_1^2 + a_2^2} \frac{\dot{\omega}}{\dot{\gamma}} \equiv A + B \cos(2\theta) \\ \frac{\dot{\omega}}{\dot{\gamma}} &= \frac{-f_3}{f_2 - \frac{f_1}{\eta_0} \left(\eta_i + \eta_m \frac{\Omega}{V} \right)} \cos(2\theta)\end{aligned}\quad (4.1)$$

où f_1 , f_2 et f_3 sont des constantes géométriques décrites dans [56] et données en annexe, a_1 et a_2 sont les longueurs du grand et du petit axe de la section de la cellule, V est le volume du globule, Ω est le volume de la membrane et η_o est la viscosité du milieu externe. La viscosité effective, mentionnée plus haut, est définie par $\eta_{eff} = \eta_i + \eta_m \frac{\Omega}{V}$. Dans l'équation de θ , le premier terme représente la vitesse de rotation d'une sphère, le second les corrections à apporter pour une ellipse et le troisième représente le couple exercé par la membrane sur le corps de l'objet lorsque celle-ci est en rotation. L'équation de ω est composée d'un terme "d'accrochage" : plus la cellule est à l'horizontale, plus la surface qu'elle expose parallèlement à l'écoulement est importante, donc plus l'écoulement "accroche" la membrane et lui transmet de l'énergie.

Prédiction du mouvement Ce modèle prédit l'existence de deux régimes de mouvement en fonction du rapport de viscosité $\frac{\eta_{eff}}{\eta_0}$. Dans le cas où la viscosité de la cellule est grande devant celle du fluide extérieur ($\frac{\eta_{eff}}{\eta_0} \gg 1$), le flux externe n'arrive pas à entraîner la membrane ni le fluide à l'intérieur de la capsule. L'écoulement y est nul, la cellule adopte un régime de "Tumbling" décrit par l'équation suivante :

$$\tan \theta = \frac{A + B}{\sqrt{A^2 + B^2}} \tan \left(\sqrt{A^2 + B^2} t \right) \quad (4.2)$$

Cette équation est très similaire à ce qu'avait déterminé Jeffery [50] pour des particules solides. Elle décrit une rotation complète de la capsule à vitesse constante, dépendant du taux de cisaillement et des conditions de viscosité. Un examen plus précis montre toutefois qu'à dimension égale, la particule de KS tourne moins vite qu'une particule solide. En effet, si une grande partie de l'énergie transmise à la capsule sert à faire tourner le corps de l'objet, une petite partie est néanmoins transmise à la membrane et au fluide interne et y engendre un écoulement, ce qui a pour effet d'imprimer une faible vitesse de Tanktreading à la membrane (voir figure 4.2A). Ce mouvement est défini ici sous le nom de "Tumbling Fluide".

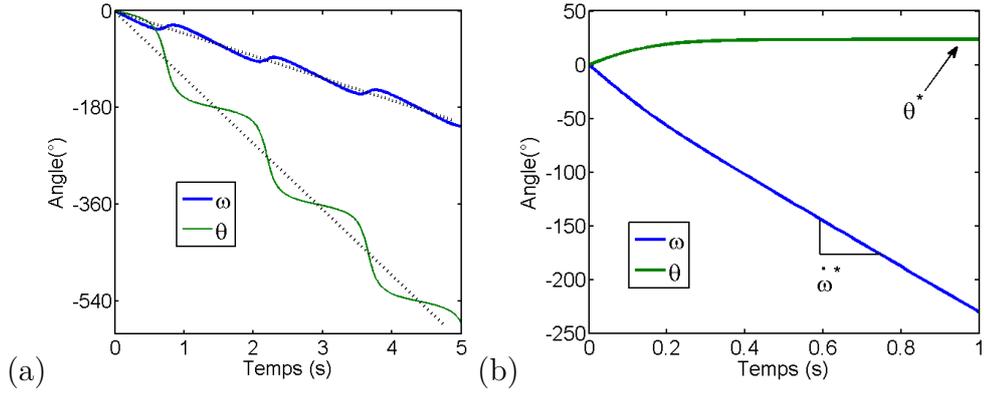


FIGURE 4.2 – Variation des angles ω et θ en fonction du temps.
 A : obtenu pour un rapport de viscosité de 6.24. B : obtenu pour un rapport de viscosité de 0.624.

Dans le cas où la viscosité de la cellule est petite devant celle du fluide extérieur ($\frac{\eta_{eff}}{\eta_0} \ll 1$), la contrainte exercée par le fluide environnant sera assez importante pour entraîner la membrane et le fluide à l'intérieur. Le mouvement est caractérisé par une inclinaison θ constante de la capsule et une vitesse de rotation constante de la membrane. Ces valeurs sont déterminées comme suit :

$$\begin{aligned} \theta^* &:= \lim_{t \rightarrow \infty} \theta(t) = \frac{1}{2} \arccos\left(-\frac{A}{B}\right) \\ \dot{\omega}^* &= \frac{f_3}{f_2 - \frac{\eta_{eff}}{\eta_0} f_1} \frac{A\dot{\gamma}}{B} \end{aligned} \quad (4.3)$$

Cette équation correspond au mouvement d'une goutte liquide, ou à celui d'une vésicule, lorsque la contrainte de cisaillement est suffisamment importante. Nous voyons sur la figure 4.2B les évolutions des deux angles de la cellule, avec les deux comportements limites visibles dès que le temps est supérieur à 0,5.

Limite des capsules visqueuses Ce modèle, pourtant composé d'ingrédients très simples, décrit de façon pertinente le comportement dans un écoulement de cisaillement de vésicules observées expérimentalement, et dans une certaine mesure celui des globules rouges [97]. La transition entre les deux mouvements ne dépend que du rapport de viscosité : changer le taux de cisaillement n'a aucune incidence sur le type de mouvement, mais simplement sur sa vitesse. Or, la littérature a mis en évidence la dépendance du régime de mouvement en fonction du taux de cisaillement [37, 32, 97] : les globules rouges sont en régime de Tumbling à faible $\dot{\gamma}$ et en régime de TankTreading à fort $\dot{\gamma}$. Une étude de Fischer [33] a, par ailleurs, établi que le cytosquelette élastique des cellules présentait une mémoire de forme : au repos, ce sont toujours les mêmes éléments de membrane qui forment les creux et l'anneau de la forme biconcave. Le modèle KS a donc été étendu pour tenir compte des effets élastiques.

4.2 Modèle AFV-SS

Cette nouvelle version du modèle a été développée simultanément par Skotheim et Secomb [88] et Abkarian et al. [1]. Ces derniers ont en plus fourni les données expérimentales appuyant ces nouveaux calculs.

Membrane visco-élastique Reprenant les bases du modèle KS (forme, écoulement, équilibre des couples, conservation de l'énergie), les chercheurs ont ajouté un terme énergétique attribué à la membrane. Elle est maintenant définie comme un fluide visco-élastique de Kelvin-Voigt. La contrainte dans la membrane s'écrit $\boldsymbol{\sigma}_m = 2\eta_m \mathbf{D} + 2\mu_m \mathbf{E}$, où \mathbf{D} est le tenseur des vitesses de déformation de la membrane et \mathbf{E} est le tenseur des déformations. L'équilibre énergétique du système est modifié par rapport au modèle KS : le travail fourni par le fluide est égal à la somme de la dissipation et de l'énergie élastique stockée dans le cytosquelette. On doit donc incorporer le calcul de la puissance visco-élastique instantanée P_{el} à l'équation de conservation de l'énergie.

Nouvelles équations Les nouvelles équations d'évolution du système sont les suivantes :

$$\begin{aligned} \frac{\dot{\theta}}{\dot{\gamma}} &= -\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \frac{a_1^2 - a_2^2}{a_1^2 + a_2^2} \cos(2\theta) - \frac{2a_1 a_2}{a_1^2 + a_2^2} \frac{\dot{\omega}}{\dot{\gamma}} = A + B \cos(2\theta) \\ \frac{\dot{\omega}}{\dot{\gamma}} &= \frac{-f_3}{f_2 - \frac{f_1}{\eta_0} \left(\eta_i + \eta_m \frac{\Omega}{V} \right)} \left[\cos(2\theta) - \frac{f_1}{2f_3} \frac{\Omega}{V} \frac{\mu_m}{\eta_0 \dot{\gamma}} \sin(2\omega) \right] \end{aligned} \quad (4.4)$$

L'équation de $\dot{\omega}$ dépend explicitement de $\dot{\gamma}$, celle de $\dot{\theta}$ en dépend implicitement par l'intermédiaire de $\dot{\omega}$. Le paramètre de la transition est le nombre capillaire $\frac{\eta_0 \dot{\gamma}}{\mu_m}$.

Transition élastique En augmentant le taux de cisaillement, un changement de régime de mouvement est observé. La figure 4.3 montre les évolutions des angles ω et θ avant et après la transition, qui se situe autour de $\dot{\gamma} \approx 3$ dans cet exemple. Le régime final atteint est le TankTreading.

Le mouvement à faible taux de cisaillement est un mouvement de Tumbling (T) : θ varie rapidement pendant que ω reste constant en moyenne. On remarque que le mouvement est différent du "Tumbling fluide" de KS : il n'y a pas de dérive de la membrane. Ce mouvement s'apparente plus au Tumbling soldie décrit par Jeffery [50]. Les oscillations de ω sont dues à l'élasticité de la membrane. L'écoulement transfère de l'énergie à la membrane qui se déplace, mais pas assez pour passer la barrière de potentiel de la mémoire de forme. Elle oscille autour d'une valeur moyenne et a un mouvement nul en moyenne. Ce mouvement est défini ici comme le "Tumbling élastique", qui oppose au "Tumbling fluide" défini plus haut.

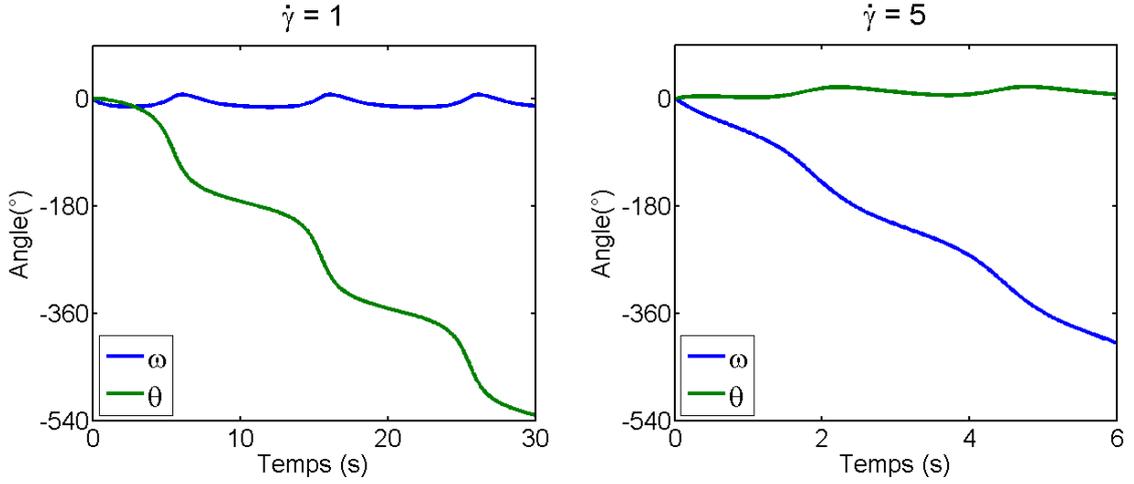


FIGURE 4.3 – Variation de ω et θ en fonction du temps pour le modèle AFV-SS. $\eta_i = 10mPa.s$, $\eta_m = 0.7Pa.s$, $\mu_m = 1.608$. Gauche : $\dot{\gamma} = 1$. Droite : $\dot{\gamma} = 5$.

En augmentant le taux de cisaillement, on passe la transition et on observe un mouvement de "Swinging-TankTreading" (S-TT) : ω entre en rotation, θ oscille autour d'une valeur moyenne constante. On retrouve dans les valeurs moyennes de ce mouvement les caractéristiques du TankTreading, les oscillations additionnelles étant dues à l'élasticité du cytosquelette. Si la contrainte de cisaillement a maintenant assez de puissance pour passer la barrière de potentiel, le paysage énergétique reste dépendant de l'angle ω et varie donc durant la rotation de la membrane. L'oscillation de l'inclinaison ainsi que la rotation de la membrane ont été observées par Abkarian et al. [1], confirmant que malgré ses ingrédients très simples, ce modèle retrouvait les comportements des globules rouges sous écoulement de cisaillement.

4.3 Étude approfondie de la transition

La transition prédite par le modèle est intermittente et apparaît sur une plage de $\dot{\gamma}$ [1, 88, 74]. Afin de mieux comprendre ce phénomène et son implication dans la transition du mouvement, nous réalisons ici une nouvelle étude des équation AFV-SS pour étudier leur comportement au changement de régime.

4.3.1 Intermittence

La figure 4.4 montre l'évolution des angles d'un globule numérique dans la zone d'intermittence. Le mouvement est une alternance de période de Tumbling (rotation de θ , oscillation de ω) et de TankTreading (rotation de ω , oscillation de θ). Les proportions des deux régimes sont de 1 Tumbling pour 1 TankTreading. Il

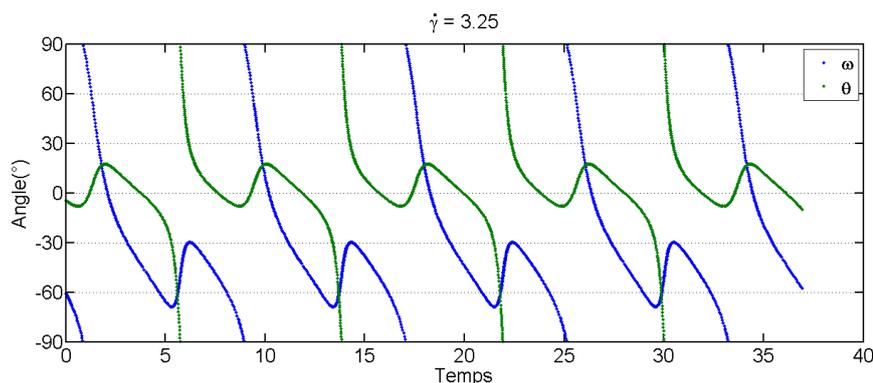


FIGURE 4.4 – Variation de ω et θ en fonction du temps dans une zone intermittente les valeurs sont ramenées entre -90° et $+90^\circ$. $\eta_0 = 34mPa.s$, $\eta_i = 10mPa.s$, $\eta_m = 0.7Pa.s$, $\mu_m = 1.608$. $\dot{\gamma} = 3.25$.

est toutefois possible d'observer n'importe quelle proportion (1 pour 2, 5 pour 3, etc).

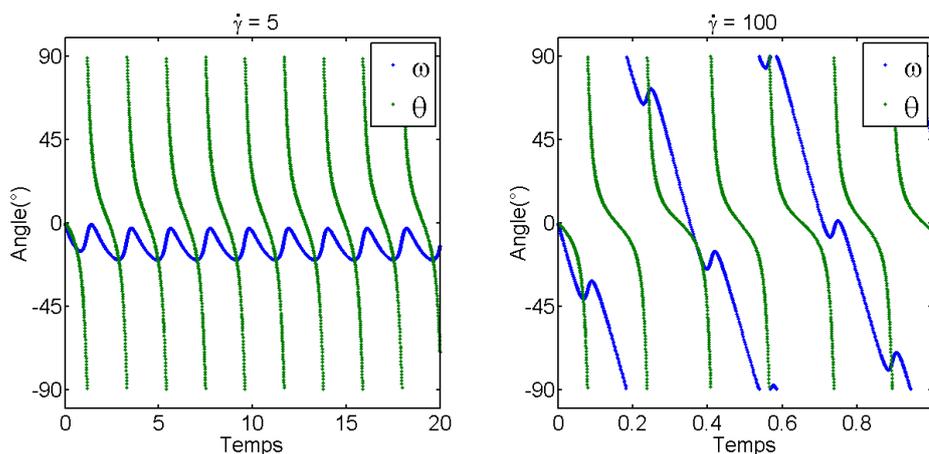


FIGURE 4.5 – Variation de ω et θ en fonction du temps dans une zone intermittente les valeurs sont ramenées entre -90° et $+90^\circ$. $\eta_0 = 10mPa.s$, $\eta_i = 10mPa.s$, $\eta_m = 0.7Pa.s$, $\mu_m = 1.608$. A : $\dot{\gamma} = 5$. B : $\dot{\gamma} = 100$.

On observe la transition du modèle AFV-SS avec un rapport de viscosité $\frac{\eta_{eff}}{\eta_0} \gg 1$. Elle se fait alors entre un mouvement de Tumbling élastique (Fig. 4.5A) et un mouvement de Tumbling Fluide (Fig. 4.5B). Même dans le cas du Tumbling Fluide, on remarque les petites oscillations de ω , marques de l'élasticité de la membrane.

Le régime intermittent correspondant est montré sur la figure 4.6. Après quatre rotations de Tumbling élastique (rotation de θ pendant que ω reste compris entre 0° et -90°), la membrane passe le seuil (à $t \approx 3.5$) et effectue une rotation de Tank-Treading. La période de rotation de θ associée est alors plus longue. Le phénomène se répète ensuite pour $t \approx 7$.

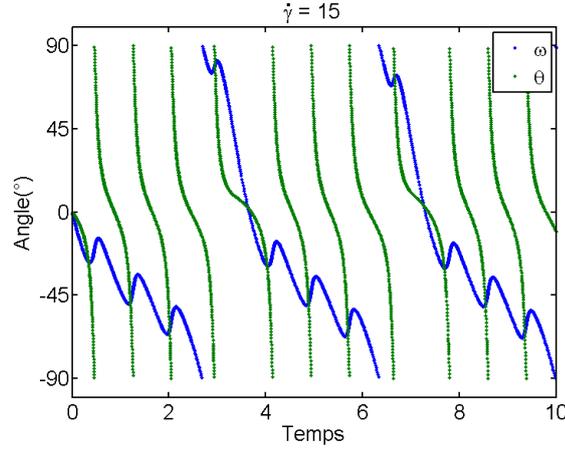


FIGURE 4.6 – Variation de ω et θ en fonction du temps dans une zone intermittente les valeurs sont ramenées entre -90° et $+90^\circ$. $\eta_0 = 10mPa.s$, $\eta_i = 10mPa.s$, $\eta_m = 0.7Pa.s$, $\mu_m = 1.608$. $\dot{\gamma} = 3.25$.

4.3.2 Transition

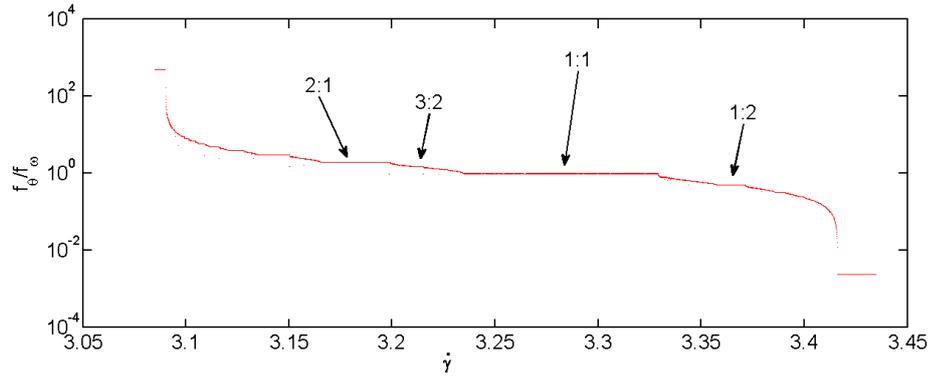


FIGURE 4.7 – Rapport des fréquences de rotation $\frac{f_\theta}{f_\omega}$ en fonction de $\dot{\gamma}$.

Si l'on trace le rapport des fréquences de rotation $\frac{f_\theta}{f_\omega}$ en fonction de $\dot{\gamma}$ pour la transition $\frac{\eta_{eff}}{\eta_0} \ll 1$, on obtient un escalier de Cantor (Fig. 4.7), ou escalier du diable. Cette forme se retrouve pour les systèmes où deux oscillateurs évoluent de manière synchronisée. Nous n'avons pas ici d'oscillateurs à proprement parler. Toutefois, la symétrie de rotation du corps de la capsule ou de la membrane par π crée des évolutions périodiques et donne aux deux variables θ et ω un comportement d'oscillateur. L'image "d'escalier du diable" fait référence au fait que la courbe contient une infinité de marches, représentant l'infinité de synchronisations possibles. La transition se fait donc du Tumbling (rapport 1 :0, $\frac{f_\theta}{f_\omega} = \infty$) au TankTreading (rapport 0 :1, $\frac{f_\theta}{f_\omega} = 0$), par introduction progressive de rotations

de ω pendant ses oscillations, et par introduction d'oscillations de θ pendant ses rotations.

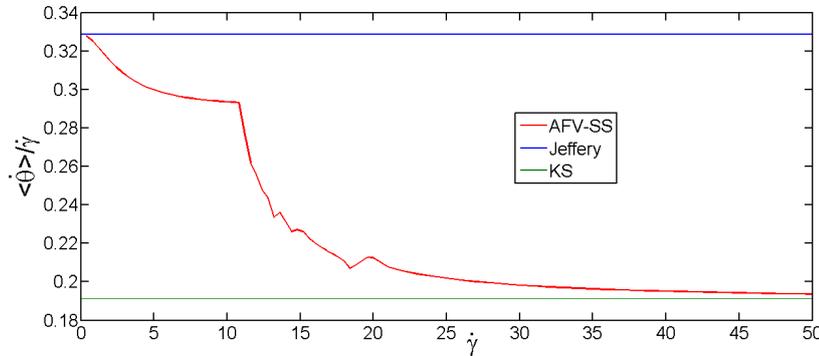


FIGURE 4.8 – Vitesse de rotation moyenne normalisée $\langle \dot{\theta} \rangle / \dot{\gamma}$ en fonction de $\dot{\gamma}$.

Pour les régimes de Tumbling, la vitesse de rotation moyenne de la cellule est proportionnelle à $\dot{\gamma}$. On a donc tracé $\langle \dot{\theta} \rangle / \dot{\gamma}$ en fonction de $\dot{\gamma}$ pour la transition $\frac{\eta_{eff}}{\eta_0} \gg 1$ (Fig. 4.8). La courbe du modèle AFV-SS rejoint la ligne du modèle de Jeffery à faible taux de cisaillement et tend vers la ligne KS pour les forts taux de cisaillement. Le changement de régime de mouvement dû à l'élasticité est donc, de façon générique, une transition entre le comportement du modèle de Jeffery et le comportement du modèle KS. Il s'agit du passage d'un comportement solide à un comportement fluide.

4.3.3 Diagramme de phase

Le diagramme de phase du système dépend des deux paramètres qui dirigent le mouvement : le rapport de viscosité $\frac{\eta_{eff}}{\eta_0}$ et le taux de cisaillement $\dot{\gamma}$.

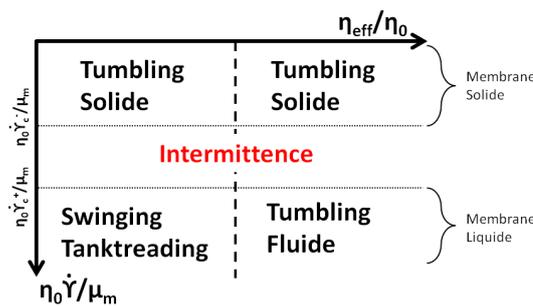


FIGURE 4.9 – Diagramme de phase du système dans le modèle AFV-SS

La figure 4.9 illustre les deux compétitions qui ont lieu au sein du système entre les différentes contraintes. Tout d'abord, le nombre capillaire $\frac{\eta_0 \dot{\gamma}}{\mu_m}$ compare

la contrainte visqueuse de l'écoulement extérieur à la contrainte élastique de la membrane. S'il est petit, la contrainte élastique est plus forte : la membrane n'est pas déformée et apparaît comme solide. S'il est grand, la contrainte visqueuse arrive à vaincre la contrainte élastique : la membrane est déformée par l'écoulement et apparaît comme fluide. Dans ce deuxième cas, lorsque la membrane bouge, les viscosités cellulaires sont sollicitées. La deuxième compétition apparaît alors en réécrivant le rapport $\frac{\eta_{eff}}{\eta_0}$ sous la forme $\frac{\eta_{eff}\dot{\gamma}}{\eta_0\dot{\gamma}}$. La comparaison de viscosités devient une comparaison des contraintes visqueuses exercées par chacun des fluides. Si $\frac{\eta_{eff}\dot{\gamma}}{\eta_0\dot{\gamma}}$ est petit, la contrainte exercée par le fluide interne est plus faible que celle de l'écoulement : le fluide interne ayant le moins de résistance, il va se mettre en mouvement et créer le TankTreading. En revanche, si $\frac{\eta_{eff}\dot{\gamma}}{\eta_0\dot{\gamma}}$ est grand, la contrainte visqueuse interne est plus grande que celle de l'écoulement. L'écoulement à l'intérieur de la cellule sera alors très faible, et c'est l'écoulement externe qui sera perturbé et déformé par le mouvement de Tumbling de la cellule.

4.4 Ouverture et présentation du travail.

Ce travail nécessitait d'être poursuivi face à plusieurs questions restées en suspens. Tout d'abord, l'écoulement sanguin, généré par le coeur, est pulsatile. Il était donc important d'analyser l'effet que pourrait avoir une variation temporelle de l'écoulement sur le mouvement des globules rouges. Ensuite, plusieurs observations expérimentales nous ont montré que, contrairement aux hypothèses généralement admises, l'axe de révolution d'une hématie ne se trouve pas nécessairement dans le plan de cisaillement. Valable pour les ellipsoïdes rigides ou purement visqueux ([50, 21, 22]), cette hypothèse doit être reconsidérée dans le cas d'objet visco-élastique. Enfin, la détermination du module de cisaillement de la cellule avec le modèle AFV-SS a aussi révélé un de ses défauts : les valeurs trouvées pour le module de cisaillement étaient environ deux ordres de grandeur au dessus de celles mesurées par pince optique [61, 62]. Sous l'inspiration d'autres travaux [79, 69], nous avons reconsidéré le choix de la forme non-contrainte du cytosquelette et reconstruit le modèle autour de cette nouvelle hypothèse.

Chapitre 5

Matériel & Méthodes pour RBC

5.1 Prélèvement et mise en solution des globules rouges

Comme milieu de suspension des cellules, nous utilisons du "Phosphate Buffered Saline" (PBS) auquel nous ajoutons du Dextran, un polymère polysaccharide. Le PBS est fabriqué à partir d'une solution stock concentrée (PBS pH7.4 10X, Gibco). Après la dilution, le pH et l'osmolarité sont vérifiés et ajustés si besoin à 7.4 et 290mOsm respectivement.

Nous pouvons ajuster la densité de la solution en variant la concentration de Dextran. Expérimentalement, le meilleur ajustement avec les globules rouges est atteint pour une concentration de 9% en masse.

En variant la masse molaire du polymère utilisé, nous pouvons changer les gammes de viscosité accessibles. Deux types de Dextran sont utilisés, avec des masses molaires de $100000g.mol^{-1}$ et $2000000g.mol^{-1}$. Des mesures avec un rhéomètre cône-plan ont été réalisées (Laboratoire IRPHE, Marseille) et nous avons vérifié le comportement newtonien des solutions PBS-Dextran à ces concentrations. Les viscosités suivantes ont été mesurées :

- Solution de Dextran 100000 à 9% w/w : $\eta = 7.15Pa.s$
- Solution de Dextran 2000000 à 4% w/w : $\eta = 7.8Pa.s$
- Solution de Dextran 2000000 à 7.5% w/w : $\eta = 22.2Pa.s$
- Solution de Dextran 2000000 à 9% w/w : $\eta = 28.5Pa.s$

La dissolution est faite à température ambiante sous agitation pendant une nuit complète.

Pour chaque expérience, $1\mu L$ de globules rouges sont prélevés par piqûre sur le bout du doigt d'un donneur sain et sont dilués dans 10 mL de solution de Dextran. Toutes les observations sont réalisées dans les deux heures.

La rigidification des globules rouges nécessite l'incubation des cellules dans 1

mL de solution de glutaraldéhyde à $20g.L^{-1}$ à température ambiante pendant une heure. Elles sont ensuite lavées et re-suspendues dans la solution de PBS-Dextran.

Pour fixer des billes sur la membrane des globules rouges, il faut d'abord laver $1\mu L$ de sang dans 1mL de PBS. On re-suspend ensuite le culot dans 1 mL de PBS dans lequel ont été ajoutées des billes de latex carboxylées (Carboxy Latex $0.8\mu m$, Invitrogen). Après une heure d'incubation à $4^{\circ}C$, on lave à nouveau les cellules que l'on suspend à nouveau finalement dans la solution de PBS + Dextran adéquate.

5.2 Écoulement

Toutes les expériences sont réalisées dans une chambre d'écoulement en verre rectangulaire, de dimension $1 \times 10 \times 50mm$. Les entrées et sorties de liquide se font par les plus petites faces. Les quatre parois en verre sont de qualité optique pour les observations au microscope. Dans une telle chambre parallélépipédique, l'écoulement a la forme suivante :

$$V_x(x, y) = \frac{16a^2}{\eta\pi^3} (-\partial_x P) \sum_{n=1,3,5\dots}^{+\infty} (-1)^{\frac{n-1}{2}} \left(1 - \frac{\cosh\left(\frac{n\pi z}{2a}\right)}{\cosh\left(\frac{n\pi b}{2a}\right)} \right) \frac{\cos\left(\frac{n\pi y}{2a}\right)}{n^3} \quad (5.1)$$

avec $2a$ et $2b$ la largeur et la hauteur de la chambre, $\partial_x P$ le gradient de pression dans la chambre et η la viscosité du fluide à l'intérieur.

Rapidement, en s'éloignant des parois $1 \times 50mm$, le profil de vitesse devient équivalent à un profil parabolique de Poiseuille. Ce profil parabolique devient linéaire lorsque l'on se rapproche de la paroi $10 \times 50mm$. On a alors un écoulement de cisaillement.

Les expériences avec un écoulement constant sont réalisées avec un pousse-seringue (NE-1000, Prosense BV et 11 plus Series, Harvard Apparatus). Les débits vont de 100 à $1200\mu L.min^{-1}$, entraînant des taux de cisaillement à la paroi entre 1 et $12s^{-1}$.

Les écoulements sinusoidaux sont créés par une différence de pression variable. Pour cela, le réservoir de solution de Dextran est fixé à une roue reliée à un moteur (Fig. 5.1). La rotation entraîne une variation sinusoidale de la hauteur du réservoir et donc de la différence de pression entre l'entrée et la sortie. Un réglage minutieux de la hauteur globale des réservoirs d'entrée et de sortie permet d'obtenir un écoulement global nul. Le diamètre de la roue de $9.45cm$ crée une amplitude de cisaillement $\dot{\gamma}_a = 6.72s^{-1}$. La fréquence de l'écoulement dépend de la fréquence de rotation de la roue et varie entre 0.16 et $1.15rad.s^{-1}$.



FIGURE 5.1 – Photo de la roue servant à créer l'écoulement sinusoïdal.

5.3 Microscopie

Les cellules sont observées avec un microscope Leica DMIRB à une distance de $50\mu m$ environ de la paroi $10 \times 50mm$ de la chambre avec un objectif 40x en DIC ou avec un objectif 50x en Fond Clair. Les observations appelées "Z-view" sont faites dans la direction perpendiculaire à la face $10 \times 50mm$, c'est-à-dire en observant le long du gradient de cisaillement. Les observations appelées "Y-view" sont quant à elles faites dans une direction perpendiculaire à la face $1 \times 50mm$, c'est-à-dire perpendiculairement au plan de cisaillement.

L'enregistrement des images est réalisé avec une caméra vidéo COHUE à 25 images par seconde reliée à un ordinateur par une carte d'acquisition PCI (WinTV express, Hauppauge).

5.4 Résolution d'équation différentielle

Le système à résoudre contient jusqu'à trois équations non linéaires couplées sans dimension. Nous avons utilisé le logiciel Matlab pour obtenir les solutions numériques de notre modèle.

Pour cela, nous avons utilisé une fonction incluse dans le logiciel du nom de "ode113". Il s'agit d'un algorithme de Adams-Bashford-Moulton recommandé dans les situations avec des intervalles de tolérance très réduits et lorsque l'évaluation du système d'équation en un point est très gourmand en temps de calcul. Dans le cas des écoulements oscillants, nous cherchions à observer le chaos dans le mouvement des cellules. Comme le chaos est par définition très sensible aux perturbations, nous devons nous fixer un intervalle de tolérance le plus petit possible, et avons donc choisi l'algorithme de résolution en conséquence.

La résolution des équations peut être réalisée en deux étapes pour les cas où l'on ne veut pas voir la relaxation des conditions initiales du système.

Chapitre 6

RBC sous écoulement oscillant

Dans le système vasculaire, le débit sanguin est dépendant du temps. Il est pulsatile dans les artères et présente des variations temporelles irrégulières dans la microcirculation, allant de la cessation intermittente dans les capillaires à un comportement chaotique dans les artérioles [38, 101, 7]. Ces fluctuations, qui sont en partie liées aux fluctuations du calibre vasculaire, sont encore mal comprises. À l'échelle du globule rouge, le débit en fonction du temps joue le rôle d'un troisième oscillateur couplé avec l'angle d'orientation de la cellule et l'angle de rotation de la membrane qui, en ajoutant un degré de liberté au système, permet à la cellule d'avoir un mouvement complexe, voire chaotique. Un tel mouvement pourrait influencer l'écoulement du sang à grande échelle et contribuer à ces fluctuations temporelles observées.

Nous fournissons ici une description théorique du mouvement des globules rouges dans un écoulement de cisaillement sinusoïdal proche des domaines de valeurs physiologiques de contrainte de cisaillement et de fréquence de variation du débit que nous illustrons avec plusieurs expériences. Nous prévoyons que les globules rouges peuvent présenter un comportement chaotique et nous observons expérimentalement le mouvement instable des hématies. Nous proposons alors un schéma théorique complet du mouvement des cellules en fonction de l'amplitude et de la fréquence de la vitesse de cisaillement. Nous montrons que l'existence d'une mémoire de forme des cellules, associée à un minimum d'énergie élastique de la membrane pour une position précise de ses éléments, est cruciale pour le chaos. Enfin, nos expériences permettant un enregistrement facile du mouvement du globule rouge, elles peuvent fournir un outil approprié pour caractériser la viscosité et l'élasticité des cellules.

6.1 Modèle

6.1.1 Nouvelles équations

Le taux de cisaillement s'écrit $\dot{\gamma} = \dot{\gamma}_a \sin(\nu t)$. Considérons les deux équations du modèle AFV-SS. Celles-ci étant toujours valables pour un cisaillement dépendant du temps, nous introduisons le paramètre $\tilde{\nu} = \nu t$ qui nous permet d'obtenir un système de trois équations d'ordre 1 sans dépendance explicite avec le temps, de la forme $d\vec{X}/dt = F(\vec{X})$ où \vec{X} est le vecteur $(\theta, \omega, \tilde{\nu})$. Les équations s'écrivent de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \partial_t \theta &= \frac{\dot{\gamma}_a}{2} \sin(\tilde{\nu}) \left(1 - \frac{a_1^2 - a_2^2}{a_1^2 + a_2^2} \cos(2\theta) \right) - \frac{2a_1 a_2}{a_1^2 + a_2^2} \partial_t \omega \\ \partial_t \omega &= \frac{f_3 \dot{\gamma}_a}{f_2 - \frac{\eta_i}{\eta_o} \left(1 + \frac{\eta_m}{\eta_i} \frac{\Omega}{V} \right) f_1} \left[\frac{f_1}{2f_3} \frac{\mu_m}{\eta_o \dot{\gamma}_a} \frac{\Omega}{V} \sin(2\omega) - \sin(\tilde{\nu}) \cos(2\theta) \right] \\ \partial_t \tilde{\nu} &= \nu \end{aligned} \tag{6.1}$$

où f_1 , f_2 et f_3 sont les constantes géométriques du modèle AFV-SS, a_1 et a_2 sont les longueurs du grand et du petit axe de la section de la cellule, V est le volume du globule, Ω est le volume de la membrane et η_o est la viscosité du milieu externe. L'espace des phases du système est décrit par l'ensemble des points $(\theta, \omega, \sin(\tilde{\nu}))$. Les équations sont résolues numériquement avec le jeu de paramètres précédemment utilisés ([1]) : $a_1 = a_3 = 4\mu\text{m}$, $a_2 = 1.5\mu\text{m}$, $\frac{\Omega}{V} = 7.48 \cdot 10^{-2}$, $\eta_o = 34 \cdot 10^{-3} Pa.s$, $\eta_i = 10^{-2} Pa.s$, $\eta_m = 0.7 Pa.s$, $\mu_m = 1.6 Pa$.

6.1.2 Comportement du modèle

Pour de faibles amplitudes de taux de cisaillement ($\dot{\gamma}_a < \dot{\gamma}_c$), où $\dot{\gamma}_c$ est le taux de cisaillement critique pour la transition T-STT, le globule rouge tumble périodiquement. Sa trajectoire dans l'espace des phases approche un cycle limite stable, montré en Fig. 6.1a quand on le projette sur le plan (θ, ω) . L'approche vers le cycle limite prend environ 1 seconde. L'angle θ varie ensuite régulièrement dans le temps : dans le sens horaire pendant le mouvement aller ($\dot{\gamma} > 0$) et dans le sens anti-horaire durant le mouvement retour ($\dot{\gamma} < 0$). Pendant ces variations de θ , l'angle ω oscille, indiquant que la membrane bouge légèrement d'avant en arrière autour de sa position d'équilibre.

Pour des valeurs plus grandes de l'amplitude de l'écoulement ($\dot{\gamma}_a > \dot{\gamma}_c$), la cellule swingue et tanktreade dès que le taux de cisaillement instantané dépasse la valeur $\dot{\gamma}_c$ et tumble quand il décroît en deçà de la valeur critique, juste avant que l'écoulement ne change de sens. Une illustration de ce mouvement est donnée dans la figure 6.2.

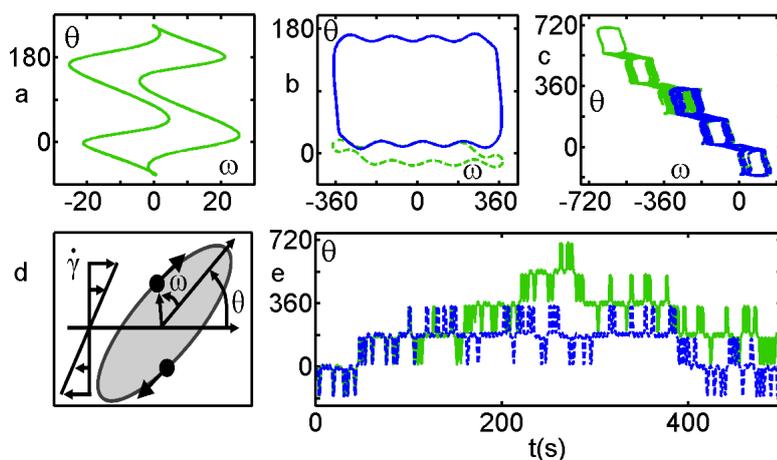


FIGURE 6.1 – a-c : Simulations numériques de $\theta(^{\circ})$ vs. $\omega(^{\circ})$. a : Cycle limite $\dot{\gamma}_a = 2s^{-1}$, $\nu = 0.2rd.s^{-1}$. b : 2 cycles limites $\dot{\gamma}_a = 9s^{-1}$, $\nu = 0.35 rd.s^{-1}$, conditions initiales : $\omega_0 = 0$, $\theta_0 = 0$ (-) or $\theta_0 = \pi/2$ (-). c : Trajectoires non-fermées pour $\dot{\gamma}_a = 9s^{-1}$, $\nu = 0.8rd.s^{-1}$, conditions initiales : $\omega_0 = 0$, $\theta_0 = 10^{-9}$ (-) or $\theta_0 = -10^{-9}$ (-). d : Schéma d'un globule rouge dans l'écoulement. e : Trajectoires chaotiques numériques $\theta(^{\circ})$ vs. temps, conditions initiales de c.

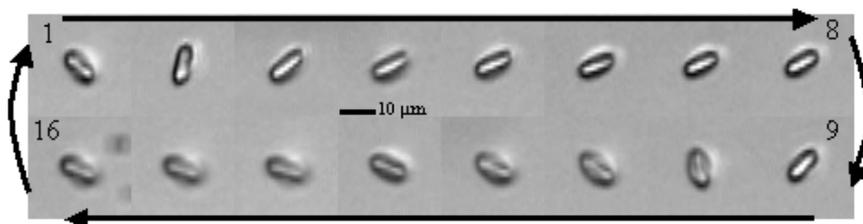


FIGURE 6.2 – Séquence d'un aller-retour d'un globule rouge pendant une période du mouvement. Mouvement aller de 1 à 8, temps des images (en s) : 0, 0.32, 0.64, 1.08, 2.12, 3.28, 3.72, 4.16; mouvement retour de 9 à 16, temps des images : 4.56, 4.88, 5.16, 5.76, 7.08, 7.98, 8.24 and 8.8

Le modèle prédit un régime stable et périodique, décrit soit par un unique cycle, soit par deux régimes limites qui ne se croisent pas (voir Fig. 6.1b) et dont les trajectoires sont déterminées par les angles initiaux. Dans le mode S-TT, θ est peu sensible aux conditions initiales. Cependant, le stockage d'énergie élastique diffère légèrement à chaque période. La transition TT-T n'a pas lieu au même moment de la période et les valeurs que prennent θ et ω lorsque l'écoulement change de sens diffèrent d'une période à une autre. L'effet sur le retournement de la cellule est crucial : dans un cas, à la fin du mouvement aller, la cellule exécute une rotation anti-horaire et passe à la verticale (voir Fig. 6.2), perpendiculairement à la direction de l'écoulement ; dans l'autre cas, la cellule effectue une rotation horaire et passe par l'horizontale, en alignement avec la direction de l'écoulement.

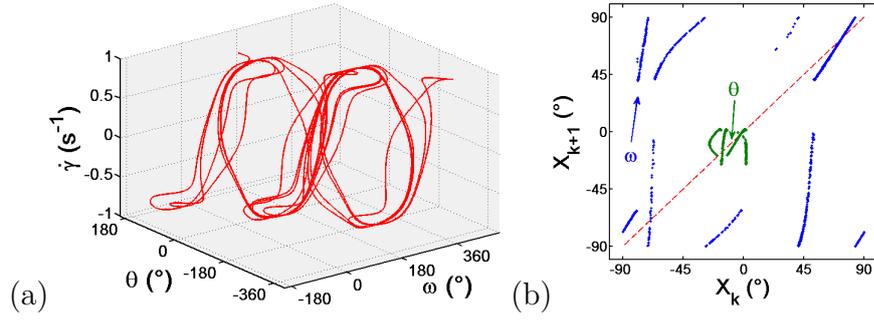


FIGURE 6.3 – a : Diagramme de phase $(\theta, \omega, \dot{\gamma})$ associé à une trajectoire non périodique. $\dot{\gamma}_a = 9$, $\nu = 0.8$. b : Diagramme de premier retour déterminé pour $(\dot{\gamma} = 0, \ddot{\gamma} > 0)$. $\dot{\gamma}_a = 9$, $\nu = 0.8$. Bleu : Valeur de ω . Vert : Valeur de θ

6.1.3 Chaos numérique

Pour des valeurs spécifiques de $\dot{\gamma}_a$ et ν , on voit apparaître un mouvement à la trajectoire non périodique (Fig. 6.1e), très sensible aux conditions initiales et caractérisé par un cycle limite non fermé (Fig. 6.1c). L'attracteur complet est tracé sur la figure 6.3a. Il s'agit d'une forme non fermée et non périodique montrant que le système prend des valeurs différentes de θ et ω pour une même valeur de $\dot{\gamma}$. Nous pouvons observer cette non périodicité en traçant la section de Poincaré de la trajectoire. Nous mesurons pour cela les valeurs de θ et ω au même moment du cycle, par exemple lorsque $\dot{\gamma} = 0$ est croissant. Nous reportons alors ces valeurs sur un graphique, en traçant pour chaque période k du taux de cisaillement la valeur des variables en fin de période (X_{k+1} en fonction de la valeur qu'elles avaient en début de période (X_k)). Dans le cas de mouvement périodique, les trajectoires se répètent et la section de Poincaré de la trajectoire doit être un point positionné sur la première bissectrice : les valeurs au début et en fin de période sont identiques. La figure 6.3b montre un graphique complexe, très différent d'un point. Dans cette situation, les trois oscillateurs θ , ω et $\dot{\gamma}$ n'arrivent plus à se synchroniser : le mouvement est chaotique.

6.1.4 Exposant de Lyapunov

Pour caractériser plus précisément ce chaos, nous avons calculé les exposants de Lyapunov du système. Ils renseignent sur l'évolution d'une petite perturbation autour d'une trajectoire du système.

Soit $\vec{X}(t)$ une solution du système d'équations F et soit $\delta\vec{X}(0)$ une perturbation infinitésimale autour de $\vec{X}(t)$. La perturbation au temps t , $\delta\vec{X}(t)$, obéit dans un premier temps à l'équation d'évolution obtenue par linéarisation de F dont

l'intégration donne une évolution exponentielle de la perturbation :

$$\frac{d\delta\vec{X}}{dt} = \frac{\partial F}{\partial \vec{X}}|_{x(\vec{t})} \delta\vec{X} = \mathbf{J}(t)\delta\vec{X} \quad (6.2)$$

$$\Rightarrow \delta\vec{X}(t) = \delta\vec{X}(0) e^{\int_0^t \mathbf{J}(u)du} \quad (6.3)$$

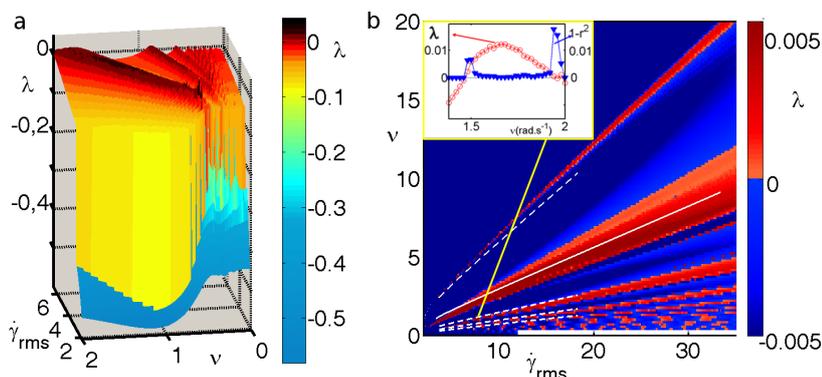


FIGURE 6.4 – Diagramme de la dynamique de mouvement d'un globule rouge. a : Carte 3D de λ en fonction de ν et $\dot{\gamma}_{rms}$. b : Projection 2D des valeurs de λ (couleur) dans le plan $(\nu, \dot{\gamma}_{rms})$. Les régions où λ est positif sont chaotiques. Ligne pleine : conditions d'écoulement pour lesquelles le globule effectue un cycle de swinging complet lors du mouvement aller (ou retour). Lignes pointillées de haut en bas : le globule effectue respectivement 1/2, 2, 3 et 4 cycles de swinging pendant le mouvement aller. insert : variation de λ et $1 - r^2$ en fonction de ν dans la zone chaotique.

Pour chaque solution $\vec{X}(t)$, nous calculons la matrice jacobienne du système $\mathbf{J}(t) = \partial F / \partial \vec{X}$, nous déterminons numériquement $\mathbf{M}(t) = \int_0^t \mathbf{J}(u)du$ et nous calculons ses trois valeurs propres. Ces deux étapes sont répétées à plusieurs instants précis de la période de l'écoulement : nous avons choisi les instants où le flux change de sens ($\dot{\gamma} = 0$). Les variations de ces trois valeurs propres sont des droites dont les pentes sont les exposants de Lyapunov du système. Un de ces exposants est directement relié à l'évolution de $\tilde{\nu}$ et vaut toujours 0. Les deux exposants restants sont reliés à une combinaison de θ et de ω selon les vecteurs propres du système. Le plus petit est toujours négatif. Le dernier en revanche, que l'on appellera λ , est parfois positif, ce qui est une signature d'un mouvement chaotique. Les variations de λ et de l'erreur sur sa mesure, déterminée grâce au coefficient de régression de la méthode des moindres carrés en calculant $1 - r^2$, sont montrées en fonction de la fréquence du taux de cisaillement dans l'insert de la figure 6.4b. L'erreur est faible pour toutes les valeurs positives de λ , confirmant l'existence de chaos dans le mouvement des globules rouges dans certaines conditions.

Nous pouvons alors complètement mettre en évidence le comportement dynamique des globules rouges en traçant λ en fonction de ν et de la valeur efficace du taux de cisaillement $\dot{\gamma}_{rms} = \frac{\dot{\gamma}_a}{\sqrt{2}}$ (voir Fig. 6.4). Les valeurs de ν englobent les fréquences physiologiques en partant des fluctuations dues à la contraction des

vaisseaux, de l'ordre de la dizaine de hertz, jusqu'à la fréquence du coeur, d'environ 1 hertz. Les valeurs de $\dot{\gamma}$ couvrent quant à elle la gamme de contraintes $\eta_o \dot{\gamma}$ observées dans la vasculature, des capillaires aux artères ([38, 101, 7]).

Pour $\dot{\gamma}_{rms} < 3.1$, λ chute vers -0.5, traduisant la stabilité du système. $\dot{\gamma}_c = 3.1$ est, pour notre globule numérique, le taux de cisaillement critique de la transition T-TT en écoulement constant. Ainsi, le régime de Tumbling stabilise le mouvement. En effet, pendant ce mouvement, la membrane de la cellule est quasiment solidifiée, l'angle ω reste très petit et le terme $\sin(2\omega)$ peut être négligé de la seconde équation du groupe 6.1. En insérant l'équation de $\partial\omega$ dans l'équation d'évolution de $\partial\theta$, on élimine le couplage entre les 2 angles. Le système perd alors un degré de liberté, et le chaos n'est plus possible.

Au dessus de $\dot{\gamma}_c$, le mouvement est moins stable : des zones chaotiques apparaissent. Elles forment des bandes élargies autour d'une série de lignes. La droite blanche pleine (fig. 6.4) représente le couple $(\dot{\gamma}_{cst}, \nu_S)$ du globule numérique sous écoulement constant : en le plaçant dans un cisaillement $\dot{\gamma}_{cst}$, on mesure une fréquence de Swinging égale à ν_S . Cela revient à dire que, pour une valeur du cisaillement constant $\dot{\gamma}_{cst}$ égale à la valeur efficace $\dot{\gamma}_{rms}$, une période de Swinging est égale à une demi-période de l'écoulement (c'est-à-dire un aller ou un retour). Les autres lignes pointillées représentent les conditions pour lesquelles le globule numérique swingue respectivement 0.5, 2, 3 et 4 fois durant un aller ou un retour. La forte corrélation entre ces lignes et les bandes chaotiques amène à penser que le chaos est une résonance de l'écoulement avec les fréquences caractéristiques internes de la cellule.

Comme attendu, le chaos est intimement lié au Swinging, c'est-à-dire au stockage d'énergie élastique dans la membrane. Le terme avec le module élastique μ_m de l'équation 6.1 induit en effet le couplage entre les trois équations différentielles. On peut penser que les capsules visqueuses ou les capsules visco-élastiques sphériques ne présenteraient que des dynamiques stables dans un écoulement de cisaillement dépendant du temps.

6.2 Observations expérimentales

Des observations directes de θ sont fournies par microscopie latérale dans le plan vertical parallèle au plan de cisaillement ([2, 1]). Les cellules sont diluées exclusivement dans une solution de PBS et Dextran ($M = 2.10^6 g.mol^{-1}$, $c = 9\%w/w$, $\eta_o = 34mPa.s$). Le module de cisaillement élastique et les viscosités internes et membranaires dépendant beaucoup de l'âge du globule, les valeurs mesurées peuvent donc changer sensiblement d'une cellule à une autre. La contrainte de cisaillement maximale $\eta_o \dot{\gamma}_a$ est choisie pour être supérieure à la contrainte critique $\eta_o \dot{\gamma}_c$ pour la majorité des hématies, afin qu'une majorité swingue et tanktreade. Les

plus rigides montrent toutefois un régime de Tumbling à chaque instant. Chaque enregistrement de cycle a été fait au moins 10 minutes après la mise en mouvement pour s'assurer que les régimes finaux aient été atteints.

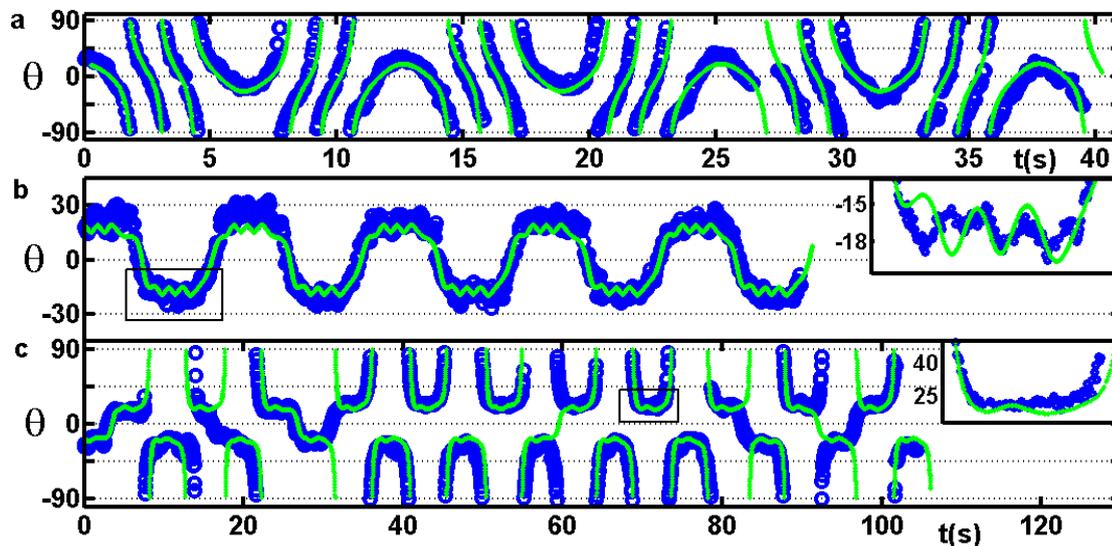


FIGURE 6.5 – Variations expérimentales et ajustement du modèle de $\theta(t)$ pour 3 globules rouges. a : $\nu = 0.08rd.s^{-1}$, T stable, fit $\eta_{eff} = 1.25.10^{-2}Pa.s$, $\mu = 15.2Pa$; b : $\nu = 0.05rd.s^{-1}$, S-TT stable et T, fit $\eta_{eff} = 4.95.10^{-2}Pa.s$, $\mu = 0.591Pa$; c : $\nu = 0.11rd.s^{-1}$. Mouvement chaotique instable, fit $\eta_{eff} = 3.97.10^{-2}Pa.s$, $\mu = 0.49Pa$. Les inserts montrent des agrandissements des zones encadrées.

6.2.1 Régime périodique

Nous avons observé les trois types de mouvement prédits par le modèle. Le Tumbling stable est caractérisé par une variation continue de θ avec le temps, comme illustré dans la figure 6.5a, sur plus de trois périodes de l'écoulement. Pour $\dot{\gamma}_a > \dot{\gamma}_c$, le régime stable est montré pour deux cellules dans les figures 6.5b et 6.2. La figure 6.2 montre une séquence de photo typique où nous pouvons voir que la forme de la cellule ne change pas significativement au cours du mouvement. Les deux types de retournement sont illustrés ; sur les images de la figure 6.2, nous pouvons voir la cellule se retourner en passant par la verticale, la courbe de la figure 6.5b montre un retournement au cours duquel la cellule passe par l'horizontale : l'angle θ change de signe en passant par 0. Dans les deux cas, la cellule tanktreads pour les forts taux de cisaillement et tumble lorsque $\dot{\gamma}$ devient inférieur à $\dot{\gamma}_c$, quand l'écoulement change de direction. La modulation du taux de cisaillement permet aux globules rouges de montrer alternativement, au cours du mouvement, un état dynamique "solide" ou "fluide", similaire à des capsules visco-élastiques.

6.2.2 Chaos expérimental

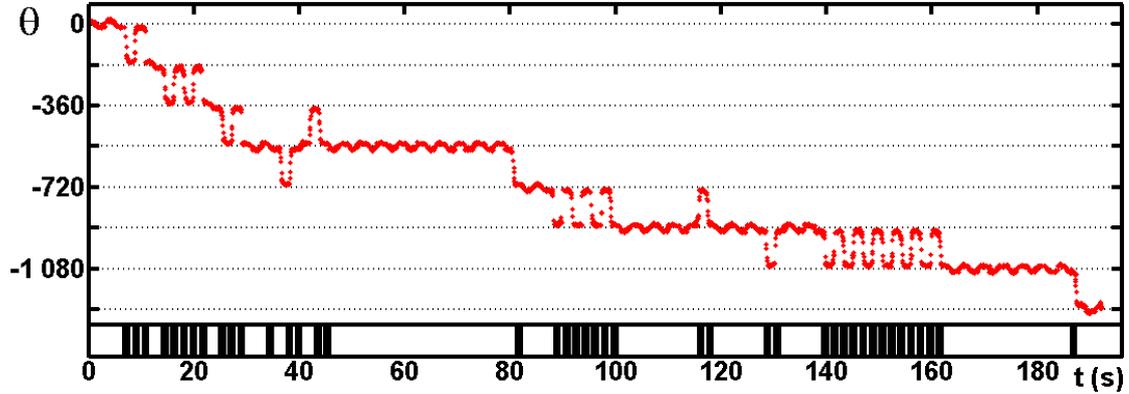


FIGURE 6.6 – Expériences longues : variation absolue de θ en fonction du temps.
Bas : Les lignes noires montrent les retournements verticaux.

Des régimes non-périodiques ont également été observés, comme le montre la figure 6.5c et la figure 6.6, sur plus de 50 périodes. A la manière de ce que l'on a observé théoriquement, la façon dont la cellule change de direction varie en fonction du temps : elle alterne de façon non périodique des séquences de retournements horizontaux ($\theta = 0$) et verticaux ($\theta = \pi/2$). Nous observons alors un nombre de rotations horaires et anti-horaires différents (Fig. 6.6). L'effet final est simple : en 50 périodes, la cellule effectue une rotation anti-horaire globale de 3.5 tours alors que l'écoulement est nul en moyenne.

6.2.3 Ajustement du modèle

Pour finir, le modèle et les expériences coïncident de manière semi-quantitative : les courbes expérimentales $\theta(t)$ sont bien recouvertes par les courbes numériques en ajustant deux paramètres, μ_m et $\eta_{eff} = \eta_i + \eta_m \frac{\Omega}{V}$. Nous pouvons observer des ajustements mono-courbes sur la figure 6.5, où chaque série de données est réalisée sur une cellule et dans des conditions différentes. La figure 6.7 montre l'ajustement de 6 courbes obtenues en faisant varier la fréquence de l'écoulement sur une même cellule. Dans les cas des mouvements non-périodiques, un ajustement *stricto sensu* des données n'est pas possible car les courbes numériques sont, par définition du chaos, très sensibles aux conditions initiales. On voit cependant que les courbes théoriques décrivent les principales caractéristiques du mouvement que sont la période, l'amplitude et la durée du plateau de TankTreading, ainsi que l'instabilité du mode de retournement (voir les inserts dans la figure 6.5).

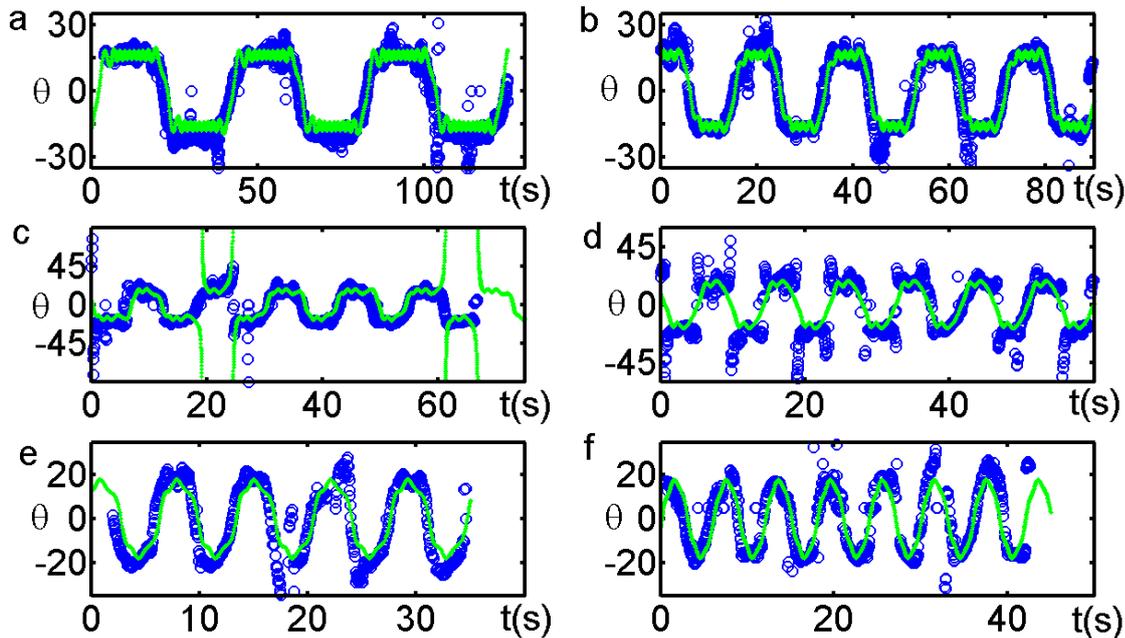


FIGURE 6.7 – Fit d'une cellule à 6 fréquences différentes.

6.3 Conclusion

En étudiant le mouvement de globules rouges dans un écoulement de cisaillement oscillant, nous montrons que des plages de comportement chaotique existent sur de larges domaines de fréquence et d'amplitude qui recouvrent notamment les écoulements physiologiques dans les artères et la microcirculation. *In vivo*, le sang forme une solution concentrée de cellules qui interagissent les unes avec les autres. Ces interactions couplent encore plus d'oscillateurs et il serait intéressant d'étudier l'implication du comportement chaotique des globules sur des phénomènes à plus grande échelle, comme la formation des rouleaux par exemple. Nous tenons finalement à préciser que ce travail pourrait être appliqué à des capsules polymères ou des gouttes recouvertes de protéines, à condition qu'elles aient des propriétés élastiques permettant l'interaction des oscillateurs.

Ce travail a également soulevé d'autres questions qui ont engendré la poursuite de l'étude du mouvement de ces cellules. En effet, nous avons remarqué que certaines cellules ont tendance à se tourner lors des retournements verticaux. Nous pouvons, dans ce cas, observer la concavité du globule rouge à l'image, ce qui indique que son axe de révolution est perpendiculaire au plan de cisaillement. Ce comportement est assez fréquent, toujours dans le cas de retournement verticaux. La visualisation de ce nouveau régime de mouvement nous indique que la connaissance du mouvement des cellules en cisaillement constant est incomplète. Nous

avons donc poursuivi ce travail dont les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 7

RBC sous écoulements constants

Pour un écoulement de cisaillement simple, seules quelques études expérimentales ont discuté les deux régimes de Tumbling et TankTreading en relation avec la mécanique de la cellule [13, 37, 1, 32]. Pour approfondir la relation mouvement-rhéologie cellulaire, nous avons associé pour la première fois deux visualisations par vidéo-microscopie, fournissant des observations multidirectionnelles des cellules ; ceci afin d'élucider la dynamique complète de globules rouges dans un écoulement de cisaillement dont nous avons analysé l'origine.

Nous montrons que, contrairement aux hypothèses communément admises, les hématies tumbent avec une orientation déterminée par le taux de cisaillement. Nous discutons ensuite le mouvement de Rolling, similaire au mouvement d'une roue en rotation. Nous mettons en évidence un cycle d'hystérésis et deux dynamiques transitoires dirigées par le taux de cisaillement : un régime intermittent lors de la transition "TankTreading vers Flipping" et un régime rotatif dit de "Spinning" lors de la transition "Rolling vers TankTreading". Pour finir, nous révélons la grande stabilité de la forme biconcave du globule rouge sous des contraintes de cisaillement modérées et nous l'interprétons grâce aux notions de forme non contrainte et de flambage élastique de membrane.

7.1 Introduction

A l'échelle cellulaire, l'écoulement sanguin est d'abord affecté par la réponse des globules rouges aux contraintes hydrodynamiques, que ce soit par l'orientation de la cellule par rapport à la direction de l'écoulement, ou au travers de la déformation cellulaire. Par exemple, à de faibles taux de cisaillement, des orientations semblables peuvent favoriser la formation de piles (rouleaux) de cellules [8], telles des piles de pièces de monnaies, et augmenter la viscosité du sang. Pour de fort taux de cisaillement en revanche, l'individualisation, l'alignement et l'étirement

des cellules en écoulement [32] réduisent la viscosité du sang [23].

L'orientation et la déformation des hématies dans l'écoulement sont gouvernées par leur propriétés rhéologiques. Elles résultent des contributions visco-élastiques de tous les composants de la structure cellulaire. En outre, ces propriétés physiques cellulaires dépendent aussi du micro-environnement et des propriétés métaboliques [9]. Des perturbations locales ou des perturbations systémiques de l'homéostasie (associés à du diabète ou de l'hypertension) peuvent induire des changements rhéologiques chez les globules rouges et ainsi altérer la circulation sanguine. Il est donc crucial de comprendre le lien entre les propriétés rhéologiques, l'orientation et la déformation des cellules. Cette question est loin d'être triviale puisque que, même pour des écoulements de cisaillement simples, les globules rouges adoptent une large variété d'états dynamiques comme le TankTreading, le Swinging, le Tumbling ou encore des régimes chaotiques.

Jusqu'alors, il n'y a eu que peu de travaux expérimentaux sur la relation entre les propriétés mécaniques des hématies et leur dynamique dans un écoulement de cisaillement [97, 98, 1, 26], par rapport aux nombreuses études numériques et théoriques rapportées dans la littérature [5, 92, 88, 60, 57, 105, 31, 24]. Étonnamment, toutes les recherches traitant de l'orientation des cellules se concentrent sur le cas particulier où leurs axes de symétrie se trouvent dans le plan de cisaillement. Quelques observations cependant suggèrent que d'autres orientations cellulaires pourraient être plus stables [13, 106]. De plus, les résultats numériques en termes de déformation cellulaire révèlent de très grandes différences avec les observations expérimentales. En effet, celles-ci ne rapportent des observations de déformations stationnaires que pour des cellules alignées avec l'écoulement à de forts taux de cisaillement, alors que les simulations numériques prédisent des états de "Breathing", marqués par de grandes déformations, à de faibles taux de cisaillements [5, 92, 88, 60, 57, 105, 31, 24].

Pour ce travail, nous avons associé deux techniques de vidéo-microscopie fournissant des images multi-directionnelles des globules rouges afin d'analyser leur dynamique complète dans un écoulement de cisaillement. Cela nous a permis d'élucider l'origine mécanique de ces comportements, tant concernant leur forme que leur déformation.

7.2 Régime solide

7.2.1 Du Tumbling au Rolling

Les globules rouges sont dilués dans une solution à 9% en masse de PBS-Dextran pour deux poids moléculaires : $10^5 g.mol^{-1}$ pour une viscosité de $7.15 mPa.s$ et $2.10^6 g.mol^{-1}$ pour une viscosité de $28.6 mPa.s$. Quelques expériences com-

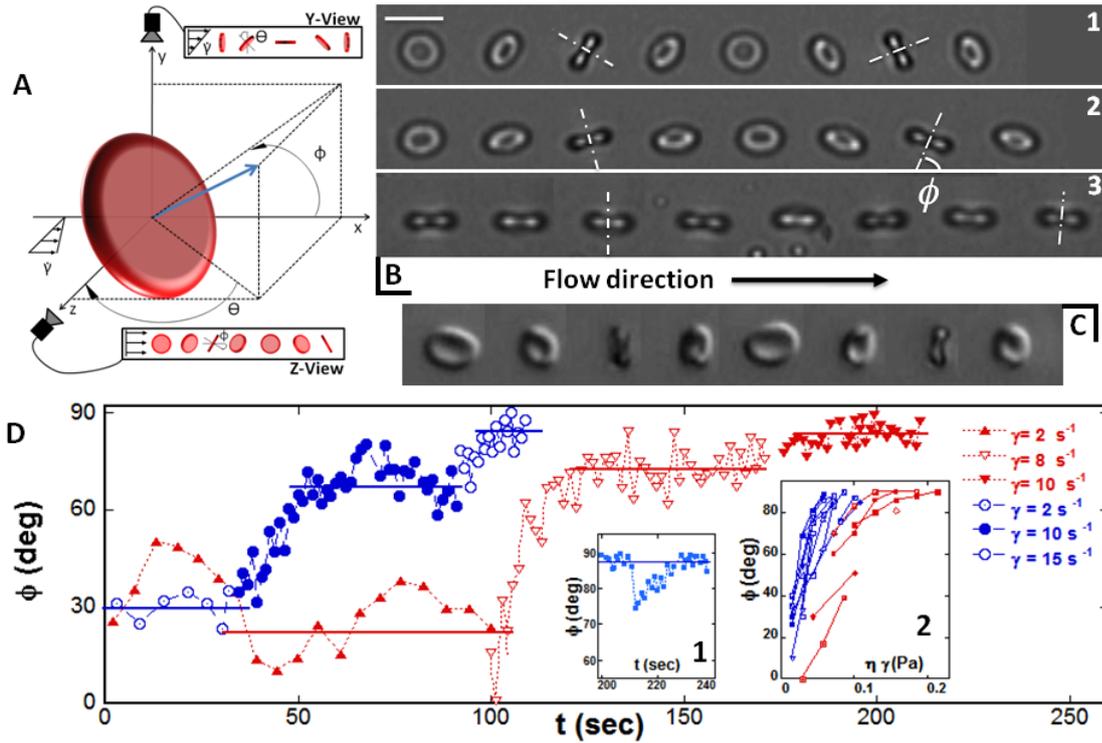


FIGURE 7.1 – Changement d’orbite d’un globule rouge en Flipping. A : Définition des angles. B : Séquence de photos de globules en Flipping dans une solution de Dextran ($10^5 g.mol^{-1}$, $c = 9\%w/w$). 1) $\dot{\gamma} = 2 s^{-1}$, durée 10.6s. 2) $\dot{\gamma} = 6 s^{-1}$, durée 3.72s. 3) $\dot{\gamma} = 12 s^{-1}$, durée 3.84s. C : Flipping d’un globule rigidifié. $\dot{\gamma} = 15 s^{-1}$, durée 1.2s, Image en DIC. D : Augmentation et stabilisation de ϕ en fonction du temps pour 2 globules rouges dans une solution de Dextran ($10^5 g.mol^{-1}$, $c = 9\%w/w$). Insert 1 : Perturbation et récupération de l’axe de révolution d’un globule rouge. Insert 2 : Variation de la valeur limite de ϕ en fonction de la contrainte de cisaillement $\eta_0 \dot{\gamma}$. Bleu : solution de Dextran $10^5 g.mol^{-1}$, Rouge : solution de Dextran $2.10^6 g.mol^{-1}$

plémentaires ont été réalisées en diluant les cellules dans des solutions à 7.5% ($\eta = 22.2 mPa.S$) et 4% ($\eta = 7.8 mPa.s$) de PBS- $2.10^6 g.mol^{-1}$ Dextran. Chaque hématie est d’abord introduite dans la chambre d’écoulement, soumise à un cisaillement simple puis observée. Le taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ a été augmenté par paliers jusqu’à $15 s^{-1}$ pour les cellules dans le Dextran $10^5 g.mol^{-1}$ et jusqu’à $2.7 s^{-1}$ pour celles suspendues dans le Dextran $2.10^6 g.mol^{-1}$ à 9%. Dans ce dernier cas, pour $\dot{\gamma} > 2.7 s^{-1}$, les cellules tanktreadent.

Au départ, les globules présentent des orientations variées par rapport à la direction de l’écoulement. Nous nous intéressons plus particulièrement aux cellules dont l’axe de révolution appartient au plan de cisaillement. Le mouvement de la cellule, bien que périodique, apparaît tout d’abord complexe et similaire à ce qui est observé pour des ellipsoïdes solides par Jeffery [50]. Nous caractérisons l’orientation de la cellule par deux angles : l’orbite ϕ entre la projection orthogonale de l’axe de révolution de la cellule sur la direction du gradient de cisaillement et l’inclinaison

θ entre la projection orthogonale de l'axe de révolution sur le plan de cisaillement et la direction du gradient de l'écoulement (voir figure 7.1A).

7.2.2 Orbite de la cellule

La meilleure façon de détecter l'orbite est l'observation selon la direction du gradient de cisaillement ("Z-view"). La cellule alterne entre des orbites $\pm\phi$ atteintes quand elle est sur sa tranche, c'est-à-dire quand l'axe de révolution est perpendiculaire au gradient de l'écoulement.

Pour de faibles taux de cisaillement en commençant à de faibles valeurs de ϕ (proche du mouvement de Tumbling), le premier résultat marquant est que ϕ ne reste pas constant. Il fluctue entre 0° et 40° mais ne dépasse jamais cette dernière valeur.

Quand on augmente le taux de cisaillement, l'orbite cellulaire évolue et atteint une valeur limite constante, qui dépend du taux de cisaillement, comme illustré dans les figures 7.1B et 7.1D. La cellule tourne autour de son axe de révolution, qui possède un mouvement de précession quand celle-ci s'écarte du mouvement de pur Tumbling ($\phi = 0^\circ$). Quand l'orbite est perturbée, l'angle ϕ retrouve spontanément sa valeur d'équilibre, comme le montre l'insert 1 de la figure 7.1. En augmentant encore $\dot{\gamma}$, le globule s'aligne dans le plan de cisaillement et roule ($\phi = 90^\circ$). Cela correspond à une rotation de 90° de l'axe de symétrie de la cellule autour de l'axe de la vortécité (figure 7.1B). La variation de ϕ avec la contrainte de cisaillement est montrée dans l'insert 2 de la figure 7.1D. Un léger décalage existe entre l'angle ϕ observé pour les deux types de solutions, ce que nous n'expliquons pas à l'heure actuelle.

Pour élucider l'origine mécanique du phénomène, nous avons rigidifié les globules rouges en les incubant dans une solution de glutaraldéhyde, qui relie les protéines de la membrane. Le Tumbling apparaît dans ce cas comme le régime choisi par les cellules, même pour $\dot{\gamma} = 15s^{-1}$ (voir figure 7.1C). ϕ peut changer légèrement mais demeure inférieur à 40° et retourne de temps en temps à 0° . Si l'orbite est perturbée, jusqu'à des valeurs de 50° , ϕ revient à 0° .

Ces observations montrent clairement qu'une élasticité de membrane promeut le Rolling, alors que la rigidité induit du Tumbling.

7.2.3 Inclinaison de la cellule

L'évolution temporelle de l'angle d'inclinaison θ de cellules observées dans le plan de cisaillement ("y-view") est montrée dans la figure 2B. Bien que l'orbite change quand $\dot{\gamma}$ augmente, θ est facilement mesuré tant que la cellule ne roule pas complètement dans le plan de cisaillement. L'évolution temporelle de θ pour un

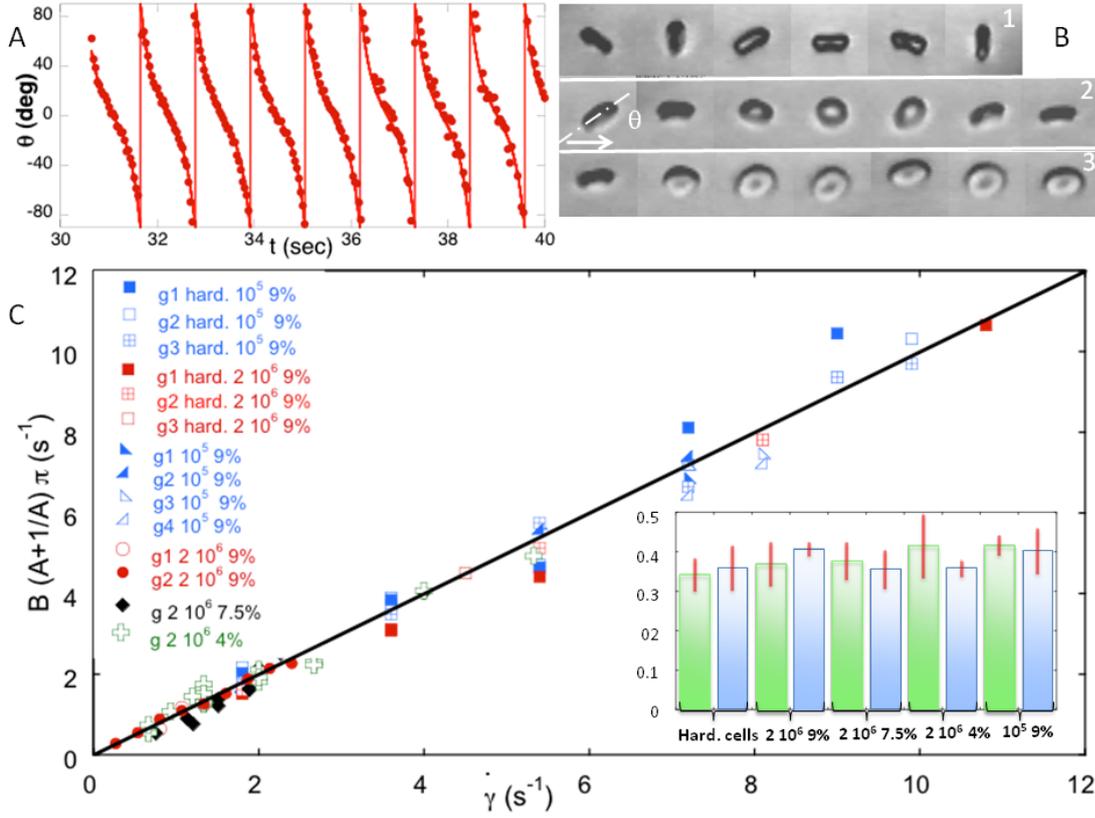


FIGURE 7.2 – Flipping des globules rouges observés dans le plan de cisaillement (y-view). A : Variation expérimentale de θ en fonction du temps (points) et ajustement avec l'équation 7.1 (ligne pleine). B : Variation de l'orbite d'un globule rouge en augmentant le taux de cisaillement (Dextran $2.10^6 g.mol^{-1}$, $c = 9\%w/w$). 1) $\dot{\gamma} = 2s^{-1}$, durée 10.6s. 2) $\dot{\gamma} = 6s^{-1}$, durée 13.72s. 3) $\dot{\gamma} = 12s^{-1}$, durée 3.84s. C : Variation du produit $\pi B(A + 1/A)$ avec $\dot{\gamma}$. Ligne pleine : Bissectrice correspondant au modèle de Jeffery et KS. Insert : histogramme des valeurs de A obtenues dans diverses conditions. Cellules rigidifiées et cellules dans du Dextran $10^5 g.mol^{-1}$, $c = 9\%w/w$: (vert) $\dot{\gamma} < 5s^{-1}$, (bleu) $\dot{\gamma} > 5s^{-1}$. Cellules dans du Dextran $2.10^6 g.mol^{-1}$: (vert) $\dot{\gamma} < 1.34s^{-1}$, (bleu) $\dot{\gamma} > 1.34s^{-1}$.

ellipsoïde rigide, tirée du travail de Jeffery [50], est donnée par l'équation

$$\tan\theta = r \cdot \tan\frac{\dot{\gamma}t}{r + r^{-1}} \quad (7.1)$$

où r est le rapport d'aspect de la cellule (rapport de l'épaisseur sur le diamètre de la cellule).

Les variations temporelles de θ sont ajustées par l'équation à deux paramètres $\tan\theta = A \cdot \tan(B\pi t)$, où A est lié aux variations de la vitesse de rotation au cours du mouvement et $1/B$ est la période de demi-rotation de $\theta = -90^\circ$ à $+90^\circ$. Ce procédé est très satisfaisant pour toutes les cellules étudiées, comme illustré sur la figure 7.2A. Pour vérifier la relation entre A et B selon l'équation 7.1, nous traçons les valeurs de $\pi B(1/A + A)$ en fonction de $\dot{\gamma}$ pour 14 cellules, rigidifiées ou non,

sous différents taux de cisaillement et dans des solutions de Dextran $10^5 g.mol^{-1}$ ou $2.10^6 g.mol^{-1}$ allant de 4% à 9% en masse.

La figure 7.2C montre que tous les points tombent, comme attendu, sur la première bissectrice. Dans ce cas, les valeurs de A sont égales au rapport d'aspect de la cellule r . Toutes ces valeurs appartiennent au même intervalle, quelque soit la contrainte de cisaillement ou la rigidité de la cellule (les hématies rigidifiées doivent par définition se comporter comme des ellipsoïdes rigides). Elles sont de plus en accord avec la valeur $r = 0.38$ trouvée en 1972 par Goldsmith et Mason [37] à partir de globules rouges en Tumbling et en accord avec le rapport d'aspect des cellules au repos.

Cependant, la membrane des globules rouges n'est pas rigide. Nous nous devons donc d'être plus précis. Tout d'abord, nous insistons sur le fait que les déformations de la forme globale de la cellule sont très faibles au cours du mouvement, ce qui nous permet de concentrer notre analyse sur les modèles conservant la forme cellulaire. En effet, les variations temporelles de θ pour un ellipsoïde fluide en Tumbling décrites par Keller et Skalak (KS) sont aussi données par l'équation 7.1, avec r dépendant du rapport de viscosité. Les points matériels de la membrane ne sont alors pas fixes. Ils dérivent et oscillent lentement sur le contour ellipsoïdal dans un mouvement de TankTreading : on le nommera "Tumbling Fluide". Dans notre cas toutefois, le modèle KS n'est clairement pas adéquat puisqu'il prédit que des cellules suspendues dans une solution de Dextran $2.10^6 g.mol^{-1}$ à 9% devraient être en TankTreading quelque soit $\dot{\gamma}$ alors que nous observons qu'elles basculent pour de faibles $\dot{\gamma}$. On se tourne donc vers le modèle KS modifié pour tenir compte de l'énergie élastique et de la mémoire de forme (AFV-SS). Pour de faibles taux de cisaillement, les points matériels de la membrane devraient osciller sur le contour sans dérive de type TankTreading. En effet, ce mouvement nécessite d'importantes déformations de cisaillement de la membrane, impliquant une énergie élastique trop importante pour être fournie par le travail de l'écoulement. Les variations de θ durant ce Tumbling élastique sont donc très semblables à celles d'un ellipsoïde rigide. En augmentant un peu $\dot{\gamma}$, de grandes amplitudes d'oscillations des points de la membrane apparaissent. Au delà d'un taux de cisaillement critique, l'écoulement fournit un travail suffisant pour franchir la barrière d'énergie élastique et ainsi permettre une rotation complète de la membrane : on dit que la membrane est "fluidisée". Du "TankTreading" ou du "Tumbling Fluide", décrits tous deux par KS, sont attendus en fonction du rapport de viscosité.

Les observations rapportées ici indiquent clairement que : i) à faible taux de cisaillement, le mouvement de la cellule est équivalent à celui d'un ellipsoïde rigide avec, vraisemblablement, de petites oscillations des éléments de membrane associées à une faible déformation de celle-ci ; ii) lorsque $\dot{\gamma}$ augmente, l'augmentation de l'amplitude des oscillations des éléments de membranes déstabilise l'orbite du

mouvement de la cellule et permet très probablement à la cellule de limiter la déformation de cisaillement de sa membrane et les variations de forme de son contour ; iii) la cellule finit par effectuer un mouvement de Rolling (avec absence de déformation de la membrane) avant qu'un taux de cisaillement critique de "fluidisation" soit atteint.

7.2.4 Variation de la forme du contour

Nous insistons sur le fait que la forme du contour de la cellule est préservée durant tout le mouvement, quelque soit l'orientation des cellules. Celles-ci conservent leur forme biconcave avec une épaisseur qui ne change pas de manière significative. La variation du grand axe de la cellule est inférieure à 10% pour tous les domaines de contrainte de cisaillement explorées ($0-0.25Pa$) comme on le voit sur les figures 7.1 (séquences d'images) ainsi que sur la figure 7.2 (séquence et r qui est similaire pour toutes les contraintes de cisaillement).

Dans le modèle de Jeffery [50], toutes les orbites d'une cellule en Tumbling sont admises. Dans notre cas, les globules rouges adoptent des orientations spécifiques dans l'écoulement qui semblent être dirigées par le nombre capillaire $Ca = \frac{\eta_0 \dot{\gamma}}{\mu}$, où μ_m est le module de cisaillement du cytosquelette. Les hématies rigidifiées ($Ca=0$) tumbent comme cela a été observé pour des disques rigides[94]. Cela correspond au minimum de dissipation d'énergie. L'orientation des cellules semble être gouvernée par un équilibre entre dissipation visqueuse dans le système et énergie de déformation de cisaillement sur la membrane. Les faibles déformations de la forme du contour suggèrent que la perte de la forme biconcave nécessiterait une énergie bien supérieure. Ce dernier point sera discuté plus tard.

7.3 Transition vers et à partir du régime fluidisé

Sous la valeur critique du rapport de viscosité et au delà de la valeur critique du taux de cisaillement, les globules rouges sont dans un régime fluidisé avec un mouvement de Swinging et de TankTreading (Voir figure 7.3A, z-view). Nous explorons alors la transition "régime fluidisé / régime non fluidisé" dans les deux sens en diminuant et augmentant le taux de cisaillement de façon cyclique.

7.3.1 Du TankTreading vers le Flipping

Le changement de régime est observé selon la direction du gradient de l'écoulement en diminuant $\dot{\gamma}$ en dessous d'une valeur critique $\dot{\gamma}_c^-$. A la transition, la cellule montre un régime intermittent illustré en figure 7.3B. Nous observons successivement une période ou une demi-période de Swing-TankTreading suivie d'un

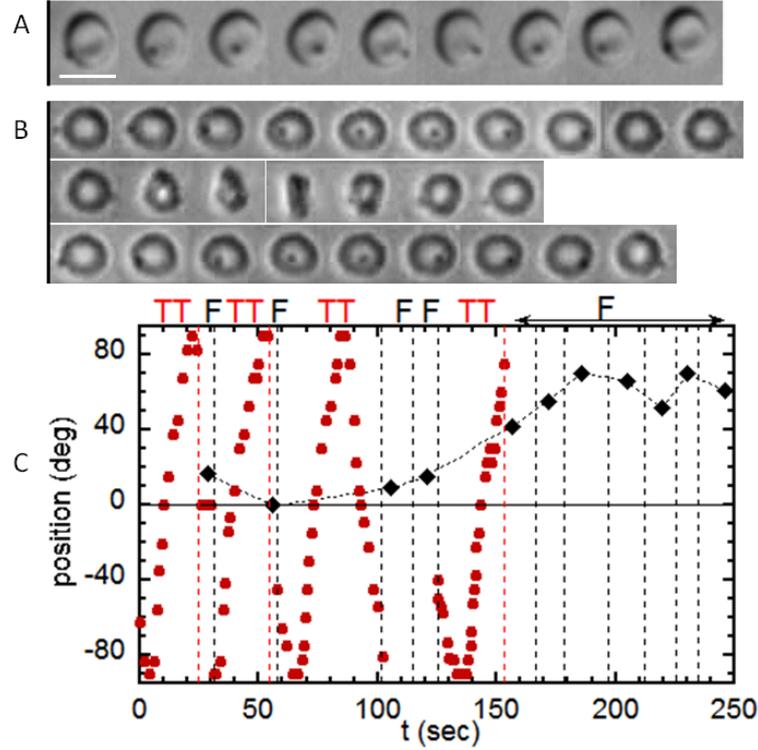


FIGURE 7.3 – Transition du TankTreading au Flipping pour des globules rouges avec une bille de latex (diamètre $1\mu m$) collées à leur surface, Dextran $2.10^6 g.mol^{-1}$, $c = 9\%w/w$, barre d'échelle : $8\mu m$, observation Z-view. A : TankTreading d'un globule rouge avec rotation de la bille. Le creux de la forme biconcave est préservé (image en DIC), $\dot{\gamma} = 3s^{-1}$, durée 5.48s. B : Intermittence à la transition. $\dot{\gamma} = 0.8s^{-1}$, durée 47.84s. Le TankTreading est détecté par la rotation de la bille. La cellule est toujours biconcave (image en contraste de phase). C : Intermittence transitoire. (●) Variation de la position de la bille entre -90° (1^{ère} image) et $+90^\circ$ (10^{ème} image) en fonction du temps pendant la transition Flipping-TankTreading à $\dot{\gamma} = 0.8s^{-1}$. Les lignes en pointillé séparent les TankTreadings des Flippings. (◆) Valeurs de l'angle ϕ durant le Flipping. Quand ϕ atteint 40° , le Flipping se stabilise.

ou deux retournements caractérisés par une faible valeur de l'angle d'orbite ϕ , correspondant à un mouvement de Tumbling. Le régime intermittent prend fin quand le retournement se fait avec une orbite supérieure à 40° . La cellule commence alors à se retourner en continu avec une orbite ϕ constante, qui tend vers la valeur de l'orbite stable associée à ce taux de cisaillement. Ce comportement est montré en figure 7.3C. Nous augmentons ensuite $\dot{\gamma}$ et nous observons un accroissement progressif de l'angle de l'orbite jusqu'à ce que la cellule roule sur sa tranche.

7.3.2 Déformation du contour de la cellule pendant la transition TankTreading-Flipping.

Comme on le voit dans les figures 7.3A par microscopie à contraste interférentiel (DIC) et 7.3B par microscopie à contraste de phase, les globules rouges

présentent une forme biconcave stable pendant le *Swinging* et le *TankTreading* et ne sont pas significativement déformés. La variation de la longueur de la cellule est inférieure à 10% pour toutes les gammes de contrainte de cisaillement étudiées. Cet aspect n'a pas été mis en évidence dans les précédentes études expérimentales, cependant les images publiées auparavant le suggèrent déjà [1, 106]. Nous le montrons sans ambiguïté en visualisant simultanément la rotation d'une bille collée sur la membrane et la présence du creux de la forme biconcave. Nous rappelons à nouveau que cette observation est en contradiction avec les simulations numériques montrant de fortes déformations non stationnaires sur les cellules en *TankTreading* aux alentours de la transition.

7.3.3 Du Rolling vers le TankTreading

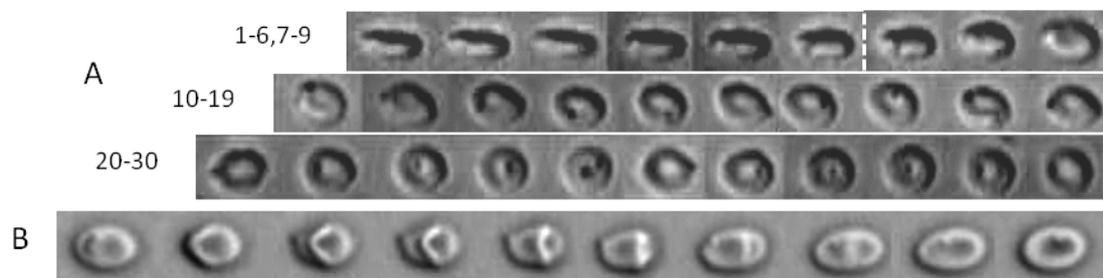


FIGURE 7.4 – Transition du Rolling vers le TankTreading observées sur un globule rouge portant une bille, Dextran $2.10^6 g.mol^{-1}$, $C)9\%w/w$, barre d'échelle $8\mu m$, observation Z-view. A : $\dot{\gamma} = 3s^{-1}$. L'axe de symétrie de la cellule en Rolling (image 1-6) se tourne progressivement (image 7-9). La rotation autour de l'axe de symétrie est observé grâce à la rotation de la bille (image 10-19). Finalement, les lignes de courant changent et la cellule tanktreade. (image 20-30). Durée de la séquence : 46.6s. B : Le mouvement de TankTreading à la transition présente parfois une rotation d'une partie de la membrane, qui se comporte localement comme un solide en tournant d'un seul tenant. $\dot{\gamma} = 6s^{-1}$, durée 1.98s.

La transition du Rolling vers le TankTreading nécessite d'augmenter $\dot{\gamma}$ au delà d'une valeur critique $\dot{\gamma}_c^+$. Toutes les étapes de la transition sont illustrées dans la figure 7.4A en utilisant une bille, collée sur la membrane de la cellule, qui permet de suivre son mouvement. Commencant en Rolling dans le plan de cisaillement, la cellule se tourne progressivement et "plane" dans l'écoulement pendant que sa membrane tourne autour de l'axe de révolution de la cellule. Ce dernier ne montre aucune précession pendant le mouvement et se relève lentement en tournant autour de la direction de l'écoulement. Le mouvement du globule ressemble alors fortement à celui d'un frisbee en plein vol, bien qu'il n'y ait ici aucun effet inertiel. Finalement, après une rotation de 90° , l'axe de révolution arrive dans le plan de cisaillement et la cellule se trouve perpendiculaire à ce plan. Le TankTreading apparaît quand les lignes de courant de la membrane passent d'une rotation autour de l'axe de révolution à du TankTreading, c'est-à-dire une rotation d'avant en arrière des éléments de membrane selon la direction de l'écoulement.

Cette évolution drastique du mouvement cellulaire est effectuée sans déformation particulière de son contour, comme le montre la figure 7.4A. Toutefois, on observe souvent des parties de membrane tournant comme si elles n'étaient pas complètement fluidisées : un petit morceau solide de membrane est immergé dans la partie fluide et bouge d'un seul tenant. Des déformations triconcaves typiques sont montrées dans la figure 7.4B. Les formes obtenues sont fortement similaires aux knizocytes que l'on retrouve chez les nouveaux-nés [83] ainsi que chez les patients avec une déficience d'acétyltransférase lécithine/cholestérol [63], réputée pour altérer la déformabilité et la fluidité de la membrane. Ces formes suggèrent qu'au taux de cisaillement critique $\dot{\gamma}_c^-$, la transition vers le régime fluidifié de la cellule est encore incomplète et que le globule rouge se comporte comme une cellule avec une déformabilité défaillante.

Quand $\dot{\gamma}$ est encore plus augmenté, la déformation disparaît et la cellule retrouve sa forme biconcave. Plusieurs cycles d'hystérésis du taux de cisaillement ont été effectués sur une même cellule, $\dot{\gamma}$ commençant au dessus de $\dot{\gamma}_c^+$ jusque sous $\dot{\gamma}_c^-$, puis augmenté à nouveau jusqu'au delà de $\dot{\gamma}_c^+$. Les deux transitions ont toujours lieu aux mêmes valeurs de $\dot{\gamma}_c^-$ et $\dot{\gamma}_c^+$.

La transition entre corps solide et cellule fluide se produit avec une hystérésis sur un domaine de taux de cisaillement, $\{\dot{\gamma}_c^- - \dot{\gamma}_c^+\}$. Dans cet intervalle, les deux mouvements de Flipping/Rolling et TankTreading sont stables. L'état dynamique choisi dépend de la façon dont il est atteint, en augmentant ou diminuant $\dot{\gamma}$. Les mécanismes de transition vers le Flipping ou le TankTreading sont différents. Dans la transition du TankTreading vers le Flipping, le TT stabilise l'orbite de la cellule. Dans la transition du Rolling vers le TankTreading, l'axe de symétrie de la cellule doit se tourner d'un angle de $\pi/2$. Les lignes de courant à la surface du globule doivent bifurquer de façon abrupte, nécessitant une nette augmentation de l'énergie de déformation élastique. Ces modifications ne peuvent être accomplies que pour des hautes valeurs du taux de cisaillement.

7.4 Discussion sur le rôle de la mécanique

Nous avons montré que la dynamique d'un globule rouge en écoulement de cisaillement est fortement liée aux déformations élastiques de cisaillement de sa membrane dont la forme globale est constante. Cela est dû à la mémoire de forme de la cellule qui contrebalance le déplacement relatif des points matériels de la surface. Dans le régime de type solide, l'orbite spécifique de la cellule en Flipping permet à la membrane de limiter sa déformation de cisaillement quand $\dot{\gamma}$ augmente, au prix de dissipation visqueuse plus importante. Dans la zone de transition, le passage du TankTreading au Rolling et du Rolling au TankTreading implique une barrière d'énergie. Le passage du TT au R nécessite un régime transitoire

de Tumbling, pour lequel de larges déformations de cisaillement des éléments de membranes sont inévitables. De façon similaire, le passage du R au TT se fait via un état transitoire de haute énergie : le mouvement de Spinning. Le couplage entre l'orientation de la cellule dans l'écoulement et la déformation de cisaillement prend son origine dans l'ordre de grandeur du travail de l'écoulement qui est similaire à l'énergie nécessaire pour déplacer les éléments de membrane sur la surface.

D'un autre côté, l'absence de déformation significative du contour de la cellule est un point très important. Cela signifie que le travail de l'écoulement n'est pas suffisant pour modifier la forme de la cellule. Cet aspect peut être compris en terme de mémoire de forme et de forme non contrainte. La mémoire de forme résulte d'une forme sans contrainte de la membrane de la cellule qui n'est pas isotrope. Celle-ci pourrait être une capsule inhomogène, avec par exemple une région équatoriale renforcée ou une anisotropie dans les propriétés élastiques [79], ou encore une ellipsoïde non sphérique. Cette dernière hypothèse, étudié par Lim, Wortis et Mukhopadhyay [64], permet de retrouver des formes réelles de globules rouges en utilisant un modèle mécanique incluant les élasticités de courbure, étirement et cisaillement. Selon eux, la forme dépourvue de contraintes de la membrane est un sphéroïde de très faible excentricité, avec une aire égale à celle d'un globule rouge et un volume très proche d'une sphère : le ratio $\frac{V_{spheroid}}{V_{sphere}}$ est compris entre 0.95 et 0.985. La réduction du volume jusqu'à celui d'une hématie fait flamber la surface et laisse apparaître deux creux dans les régions polaires. De ce point de vue, un globule rouge normal pourrait être considéré comme une coque quasi-sphérique flambée, associée à un minimum d'énergie de déformation élastique.

A l'issue de nos observations, nous pensons que la forme flambée biconcave demeure la forme de moindre énergie de déformation élastique, même lorsque la cellule est en TankTreading, tant que la contrainte de cisaillement reste modérée. Cette forme évoluera progressivement vers un contour ellipsoïdal pour de forts taux de cisaillement, comme ce qui a été observé par Fischer [32].

7.5 Conclusion

Ce travail montre que l'élasticité de cisaillement de la membrane d'un globule rouge est d'une importance capitale pour la déformation de son contour, son mouvement et son orientation dans un écoulement de cisaillement. Nous observons que, proche de la transition $\dot{\gamma}_c^-$, le régime de Tumbling est instable. Nous mettons en évidence un régime stable de mouvement très peu décrit dans la littérature, le "Rolling", où la cellule tourne dans le plan de cisaillement et roule sur sa tranche. Cela introduit une nouvelle considération pour les futurs modèles et simulations : l'axe de révolution de la cellule ne se trouve pas nécessairement dans le plan de cisaillement de l'écoulement. Que les orientations observées puissent être expli-

quées par le minimum d'énergie de dissipation, comme le supposait Jeffery, reste une question ouverte. Nous espérons que ce travail générera de nouvelles études théoriques, ainsi que de nouveaux travaux sur l'énergie de déformation élastique des formes flambées en TankTreading, en commençant par des sphéroïdes quasi-sphériques non contraints. Pour finir, la grande stabilité de la forme biconcave des cellules rend les modèles à forme fixe très pertinents pour une détermination non invasive des propriétés mécaniques des globules rouges.

Chapitre 8

Refonte du modèle

Nous avons vu au chapitre précédent que la forme pour laquelle la membrane d'un globule ne contient aucune contrainte élastique n'est pas nécessairement biconcave. Les cellules suspendues dans un milieu au repos ont cependant cet aspect à deux joues. La forme adoptée par les cellules correspond donc au minimum d'énergie élastique du cytosquelette, qui n'est pas forcément la définition du point d'énergie nulle. La prise en compte de ce critère nous amène à retravailler le modèle AFV-SS, qui considère la forme biconcave comme l'origine de l'énergie de déformation de cisaillement.

Nous reprenons ici la définition de la déformation imposée aux cellules. Ensuite, nous développons à nouveau le calcul des matrices de déformation et de contrainte élastique pour calculer la puissance élastique stockée dans la membrane lorsque celle-ci a tourné d'un angle ω . Nous en déduisons alors la nouvelle équation dynamique du système et nous analysons comment cela affecte le mouvement des cellules.

Ces calculs sont inspirés des informatoins supplémentaires donnée par Abkarian et al. [1].

8.1 Déformation initiale

Nous supposons que la forme pour laquelle aucune contrainte élastique n'est emmagasinée dans le cytosquelette est une ellipse de très faible excentricité dont la surface est identique à celle d'un globule rouge à l'état physiologique et dont le volume est donc plus important. A partir de cette forme de référence, une cellule de surface et volume physiologiques peut être obtenu par réduction de volume selon la transformation décrite dans le schéma 8.1. On obtient alors un ellipsoïde (et non pas une forme biconcave) qui sert de modèle pour le globule rouge, de manière similaire à l'approche de KS.

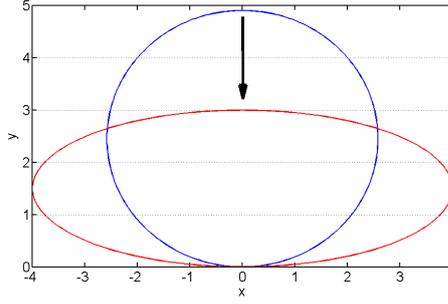


FIGURE 8.1 – Schéma d'une coupe des ellipsoïdes avant et après la compression. Ces deux ellipsoïdes ont une surface identique. Le rapport d'aspect $\frac{a_2}{a_1}$ initial est 0.95, le final est 0.375.

Soit le repère cartésien x_1, x_2, x_3 dans lequel sont repérées les formes des ellipses. Considérant des coordonnées sphériques, nous définissons la longitude et la latitude par, respectivement, α_1, α_2 . La diminution de volume pour atteindre le volume du globule physiologique se définit comme la transformation entre les deux formes suivantes :

$$\begin{cases} x_1^0 = a_0 \cos \alpha_1 \cos \alpha_2 \\ x_2^0 = \lambda_0 a_0 \cos \alpha_1 \sin \alpha_2 \\ x_3^0 = a_0 \sin \alpha_2 \end{cases} \rightarrow \begin{cases} x_{e,1} = a_e \cos \alpha_1 \cos \alpha_2 \\ x_{e,2} = \lambda_e a_e \cos \alpha_1 \sin \alpha_2 \\ x_{e,3} = a_e \sin \alpha_2 \end{cases} \quad (8.1)$$

où les x_i^0 et x_i^e sont les coordonnées des points de la membrane de chaque ellipse.

L'aire d'un ellipsoïde oblate, pour lequel a est son grand axe et λa son petit axe, se calcule de la façon suivante :

$$S_{ellipse} = 2\pi a^2 + \frac{\pi \lambda^2 a^2}{\sqrt{1-\lambda^2}} \ln \left(\frac{1 + \sqrt{1-\lambda^2}}{1 - \sqrt{1-\lambda^2}} \right) \quad (8.2)$$

En écrivant l'égalité des surfaces des deux ellipses considérées, nous trouvons la relation entre les dimensions des deux ellipses :

$$a_e = \left[\frac{2 + \frac{\lambda_0^2}{\sqrt{1-\lambda_0^2}} \ln \left(\frac{1 + \sqrt{1-\lambda_0^2}}{1 - \sqrt{1-\lambda_0^2}} \right)}{2 + \frac{\lambda_e^2}{\sqrt{1-\lambda_e^2}} \ln \left(\frac{1 + \sqrt{1-\lambda_e^2}}{1 - \sqrt{1-\lambda_e^2}} \right)} \right] a_0 = \kappa a_0 \quad (8.3)$$

Nous avons alors une nouvelle relation entre les coordonnées des ellipses :

$$\begin{cases} x_{e,1}(\vec{x}_0) = \kappa x_{0,1} \\ x_{e,2}(\vec{x}_0) = \frac{\lambda_e}{\lambda_0} \kappa x_{0,2} \\ x_{e,3}(\vec{x}_0) = \kappa x_{0,3} \end{cases} \quad (8.4)$$

Nous définissons finalement les matrices de transformation pour passer de l'ellipse initiale à l'ellipse comprimée, des points de vues respectifs de l'ellipse initiale

et de l'ellipse déformée, comme :

$$\mathbf{F}_{0 \rightarrow e} := \nabla_{\vec{x}_0} \vec{x}_e = \begin{pmatrix} \kappa & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\lambda_e}{\lambda_0} \kappa & 0 \\ 0 & 0 & \kappa \end{pmatrix} ; \quad \mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1} := \nabla_{\vec{x}_e} \vec{x}_0 = \begin{pmatrix} \frac{1}{\kappa} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\lambda_e}{\lambda_0 \kappa} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{\kappa} \end{pmatrix} \quad (8.5)$$

8.2 Contrainte dans la membrane

Par souci de simplicité, nous choisissons comme loi constitutive mécanique de la membrane la loi de Kelvin-Voigt comme dans le modèle AFV. La contrainte totale dans la membrane est donc la somme des parties visqueuses et élastiques : $\sigma = \sigma_{visq} + \sigma_{el}$. La déformation initiale n'influant pas sur les éléments visqueux du modèle, la contrainte visqueuse dans la membrane est identique à celle du modèle AFV :

$$\sigma_{visq} = -p\mathbb{I} + 2\eta_m \mathbf{D} \quad (8.6)$$

avec \mathbf{D} le tenseur des vitesses de déformation de la membrane définie par $\mathbf{D} = \frac{1}{2}(\nabla \vec{v} + {}^t \nabla \vec{v})$. Abkarian et al. expriment la contrainte élastique de la membrane en utilisant la représentation lagrangienne du tenseur de Piola-Kirchhoff, définie comme suit :

$$\pi_{el} = \pi^0 \mathbb{I} + 2\mu_m \epsilon \quad (8.7)$$

où π_0 est la contrainte homogène initiale dans le matériau, \mathbb{I} est la matrice identité, μ_m est le module de cisaillement de la membrane (aussi appelé le second coefficient de Lamé), et ϵ est le tenseur des déformations. Les modèle KS et AFV considèrent que le champ des vitesses fait tourner les éléments de membranes dans le plan de cisaillement. Le modèle AFV ne prend alors en compte dans ϵ qu'une déformation due à la rotation de la membrane d'un angle ω le long de son contour. En considérant ici que la cellule possède une déformation initiale, le tenseur des déformations devient $\epsilon = \epsilon^i + \epsilon^{TT}$.

Le tenseur de déformation lagrangien associé à la compression initiale est :

$$\epsilon_0^i := \frac{1}{2}({}^t \mathbf{F}_{0 \rightarrow e} \cdot \mathbf{F}_{0 \rightarrow e} - \mathbb{I}) \quad (8.8)$$

Exprimé par rapport aux coordonnées de l'ellipse comprimée, il devient :

$$\epsilon_e^i := {}^t \mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1} : \epsilon_0^i : \mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1} = \frac{1}{2}(\mathbb{I} - {}^t \mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1} \cdot \mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1}) \quad (8.9)$$

La déformation de "TankTreading" est définie par les équations suivantes :

$$\begin{cases} x_{TT,1}(\vec{x}_e) &= x_{e,1} \cos(\omega) - x_{e,2} \lambda_e \sin(\omega) \\ x_{TT,2}(\vec{x}_e) &= x_{e,1} \lambda_e \sin(\omega) + x_{e,2} \cos(\omega) \\ x_{TT,3}(\vec{x}_e) &= x_{e,3} \end{cases} \quad (8.10)$$

et est associé à la matrice de transformation :

$$\mathbf{F}_{e \rightarrow TT} := \nabla_{\vec{x}_e} \vec{x}_{TT} = \begin{pmatrix} \cos(\omega) & -\lambda_e \sin(\omega) & 0 \\ \lambda_e \sin(\omega) & \cos(\omega) & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (8.11)$$

La déformation, du point de vue de l'ellipse comprimée, s'écrit alors :

$$\boldsymbol{\epsilon}_e^{TT} := \frac{1}{2}({}^t\mathbf{F}_{e \rightarrow TT} \cdot \mathbf{F}_{e \rightarrow TT} - \mathbb{I}) \quad (8.12)$$

Nous pouvons alors calculer la contrainte élastique eulérienne, définie à partir du tenseur de Piola-Kirchhoff :

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\sigma}_{el} &= {}^t\mathbf{F}_{e \rightarrow TT} : \boldsymbol{\pi}_{el} : \mathbf{F}_{e \rightarrow TT} \\ &= {}^t\mathbf{F}_{e \rightarrow TT} : 2\mu_m(\boldsymbol{\epsilon}_e^i + \boldsymbol{\epsilon}_e^{TT}) : \mathbf{F}_{e \rightarrow TT} \\ &= {}^t\mathbf{F}_{e \rightarrow TT} : \mu_m((\mathbb{I} - {}^t\mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1} \cdot \mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1}) : \mathbf{F}_{e \rightarrow TT} + \mu_m(\mathbb{I} - {}^t\mathbf{F}_{e \rightarrow TT}^{-1} \cdot \mathbf{F}_{e \rightarrow TT}^{-1})) \end{aligned}$$

$$\boldsymbol{\sigma}_{el} = \mu_m \begin{pmatrix} 1 - \frac{1}{\kappa^2}(\cos^2(\omega) + \lambda_0^2 \sin^2(\omega)) & \frac{1}{\lambda_e \kappa^2}(\lambda_0^2 - 1) \cos \omega \sin \omega & 0 \\ \frac{1}{\lambda_e \kappa^2}(\lambda_0^2 - 1) \cos \omega \sin \omega & 1 - \frac{\lambda_0^2}{\lambda_e^2 \kappa^2}(\cos^2(\omega) + \frac{1}{\lambda_0^2} \sin^2(\omega)) & 0 \\ 0 & 0 & 2 - \frac{1}{\kappa^2} \end{pmatrix} \quad (8.13)$$

Un commentaire est nécessaire sur la définition de la contrainte élastique générée lors de la compression initiale. Cette transformation est faite à surface constante. Il n'y a donc ni dilatation, ni diminution de la quantité de membrane. Localement, nous ne pouvons donc avoir que des déformations de cisaillement, auxquelles sont associées le module de cisaillement μ_m .

8.3 Puissance dans la membrane

La puissance élastique de la membrane est définie [56][1] comme :

$$P_m = \int_{\Omega} Tr(\boldsymbol{\sigma}_{tot} : \mathbf{D}) d\Omega = \int_{\Omega} Tr([\boldsymbol{\sigma}_{visq} + \boldsymbol{\sigma}_{el}] : \mathbf{D}) d\Omega \quad (8.14)$$

Le mouvement en cours est le Tanktreading. Le tenseur des vitesses de déformation se calcule donc à partir de \vec{v}_{TT} et vaut :

$$\mathbf{D} = \frac{1}{2} \dot{\omega} \left(\lambda_e - \frac{1}{\lambda_e} \right) \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (8.15)$$

Nous en déduisons l'expression de la puissance de la membrane :

$$P_m = \eta_m \dot{\omega}^2 \left(\lambda_e - \frac{1}{\lambda_e} \right)^2 \Omega + \frac{\mu}{2} \sin(2\omega) \dot{\omega} \left(\lambda_e - \frac{1}{\lambda_e} \right) \left(\frac{\lambda_0^2 - 1}{\lambda_e \kappa^2} \right) \Omega \quad (8.16)$$

8.4 Équation du mouvement

L'équilibre des couples qui s'appliquent sur le système n'est pas modifié par la déformation initiale dans la membrane et reste égal à ce qu'avait calculé Keller & Skalak [56]. La conservation de l'énergie dans le système impose l'équilibre entre l'énergie fournie par l'écoulement d'une part, et l'énergie stockée ou dissipée par la cellule d'autre part. Nous avons donc :

$$W_p = D' + P_m \quad (8.17)$$

Le travail fourni par l'écoulement externe vaut [56] :

$$W_p = V\eta_0 \left(f_2 \dot{\omega}^2 + f_3 \dot{\gamma} \dot{\omega} \cos(2\theta) \right) \quad (8.18)$$

La dissipation visqueuse générée par l'écoulement dans la cellule vaut [56] :

$$D' = V\eta_i f_1 \quad (8.19)$$

En incluant la nouvelle expression de la puissance dans la membrane, le travail fourni par l'écoulement externe et la dissipation visqueuse à l'équation 8.17, nous déterminons la nouvelle équation du mouvement de la membrane :

$$\begin{aligned} \dot{\omega} = & \frac{-\eta_0 f_3 \dot{\gamma}}{\eta_0 f_2 - \left(\eta_i + \eta_m \frac{\Omega}{V} \right) f_1} \cos(2\theta) \\ & + \frac{\lambda_0^2 - 1}{(\lambda_e^2 - 1)\kappa^2} \frac{1}{2} \frac{f_1 \mu_m \frac{\Omega}{V}}{\eta_0 f_2 - \left(\eta_i + \eta_m \frac{\Omega}{V} \right) f_1} \sin(2\omega) \end{aligned} \quad (8.20)$$

Cette équation est très similaire à l'équation du modèle AFV-SS. Elle contient toutefois un nouveau facteur C^e , dû à la déformation de compression initiale, qui vaut :

$$C^e = \frac{\lambda_0^2 - 1}{(\lambda_e^2 - 1)\kappa^2} \quad (8.21)$$

8.5 Conséquences du facteur correctif

La déformation de compression initiale de la membrane change très peu les équations du mouvement : l'ancien module de cisaillement μ_m est simplement remplacé par le terme $\mu_m C^e$.

Nous montrons sur la figure 8.2 la courbe de variation du facteur correctif C^e en fonction du rapport d'aspect initial de la coque λ_0 . S'il n'y a pas de compression initiale, comme c'est le cas dans le modèle AFV-SS, alors $\lambda_0 = \lambda_e$ et C^e vaut 1.

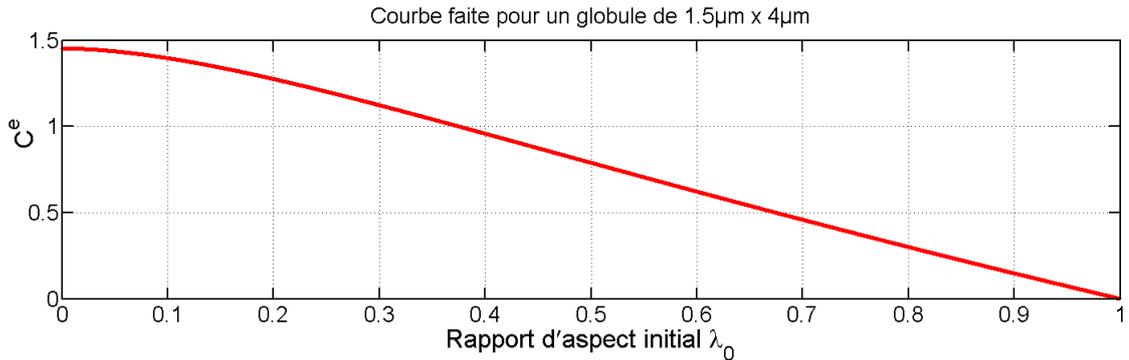


FIGURE 8.2 – Variation du facteur correctif de μ_m en fonction du rapport d'aspect de la coque initiale λ_0 . L'ellipse utilisée pour le globules rouge finale a une petit axe de $1.5\mu\text{m}$ et un grand axe de $4\mu\text{m}$, soit $\lambda_e = 0.375$.

Nous retrouvons alors les équations précédentes, où nous considérons que la forme sans contrainte est la forme de la cellule au repos. Si nous considérons que la forme initiale est sphérique, alors $\lambda_0 = 1$ et $C^e = 0$. L'élasticité de cisaillement n'a aucun effet sur le mouvement et nous obtenons les équations du mouvement d'une vésicule visqueuse, comme dans le modèle de KS. Une rotation de la membrane d'un angle ω a alors un bilan d'énergie nul : il y a autant d'énergie entrant dans la membrane que d'énergie rendue.

Cette approche nous permet d'expliquer les valeurs de module de cisaillement déterminées précédemment à partir de données expérimentales [1]. μ_m^{AFV} est en effet compris entre 7.10^3 et $10^{-1}\mu\text{N}.m^{-1}$, déterminé à partir des ajustements du modèle AFV-SS sur les données expérimentales. Ils se trouvent bien en dessous des valeurs mesurées par des expériences de pinces optiques [43], déterminant un module de cisaillement moyen de $2.5\mu\text{N}.m^{-1}$. Cette différence d'un à trois ordres de grandeur entre les deux types de mesures trouve une explication dans le choix de la forme non contrainte de la membrane, par l'intermédiaire du facteur correctif C^e non pris en compte dans le modèle AFV. Un rapport $C^e = \mu_m^{AFV} / \mu_m^{pincoptique} = 10^{-2}$ correspond à un rapport d'aspect initial $\lambda_0 = 0.993$, qui est en bon accord avec les calculs de Lim et al [64].

Des études précédentes, dont les résultats sont montrés sur la figure 8.3, ont en effet retrouvé l'enchainement complet des formes de globules rouges en considérant des volumes réduits initiaux compris dans l'intervalle $0.95 - 0.985$ [64], correspondant pour une forme d'ellipse à $\lambda_0 \approx 0.95 - 0.985$. Dans cette gamme de λ_0 , le facteur correctif C^e est compris entre 0.07 et 0.02, ce qui permet de retrouver des valeurs de module de cisaillement correctes.

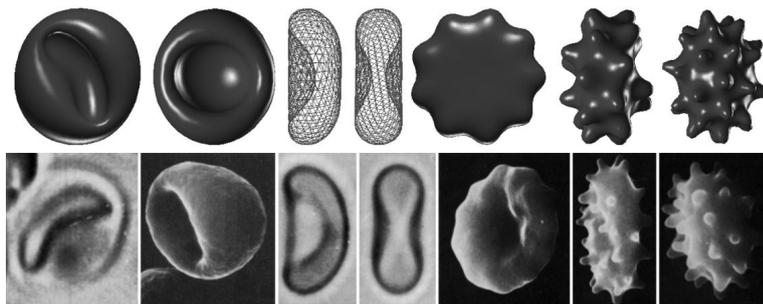


FIGURE 8.3 – Séquence Stomatocyte-Discocyte-Echinocyte obtenue par Lim, Wortis et Mukhopadhyay en partant d'une ellipse de rapport d'aspect $\lambda_0 = 0.95$. Illustration tirée de [64].

8.6 Énergie de la membrane

Pour mieux comprendre comment ce module de cisaillement effectif diminue, nous regardons les valeurs de l'énergie élastique stockée dans la membrane.

L'énergie élastique est définie par

$$E_{el} := \int_0^t P_{el} dt = \frac{\mu\Omega}{2} \left(\lambda_e + \frac{1}{\lambda_e} \right)^2 C^e \sin^2 \omega + E(t=0) \quad (8.22)$$

L'énergie au temps initial correspond à ce qui a été stocké lors de la compression. Elle se calcule à partir du tenseur de la déformation correspondante. En représentation eulérienne, on a :

$$E(t=0) := E_{precontrainte} = \oint_{\omega} \frac{1}{2} Tr(\boldsymbol{\sigma}_e : \boldsymbol{\epsilon}_e) d\Omega \quad (8.23)$$

avec $\boldsymbol{\epsilon}_e = {}^t\mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1} : \boldsymbol{\epsilon}_{0 \rightarrow e} : \mathbf{F}_{0 \rightarrow e}^{-1}$ et $\boldsymbol{\sigma}_e = 2\mu\boldsymbol{\epsilon}_e$. L'énergie élastique de la membrane s'exprime alors :

$$\begin{aligned} E_{elastique}(\omega) &= \frac{\mu\Omega}{2} \left[\left[2 \left(1 - \frac{1}{\kappa^2} \right)^2 + \left(1 - \frac{\lambda_0^2}{\lambda_e^2 \kappa^2} \right)^2 \right] + \frac{(\lambda_e^2 - 1)(\lambda_0^2 - 1)}{\lambda_e^2 \kappa^2} \right] \\ &\quad \cdots + \frac{\mu\Omega}{2} \left(\lambda_e + \frac{1}{\lambda_e} \right)^2 C^e \sin^2 \omega \\ &= E_0 + E_a \sin^2 \omega \end{aligned} \quad (8.24)$$

Nous visualisons la barrière d'énergie élastique de la membrane en fonction de ω sur la figure 8.4a pour différents rapports d'aspects initiaux. La courbe pour $\lambda_0 = \lambda_e = 0.375$ correspond au modèle AFV. Nous voyons que lorsque la membrane est à sa position de repos $\omega = 0 \pmod{\pi}$, l'énergie est nulle. L'état du globule au repos est bien dans ce cas la position d'énergie élastique de référence. Lorsque nous augmentons λ_0 , nous voyons une augmentation de la valeur minimale

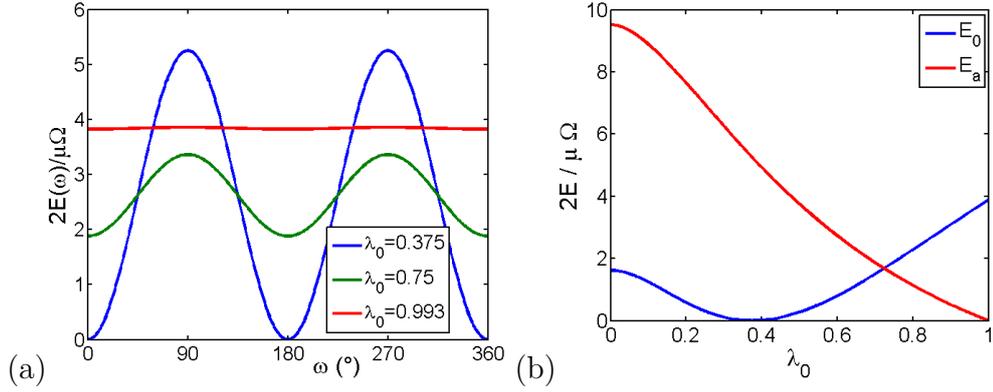


FIGURE 8.4 – a : Énergie élastique sans dimension $\frac{2E}{\mu_m\Omega}$ de la membrane en fonction de l'angle ω . Les courbes correspondent à un rapport d'aspect initial λ_0 égal à 0.374 (bleu), 0.75 (rouge), 0.993 (vert). b : Évolution des termes constants $\frac{2E_0}{\mu_m\Omega}$ et d'amplitude $\frac{2E_a}{\mu_m\Omega}$ de l'énergie élastique sans dimension en fonction du rapport d'aspect de la coque initial λ_0 .

correspondant à l'énergie stockée lors de la compression initiale. Nous constatons aussi que plus la forme initiale est proche de la sphère, plus les amplitudes de variation de l'énergie élastique diminuent.

L'évolution de E_0 et E_a en fonction de λ_0 est présentée en figure 8.4b. Pour $\lambda_0 = \lambda_e = 0.375$, E_0 est nulle : il n'y a pas de compression initiale donc pas d'énergie de précontrainte (cas du modèle AFV). Lorsque λ_0 augmente vers 1, l'énergie de pré-contrainte augmente. E_a de son côté est une fonction strictement décroissante en fonction de λ_0 . Cette amplitude est la barrière de potentiel que l'écoulement doit surpasser pour atteindre le régime de TankTreading. Si $\Delta E_{TT} = E(\omega = 90^\circ) - E(\omega = 0)$ diminue, le mouvement de TankTreading nécessitera moins d'énergie pour apparaître. Cette interprétation rejoint bien l'effet de diminution du module de cisaillement effectif discuté plus haut.

8.7 Conclusion

L'écart entre la forme à contrainte nulle et la forme ellipsoïdale à volume et surface physiologiques d'un globule a deux effets. D'une part l'énergie élastique stockée dans le globule physiologique augmente et d'autre part le seuil de transition entre mouvement de bascule et mouvement de TankTreading diminue lorsque la forme sans contrainte se rapproche d'une sphère.

L'écart entre la forme à contrainte nulle et la forme ellipsoïdale à volume et surface physiologiques d'un globule a deux effets. D'une part, l'énergie élastique stockée dans le globule physiologique augmente. Nous pouvons à ce propos nous demander quel effet peut avoir une telle contrainte sur la biologie d'un globule rouge. D'autre part, le seuil de transition entre mouvement de bascule et mou-

vement de TankTreading diminue lorsque la forme sans contrainte se rapproche d'une sphère. Cet effet fournit de plus une explication aux trop faibles valeurs de module de cisaillement déterminés lors de l'étude précédente [1], en comparaison aux résultats disponible dans la littérature [43, 61, 62, 68].

L'origine biologique de cette forme quasi-sphérique peut se trouver dans la naissance des globules rouges. En effet, l'érythropoïèse passe par plusieurs étapes et formes cellulaires. Selon Lazarides et al. [110], la stabilisation du cytosquelette des globules rouges a lieu bien avant la maturation des cellules. En supposant que le réseau de spectrine est créé dans une phase du cycle de développement où la forme cellulaire était presque sphérique, on entrevoit comment cette forme sans contrainte de la membrane peut exister. Une anisotropie de forme n'est toutefois pas la seule façon d'expliquer la grande stabilité de la forme biconcave. Les travaux de Pinder [79] ont montré qu'une variation dans les propriétés élastiques de la membrane (renforcement de la région équatoriale par exemple) pouvait aussi mener à des cellules biconcaves avec une mémoire de forme.

Chapitre 9

Conclusion et perspectives

Nous avons montré ici que des globules rouges dans un écoulement de cisaillement dépendant du temps peuvent adopter un comportement chaotique, observé dans les conditions expérimentales et prédit dans les conditions physiologiques. En étudiant leur mouvement dans un cisaillement constant, nous avons ensuite observé que l'orbite des cellules n'est pas stable et varie au cours du mouvement en fonction du taux de cisaillement appliqué. Cela nous a permis de mettre en évidence de nouveaux régimes de mouvement : Rolling, Spinning et Trilobe TankTreading. Ce travail a confirmé une nouvelle fois que la forme de disque biconcave des cellules n'est pas altérée par ces mouvements à bas taux de cisaillement. Finalement, nous avons retravaillé le modèle à forme fixée pour intégrer une nouvelle forme non contrainte du cytosquelette élastique. Nous avons alors montré que l'utilisation d'une forme initiale presque sphérique permet de conserver les mêmes propriétés dynamiques du modèle, en intégrant des modules élastiques de cisaillement beaucoup plus importants, cohérents avec la littérature.

Les équations prévoient l'existence d'un régime de Tumbling fluide, à fort taux de cisaillement, et lorsque le rapport de la viscosité effective de la cellule sur la viscosité du fluide externe η_{eff}/η_0 est grand. Ce régime n'est pas observable avec notre dispositif expérimental, qui ne permet que des visualisations pendant un temps limité. Cela nécessiterait l'emploi d'autres dispositifs, comme le rhéoscope utilisé dans d'autres études [85, 32, 97, 13] avec lequel nous pourrions appliquer un taux de cisaillement important en gardant la cellule dans le champ de visualisation du microscope. Ces conditions permettraient, si les prédictions de notre modèle sont exactes, d'observer un mouvement de culbute de la cellule combiné à une rotation de sa membrane à faible vitesse.

Les régimes de mouvement d'une cellule unique étant maintenant bien caractérisés, il serait intéressant de regarder par la suite quels rôles jouent ces mouvements lors d'écoulements avec plusieurs cellules. Dans quelles situations observe-t-on tel

ou tel régime ? Ces régimes de mouvements interviennent-ils lors de l'apparition des rouleaux ? Qu'en est-il de la formation des rouleaux lorsque l'écoulement dépend du temps et place les cellules en zone de régime chaotique ?

Troisième partie

Monocytes dans un réseau de
microcanaux

Nous étudions dans cette partie le mouvement de monocytes dans des réseaux de canaux biomimétiques. Nous cherchons à étudier le lien entre la rhéologie des cellules et leur transport dans le réseau. Dans des conditions physiologiques, ce mouvement présente en effet des propriétés particulières [25] : temps de transit long, mouvement par sauts, forte déformation des cellules. De plus, on observe pour de nombreux symptômes inflammatoires, comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë, une rigidification des leucocytes qui serait la cause de l'arrêt des cellules dans les capillaires pulmonaires. Cela entraînerait une obstruction de ces petits vaisseaux sanguins, ce qui serait à l'origine du dysfonctionnement des poumons [25, 15, 73]. Dans ces situations, le lien entre la rhéologie des cellules et leurs propriétés de mouvement est donc crucial.

Après avoir présenté les choix expérimentaux effectués, nous étudions le comportement du dispositif microfluidique en termes d'écoulement hydrodynamique et de mouvement d'objets modèles en son sein. Nous analysons alors l'entrée des cellules dans le réseau pour laquelle nous cherchons à extraire des informations sur la rhéologie des cellules. Nous abordons ensuite le régime transitoire des cellules marqué par un mouvement irrégulier et une adaptation de forme et de vitesse des cellules. En fin de mouvement, nous étudions leur mouvement stationnaire au cours duquel les phénomènes observés sont périodiques et stables. Pour terminer, nous présentons le travail préliminaire effectué pour la mise en place d'un dispositif expérimental permettant l'application d'une contrainte hydrodynamique extensionnelle sur une cellule.

Chapitre 10

Choix expérimentaux

10.1 Création d'un réseau biomimétique adapté

L'étude de la circulation de globules blancs dans des réseaux de capillaires est un projet récent, commencé avec cette thèse. Les expériences réalisées ici sont donc les premières, et, pour commencer, nous avons cherché à saisir l'essentiel des caractéristiques du phénomène tout en gardant un système le plus simple possible.

Nous étudions ici les caractéristiques principales des réseaux de capillaires pulmonaires et de la circulation des leucocytes. Nous en déduisons alors les exigences que nous fixerons pour la création du réseau.

10.1.1 Caractéristiques essentielles

Le réseau des capillaires pulmonaires a une structure très complexe. Plusieurs chemins existent pour relier les artérioles aux veinules. Les vaisseaux composant le réseau présentent une grande diversité de dimensions (diamètre, longueur). De plus, ces dimensions varient avec le cycle respiratoire. Il est donc très difficile a priori de créer un système embrassant toutes ces caractéristiques géométriques. Certaines considérations nous permettent toutefois de dégager les aspects importants à intégrer dans notre dispositif expérimental.

Tout d'abord, l'aspect "réseau" est important. On doit offrir à une cellule plusieurs chemins possibles afin de pouvoir observer quel choix sera fait pour la trajectoire. Cette multitude de canaux introduit aussi une part d'aléatoire dans le choix de la trajectoire : à une jonction, une cellule va-t-elle à gauche ou à droite ?

Considérons l'écoulement allant d'un canal en amont C_{am} vers deux canaux en aval C_{av1} et C_{av2} . Le débit relatif entre C_{av1} et C_{av2} dépend de leur section relative : le débit de fluide est plus important dans le canal le plus grand. Un leucocyte se présentant à cette jonction a donc une plus grande probabilité d'aller

dans le grand canal que dans le petit. Si la multitude des trajectoires possibles est nécessaire, il n'y a a priori pas besoin de recréer les tous petits canaux.

On sait en revanche que les cellules subissent parfois de fortes déformations qui les amènent parfois à s'arrêter [25]. Il est très important de recréer des zones de fortes déformations pour la cellule.

10.1.2 Exigences pour le réseau

Pour être pertinent, le réseau doit contenir les caractéristiques suivantes : une dose d'aléatoire pour mimer le comportement aux jonctions, une dose de dispersité pour mimer la multitude de chemins accessibles à la cellule, ainsi que des zones de fortes déformations pour la cellule. On dispose pour cela une série de piliers qui formeront les parois des canaux du réseaux (Fig. 10.1).

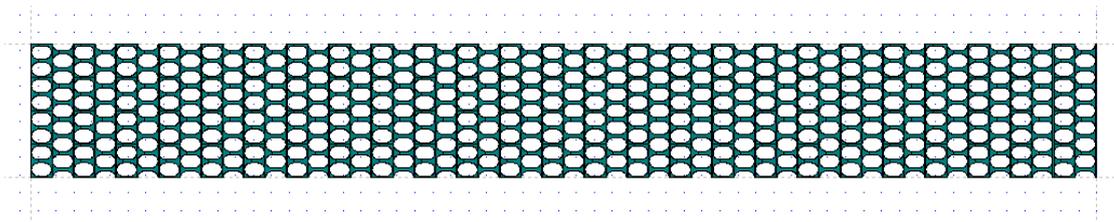


FIGURE 10.1 – Exemple d'un réseau de capillaires artificiel.

La dose d'aléatoire est créée par l'agencement des piliers en quinconce. Tous les embranchements sont des jonctions symétriques, quasiment en forme de T, pour lesquels l'écoulement hydrodynamique est un point instable (l'écoulement en sortie se fait dans deux directions opposées). Les cellules circulant dans ce réseau iront donc d'un côté ou de l'autre à chaque bifurcation, dans une géométrie où il n'y a a priori pas de direction préférentielle.

En disposant un nombre assez important de piliers en parallèle, on dispose d'un nombre de chemins assez important pour visualiser la dispersion des trajectoires des cellules. Pour limiter la complexité du système, on choisit d'avoir des canaux identiques, avec des dimensions (hauteur, largeur et longueur) dans le domaine des valeurs moyennes des capillaires pulmonaires fournies dans la littérature. Changer légèrement l'espace entre les plots nous permettra de ne faire varier qu'une seule échelle de longueur. Le nombre de colonnes est, par ailleurs, égal au nombre moyen de canaux traversés par une cellule dans des poumons humains. L'espace entre les piliers est donc uniforme dans le réseau.

La déformation des cellules se fait alors à deux endroits particuliers du réseau. Les canaux ont des dimensions inférieures à celle des cellules et les forceront donc à s'allonger pour les traverser. Elles seront de plus soumises à un étirement dans la zone de la jonction [52]. En effet, si l'écoulement est instable avec le fluide qui

s'écoule dans deux directions opposées, il s'exerce à cet endroit un étirement sur la cellule, dont l'amplitude dépendra du temps de séjour dans la jonction.

Enfin, la structure fortement parallélisée permet de stabiliser le flux et de limiter les perturbations du champ de pressions créées par la présence d'une cellule. De même, l'apparition de gouttières dans les quatre arêtes des canaux [107, 108] n'auront pas d'effet important sur la pression. Cela crée en revanche une incertitude sur la détermination des formes des cellules.

10.2 Modification du cytosquelette des cellules

Pour étudier l'effet de la rhéologie des cellules sur leur mouvement dans le réseau, nous pouvons agir sur le cytosquelette des cellules utilisées pour modifier ses propriétés rhéologiques. Nous utilisons pour cela des traitements biochimiques qui agissent spécifiquement sur un des trois composants. Pour cette première étude du système, nous nous sommes concentrés sur les modifications de l'actine qui est la partie de cytosquelette la plus proche de la membrane cytoplasmique, et qui sera donc mise à contribution en premier lors des déformations.

10.2.1 Inhibition de la polymérisation de l'actine

La latrunculine A est une toxine provenant d'une éponge marine, *Latrunculia Magnifica* [90]. Elle inhibe la polymérisation de l'actine globulaire en actine filamenteuse sans inhiber sa dépolymérisation. Dans les expériences de rhéologie sur des gels d'actine, elle empêche la formation de filament d'actine et modifie ainsi fortement la rhéologie observée [77]. Dans la cellule, elle provoque une destruction du cytosquelette d'actine. Cet effet est complètement réversible pour des cellules [90, 91].

Des résultats sur différents types de cellules permettent de comprendre l'effet de ce traitement sur la rhéologie de la cellule. Une expérience de déformation de monocytes dans un microcanal montre que le temps d'entrée des cellules dans la conduite dépend fortement du traitement appliqué [36]. En revanche, partant d'une déformation de 50%, le temps de relaxation de la forme ne dépend pas du traitement appliqué. Un test d'électrodéformation sur des protoplastes indique cependant que, pour une déformation initiale de 15%, le temps de relaxation pour les cellules traitées est plus long que pour les cellules normales [109]. Des images en microscopie de fluorescence montrent des cellules normales et traitées. On observe que la forte présence d'actine corticale dans les cellules normales a disparu après traitement.

Il apparaît donc que la déformabilité des cellules est affectée par le traitement à la latrunculine A, qui la rend plus facile à déformer. L'effet semble cependant

dépendre de l'amplitude de la déformation.

10.2.2 Renforcement des filaments d'actine

La jasplakinolide est une toxine provenant d'une éponge marine, Jaspis Johnstonis [17]. Elle induit une polymérisation réversible de l'actine en baissant le seuil de nucléation [18]. La polymérisation excessive n'engendre cependant pas forcément d'augmentation de la quantité d'actine filamenteuse *in vivo*. La toxine semble en effet engendrer la polymérisation de masses désordonnées d'actine globulaire, ce qui paradoxalement détruit les filaments d'actine filamenteuse.

Il existe cependant un effet sur la rhéologie des cellules. La déformation de monocytes a aussi été effectuée sur des monocytes traitées à la jasplakinolide. On observe une augmentation significative du temps d'entrée des cellules dans le canal [36]. Le temps de relaxation de la cellule, à partir d'une déformation de 50%, est aussi indépendant du traitement. Ce résultat est cette fois corrélé par les résultats d'électrodéformation sur les protoplastes, qui ne montrent aucune différence de temps de relaxation entre les cellules normales et les cellules traitées à la jasplakinolide [109].

Le traitement à la jasplakinolide augmente donc la résistance à la déformation des cellules, sans toutefois changer leur capacité à reprendre leur forme.

Chapitre 11

Matériels et Méthodes

11.1 Microfluidique

11.1.1 Conception des réseaux

Le dessin des canaux est réalisé au laboratoire à l'aide du logiciel Clewin (Clewin Layout Software, Wieweb Inc.).

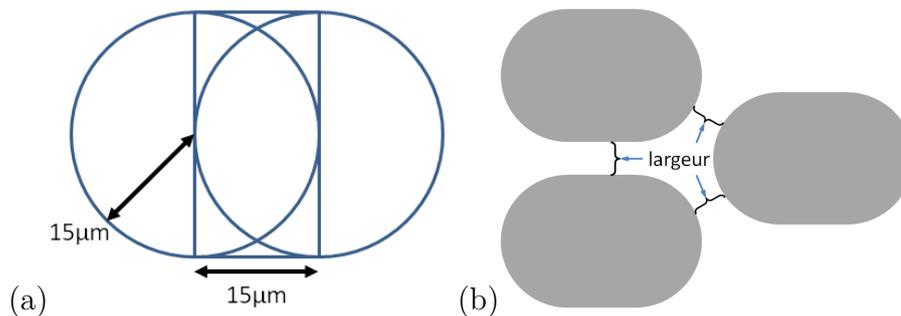


FIGURE 11.1 – (a) Schéma de la composition d'un plot : 2 cercles de $15\mu\text{m}$ de rayon reliés par un rectangle de $15 \times 30\mu\text{m}$. (b) Illustration de l'organisation des plots en quinconce.

Les réseaux de canaux sont constitués par la disposition de plots en quinconce, à égale distance les uns des autres. Les plots sont formés par deux cercles de $15\mu\text{m}$ de rayon, reliés entre eux par un rectangle de $15 \times 30\mu\text{m}$ (Fig. 11.1a). Entre deux plots adjacents, on a une partie droite, un canal, de dimension égale à la longueur moyenne de capillaires dans les poumons humains. C'est aussi cette valeur qui a déterminé le rayon de courbure des plots. Le diamètre moyen des capillaires pulmonaires étant de $7.5\mu\text{m}$, nous avons réalisé des réseaux avec des espacements de $7.5\mu\text{m}$ et $10\mu\text{m}$. Le nombre de plots, et donc de canaux, a été ajusté pour que le dispositif ait une largeur de $300\mu\text{m}$, ce qui correspond au champ minimal de nos caméras. L'écartement entre deux colonnes de plots est choisi pour que la petite

intersection en diagonale ait une distance minimale égale à la largeur du canal droit (Fig. 11.1b). Le nombre moyen de canaux traversés par une cellule lors du franchissement de poumons étant de 50 ([25]), nous avons aligné 50 colonnes de plots les unes à côté des autres pour créer le réseau.

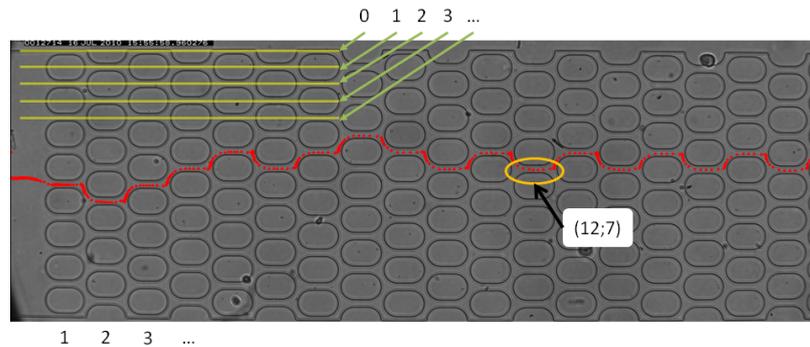


FIGURE 11.2 – Schéma définissant les numérotations des canaux horizontaux.

Les canaux sont identifiés à l'aide de deux nombres, décrivant les positions horizontale et verticale du canal (Fig. 11.2). On numérote par la suite les colonnes de gauche à droite, en commençant par le numéro 1. Pour numérotter la hauteur du canal, on utilise deux colonnes adjacentes. Pour des réseaux contenant des demi-canaux aux bords du dispositif, comme sur la figure 11.2, ces derniers portent le numéro 0. Ensuite, le canal le plus proche verticalement, qui se trouve donc sur la colonne à gauche ou à droite, porte le numéro 1, le canal suivant et situé sur la colonne du canal 0 porte le numéro 2, et ainsi de suite. Cette numérotation crée ainsi des colonnes ne comportant que des numéros pairs, et d'autres que des numéros impairs.

11.1.2 Masque en chrome

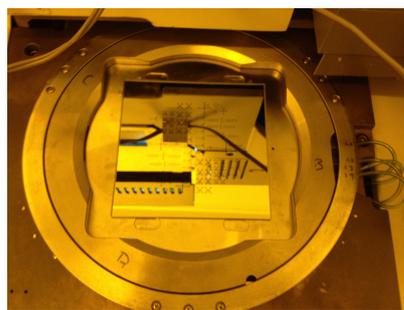


FIGURE 11.3 – Photo d'un masque en chrome, positionnée sur l'aligneur et prêt à être exposé.

Pour obtenir les dispositifs microfluidiques, nous utilisons des masques en

chrome. Contrairement aux masques sur film plastique, ils permettent d'obtenir une résolution de l'ordre de $2.5\mu\text{m}$ nécessaire à la bonne définition des motifs du réseau. La fabrication est réalisée par la centrale technologique MIMENTO, appartenant au laboratoire FEMTO-ST à Besançon. Le dessin du fichier y est reproduit en négatif par déposition d'une couche de chrome sur une plaque de quartz (Fig. 11.3).

11.1.3 Réalisation du moule

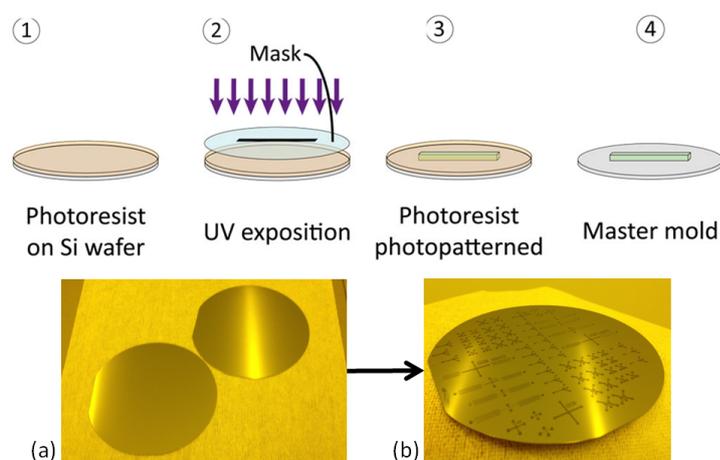


FIGURE 11.4 – 1, 2, 3 et 4 : illustrations des différentes étapes de fabrication par photolithographie douce d'un moule pour microfluidique. (a) Photo d'un wafer de silicium propre. (b) Photo des motifs de résine déposés sur le wafer.

Une fois en possession du masque, le moule préalable à la fabrication des circuits est fabriqué à Marseille, dans la salle blanche PLANETE du laboratoire Cinam. Sur une tranche de silicium nettoyée au four à plasma (Fig. 11.4, photo a), nous déposons une couche de résine photosensible (SU-8 2007, MicroChem) à la tournette. La vitesse de rotation est variée en fonction de la hauteur désirée (Fig. 11.4, étape 1). Une fois séché par dépôt sur une plaque chauffante à 95°C , la tranche est placée dans un aligneur sur lequel on fixe le masque. On insole le tout avec une lumière UV, provenant d'une lampe à Mercure (Fig. 11.4, étape 2). Seules les parties de la résine situées sous un "trou" du masque sont polymérisées (Fig. 11.4, étape 3). Après une étape de cuisson servant à accélérer et compléter le processus de polymérisation, on développe le motif créé dans un solvant approprié (SU-8 developer, MicroChem) : ne reste sur la tranche que la réplique des motifs présents sur le masque (Fig. 11.4, étape 4 et photo b).

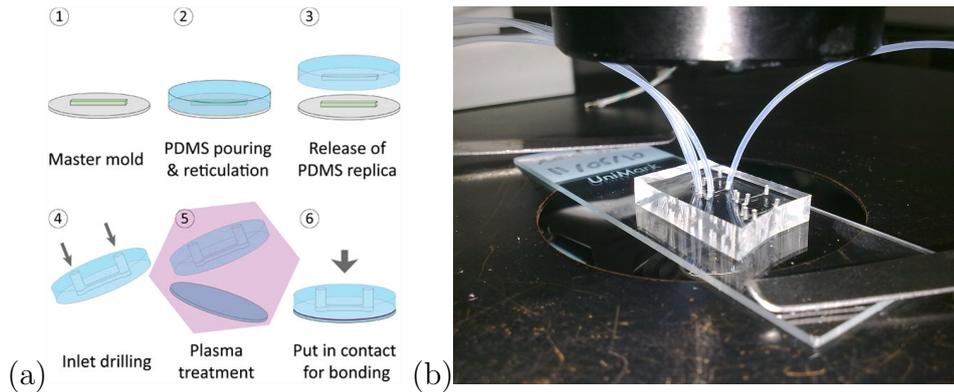


FIGURE 11.5 – (a) Etapes de fabrication des dispositifs microfluidiques. (b) Photo d'un réseau branché.

11.1.4 Réalisation du dispositif microfluidique

Les étapes sous vide sont réalisées par raccordement de pompes à vide sur des cloches en verre. Deux pompes ont été utilisées indifféremment : une pompe à huile (E2M5, Edwards) qui atteint une précision de vide de $0.25\mu\text{bar}$ et une pompe à membrane (MZ2NT, Vacuubrand) qui atteint 7mbar .

Le moule sur silicium sert d'empreinte pour les circuits (Fig. 11.5a1). Une fois fabriqué, le moule est silanisé pour empêcher l'adhésion du polymère à sa surface. Pour cela, on place le moule dans une cloche à vide avec quelques gouttes de silane (Tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl)trichlorosilane, ABCR). On fait le vide pendant deux minutes environ puis on isole la cloche de l'atmosphère extérieure afin de laisser le silane se vaporiser. L'ensemble repose pendant une heure environ. Cette étape n'est nécessaire qu'une seule fois à la première utilisation mais peut être répétée en cas de problème d'adhésion entre le moule et le polymère de PDMS.

Lorsque la silanisation est terminée, on prépare un mélange de résine polydiméthylsiloxane (PDMS sylgard, Dow Corning) et de son agent de réticulation (Curgin Agent, Sylgard, Dow Corning), dans des proportions de 10g pour 1g respectivement. Le mélange est alors placé une première fois sous vide pendant cinq minutes afin d'enlever les bulles présentes dans le mélange. Quand une majorité de bulles a disparu, on verse le liquide sur le moule silanisé et on place le tout sous vide pendant une heure minimum. Il s'agit là encore de faire éclater les bulles dans le PDMS qui pourraient gêner l'observation au microscope. Une fois l'opération réussie, on dépose l'ensemble moule et PDMS dans un four à 65°C (Fig. 11.5a2). Le PDMS est durci en une heure environ.

Les étapes suivantes sont réalisées dans une hôte anti-poussière à flux laminaire horizontale. On découpe les dispositifs à l'aide d'un scalpel et on détache les morceaux de polymère en douceur (Fig. 11.5 a3). Les orifices d'entrées sont percés (Fig. 11.5 a4) avec un poinçon de 0.75mm de diamètre (Harris Unicore).

Le nettoyage de lame de verre commence par un bain dans une solution de Decon 5%w/w placée pendant trente minutes à $50^{\circ}C$ dans une cuve à ultrason. On les rince avec des jets successifs d'eau déionisée et d'éthanol. Environ cinq cycles sont nécessaires, en commençant et en finissant toujours par l'eau. Pour finir, on place les lames de verre pendant cinq minutes dans un four à plasma à air (Plasma cleaner et Plasma Flow, Harrick Plasma) stabilisé autour de $800mTor$ et allumé en position "High". On ajoute ensuite les morceaux de PDMS (Fig. 11.5 a5) et allume le plasma pendant 1.5 minute à $800mTor$ en position "Medium". On sort alors les lames et morceaux de PDMS que l'on met en contact 2 à 2 sans appuyer. Si les étapes précédentes ont été accomplies convenablement, les deux morceaux se lient de manière irréversible (Fig. 11.5 a6). Le dispositif est prêt à être utilisé trente minutes après, le temps de laisser les surfaces se désactiver.

Un contrôle des dispositifs créés montre que les canaux sont plus larges que prévus, alors que l'espacement des plots est respecté. Il y a donc eu un défaut de développement, qui a sûrement commencé à dissoudre de la résine polymérisée en fin de processus. Ainsi, pour des canaux de $7.5\mu m$, on a obtenu *in fine* des canaux de $10.6\mu m$, $9\mu m$ ou $8.6\mu m$. Pour chaque moule créé, et donc chaque série d'expérience, les tailles des canaux ont été mesurées au microscope. La largeur des canaux sera indiquée dans les légendes des figures dans les parties à venir.

11.2 Écoulement dans les dispositifs

Deux options sont possibles pour mettre du fluide en mouvement dans des microcanaux. On peut tout d'abord imposer une différence de pression contrôlée aux bornes du dispositifs. La vitesse s'adapte alors en fonction de la résistance hydrodynamique du dispositif. L'autre possibilité, complémentaire de la première, consiste à imposer un débit, donc une vitesse d'écoulement. Dans ce cas, la force fournie par la machine et le gradient de pression à l'intérieur des canaux s'adaptent afin que cette vitesse soit toujours maintenue.

Contrôleur de pression La pression est appliquée au moyen d'un contrôleur de pression (MFCS-8C, Fluigent). Cette machine permet d'appliquer une différence de pression choisie et connue avec une précision de $\pm 0.6mb$, dans une gamme allant de 0 à $1bar$. Le contrôle se fait par un ordinateur, à l'aide d'un logiciel dédié (MFCS Controller, Fluigent) ou intégré dans un programme LabView (LabView, National Instrument)

Pousse-seringue Pour imposer un débit dans le dispositif, on utilise un pousse-seringue (Harvard Apparatus 11 Plus). Cette machine peut imposer des débits allant de $1nL.h^{-1}$ à $8mL.min^{-1}$.



FIGURE 11.6 – Photo d'un MFCS-8C ouvert.

11.3 Cellules : lignée monocyttaire THP-1

11.3.1 Culture Cellulaire

Nous utilisons pour les expériences une lignée cellulaire de monocytes, isolée en 1980 à partir d'une leucémie aiguë [103] : les THP-1 (THP-1, TIB-202, ATCC). Les stocks de cellules sont conservés dans du DMSO à -80°C . Le milieu de culture est constitué de milieu Roswell Park Memorial Institute supplémenté avec de la L-Glutamine 2mM et de l'Hepes 25mM (RPMI Medium 1640 HEPES, Gibco). On lui ajoute en plus du sérum de veau foetal (Fetal Bovine Serum, Lonza, $10\%vol$), du GlutaMax (GlutaMAX 100X, Gibco, $1\%vol$) et un mélange d'antibiotique Pénicilline/Streptomycine (Pen/strep, Gibco, concentration finale : $100U/ml$ pénicilline et $100\mu\text{g}/ml$ Streptomycine). Le repiquage est fait lorsque les cellules atteignent une concentration de 10^6mL^{-1} , en général 2 à 3 fois par semaine. On dilue alors les cellules dans du milieu de culture jusqu'à atteindre la concentration de 3.10^5mL^{-1} .

Une fois par semaine, un lavage peut être fait pour enlever les débris de cellules mortes. Dans ce cas, on centrifuge la quantité souhaitée de cellules à $400g$, on récupère le liquide surnageant et on le remplace par du milieu de culture. La concentration finale de cellules doit là aussi être de 3.10^5mL^{-1} .

Lors de leur développement normal, les cellules forment des grappes cohésives. Passé un certain stade de maturité, les grappes se détachent et les cellules prennent alors la forme de sphéroïdes grossiers, pouvant parfois montrer des projections cylindriques vers l'extérieur (pods). Une fiole de cellules congelées dure normalement 6 semaines. Au delà, les risques de dégénération cellulaire deviennent trop importants et on doit décongeler un nouvel aliquot pour redémarrer la culture à partir de nouvelles cellules.

11.3.2 Dimensions des cellules

11.3.3 Traitement avec les toxines

Pour certaines expériences, nous avons modifié le cytosquelette d'actine des cellules en les incubant dans des drogues spécifiques : la latrunculine qui inhibe la polymérisation de l'actine et la jasplakinolide qui la promeut.

Latrunculine La poudre mère (Latrunculin A, Sigma-Aldrich) est diluée dans du DMSO à une concentration de $600\mu\text{g.ml}^{-1}$ et conservée en aliquot de $5\mu\text{L}$ à -28°C . Pour une expérience, 1mL de cellules sont mélangées à un aliquot : en plus des cellules et de leur milieu, cette solution contient donc $3\mu\text{g.mL}^{-1}$ de latrunculine et $0.5\%vol$ de DMSO. Le but de ce dernier est de perméabiliser la membrane pour assurer une bonne pénétration de la toxine. Avant toute expérience, on laisse la solution incuber pendant 30min à 37°C . La latrunculine ayant un effet réversible, on effectue les expériences sans laver les cellules.

Jasplakinolide La poudre mère provient de Calbiochem, Merck Millipore. Le protocole de préparation, les concentrations et les conditions d'incubation sont identiques à ceux de la latrunculine.

11.4 Réalisation d'une expérience

11.4.1 Branchement des tuyaux

Pour acheminer le fluide dans les microcanaux, on branche sur chaque orifice du dispositif un tuyau de Teflon de $0.78\mu\text{m}$ de diamètre extérieur (Référence tuyaux). Ces tuyaux sont reliés aux réservoirs du contrôleur de pression ou aux seringues suivant les besoins.

Avant de brancher le dispositif microfluidique, on le place sous vide pendant environ vingt minutes. On libère ainsi le PDMS de l'air qu'il contient afin de faciliter le branchement et la mise en eau. Si une bulle venait à se trouver dans le dispositif, elle serait alors absorbée par le polymère qui n'en contient presque plus.

L'ordre de branchement des dispositifs est important, afin de ne pas avoir trop de gaz à évacuer dans les parois.

Pour les réseaux, on commence par brancher l'entrée 4. On laisse alors le temps au liquide de traverser les plots. Les entrées 1, 2 et 3 sont ensuite branchées au fur et à mesure, dès que du liquide sort de chacune.

Pour les croix, on commence par brancher le pousse-seringue, qui est le moins flexible des deux systèmes d'écoulement, dans les entrées 1 et 3. Quand le liquide

sort des entrées 2 et 4, on arrête le pousse-seringue. On peut alors brancher les deux voies du contrôleur de pression.

11.4.2 Avancée d'une cellule

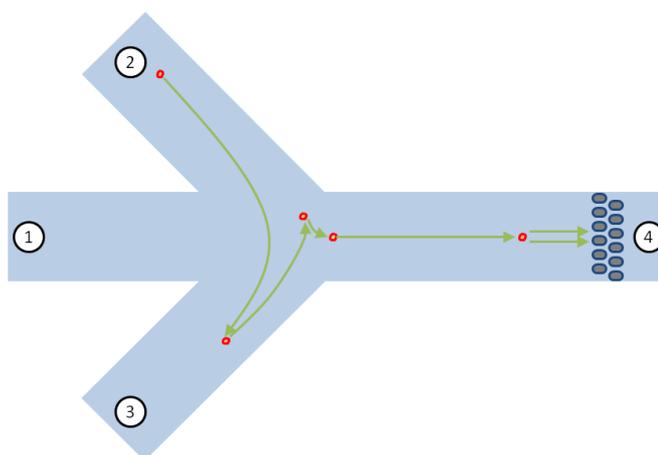


FIGURE 11.7 – Illustration du déroulement d'une expérience.

Une expérience commence tout d'abord par le choix de la cellule à utiliser. Pour cela, on fait défiler des cellules du canal 2 vers le canal 3. On désire tout d'abord une cellule qui soit isolée pour que, lors du traitement d'image, la soustraction du fond soit possible. On cherche par la même occasion une cellule qui ait un aspect raisonnablement rond et lisse. En effet, une surface ridée ou avec des blebs peut être une marque de l'activation de cette dernière.

Une fois la cellule adéquate trouvée, on amorce son passage dans le réseau en la faisant avancer dans le canal principal, jusqu'à la positionner à une distance d'environ $300\mu m$ du début des plots. On arrête alors le mouvement : toutes les pressions sont à la même valeur.

On place le champ de vision du microscope sur la zone d'intérêt (début ou fin des plots), on lance l'enregistrement du film et on applique finalement une différence de pression choisie entre la gauche du dispositif (dans les canaux 1, 2 et 3) et la droite du dispositif (le canal 4). L'enregistrement est arrêté une fois que la cellule a traversé le champ de la caméra.

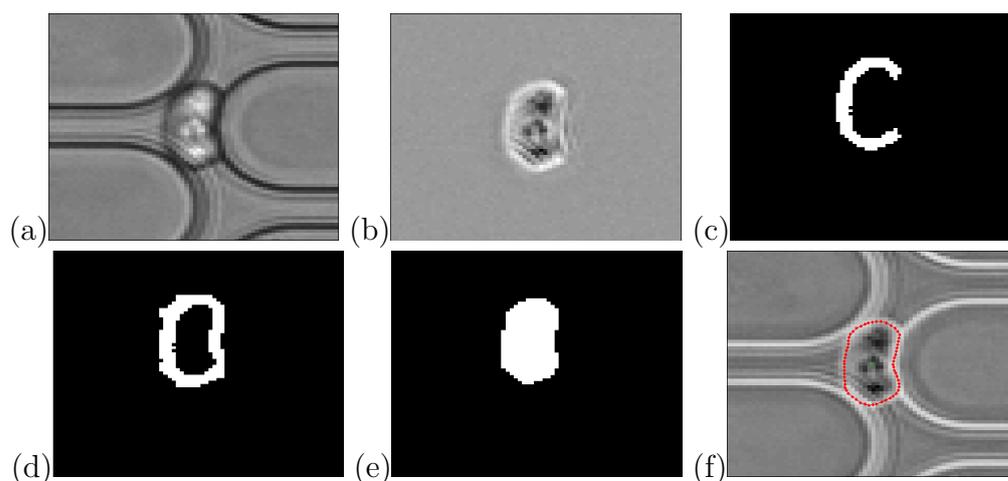


FIGURE 11.8 – Image décrivant les étapes du traitement d'image propre aux expériences de THP-1 dans les réseaux.

11.5 Analyse des images

11.5.1 Traitement

A l'issue d'une expérience, on obtient un film (Fig. 11.8a) que l'on peut analyser à l'aide de la routine Matlab. Plusieurs étapes sont nécessaires pour détecter automatiquement la cellule.

On commence tout d'abord par soustraire le fond de chaque image du film. On choisit en général la première ou la dernière image du film. Plus généralement, on recherche une image du réseau sans cellules. La soustraction sert à retirer l'image des plots et à augmenter le contraste de la cellule (Fig. 11.8b).

Sur cette image, on cherche alors la position du maximum de luminosité qui correspondra à un point de la cellule. On peut alors couper l'image pour n'avoir à analyser qu'une petite zone de l'image.

Vient alors l'étape de seuillage, que l'on choisit en général égal à $1/5$ ou $1/10$ de la valeur du maximum de luminosité de l'image. Les pixels plus lumineux que le seuil sont mis égaux à 1. Les autres sont fixés à zéro. L'image est alors binaire (Fig. 11.8c).

Lorsque l'on cherche une cellule en contact avec les plots, la soustraction fait souvent disparaître les points de contact entre la cellule et les plots. Pour pouvoir les déterminer, on utilise alors l'image du fond, découpée au plus proche des points de cellules trouvées auparavant. Le seuillage de cette image trouvera des lignes de points, correspondant au bord des plots.

En sommant les points des plots avec les points de cellule, on obtient une forme fermée contenant la cellule (Fig. 11.8d). Pour affiner la sélection, on applique des

transformations morphologiques de l'image permettant de lisser le profil de points (en faisant disparaître les pics) et d'affiner les lignes de points au maximum (Fig. 11.8e).

Pour finir, on améliore une dernière fois la position des points finaux du bords en calculant pour chaque pixel le barycentre d'un carré de 9 points, pondéré par la valeur de la luminosité de chaque pixel. Cela permet de tirer les points vers les zones les plus lumineuses, qui contiennent a priori la cellule.

A partir de cette forme, on peut mesurer aisément l'aire, le périmètre, la longueur et la position de la projection de la cellule dans le plan de l'écoulement (Fig. 11.8f). Une routine supplémentaire permet a posteriori de déterminer la position de chaque colonne de plots apparaissant sur l'image. Cela permet de déterminer la valeur des différentes observables temporelles au moment particulier où la cellule traverse un canal horizontal.

11.5.2 Calcul des variables

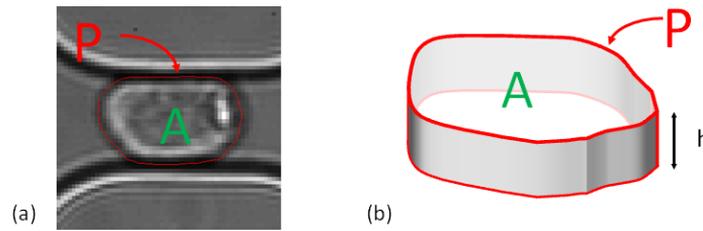


FIGURE 11.9 – (a) Image d'une cellule définissant l'aire projetée et le périmètre projeté de la cellule. (b) Schéma illustrant l'approximation faite sur la forme de la cellule.

La traitement d'une image fournit la valeur de l'aire projetée sur la plan xOy de la cellule A ainsi que de son périmètre P . Pour calculer le volume ou la surface de la cellule, nous supposons que sa forme dans les canaux est proche d'un pavé, schématisé sur la figure 11.9. Nous calculons alors les valeurs suivantes :

- Volume de la cellule : $V_{cell} = A.h$
- Surface de la cellule : $S_{cell} = 2.A + P.h$
- Diamètre de la cellule : $D_{cell} = 2 \left(\frac{3V_{cell}}{4\pi} \right)^{1/3}$
- Volume réduit : $V_{red} = \frac{V_{cell}}{\frac{4}{3}\pi \left(\frac{S_{cell}}{4\pi} \right)^{3/2}}$

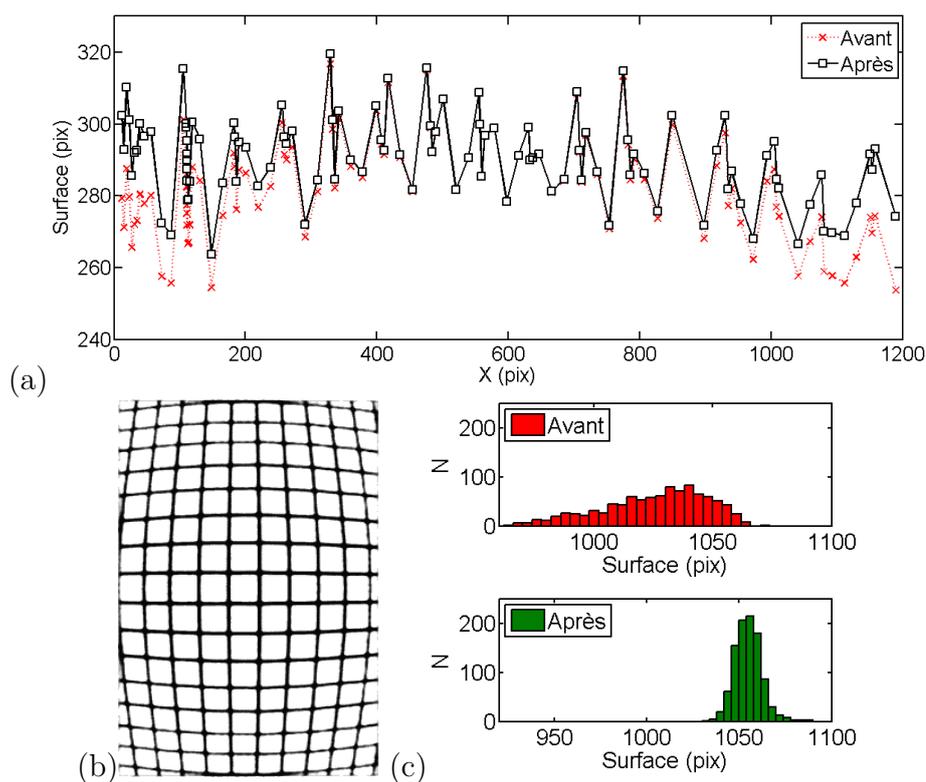


FIGURE 11.10 – (a) Exemple d’une courbe d’aire apparente d’une cellule en fonction de la position en X, avant et après correction des distorsions. (b) Illustrations d’une distorsion en barilletts. (c) Histogramme des aires mesurées avant et après correction.

11.6 Correction des Distorsions

Avec certains objectifs, on voit apparaître des distorsions en barilletts sur l’image (Fig. 11.10b). Les courbes obtenues pour la surface apparente des cellules par exemple montrent un comportement parabolique en fonction de la position dans l’image, même pour les dispositifs à grands canaux où la cellule n’est pratiquement pas déformée (courbe rouge sur la figure 11.10a).

Pour corriger ce défaut, nous utilisons un réseau de plots ronds de $15\mu m$ de rayon. Nous prenons d’abord des photos de ce réseau à différentes positions du champ de la caméra. Nous traitons ensuite ces images avec une routine d’analyse d’image Matlab pour en déduire la position, le périmètre et la surface de chacun des plots sur l’image. Nous avons alors une cartographie complète des surfaces apparentes et périmètres apparents en fonction de leur position. Sachant que tous les plots ont une taille identique par construction, nous ajustons les données sur un modèle polynomial de degré 4, dont les résultats sont montrés figure 11.11. L’inversion de ce polynôme nous permet d’obtenir une matrice de correction des aberrations. Il en existe une par type de donnée, par objectif et par caméra.

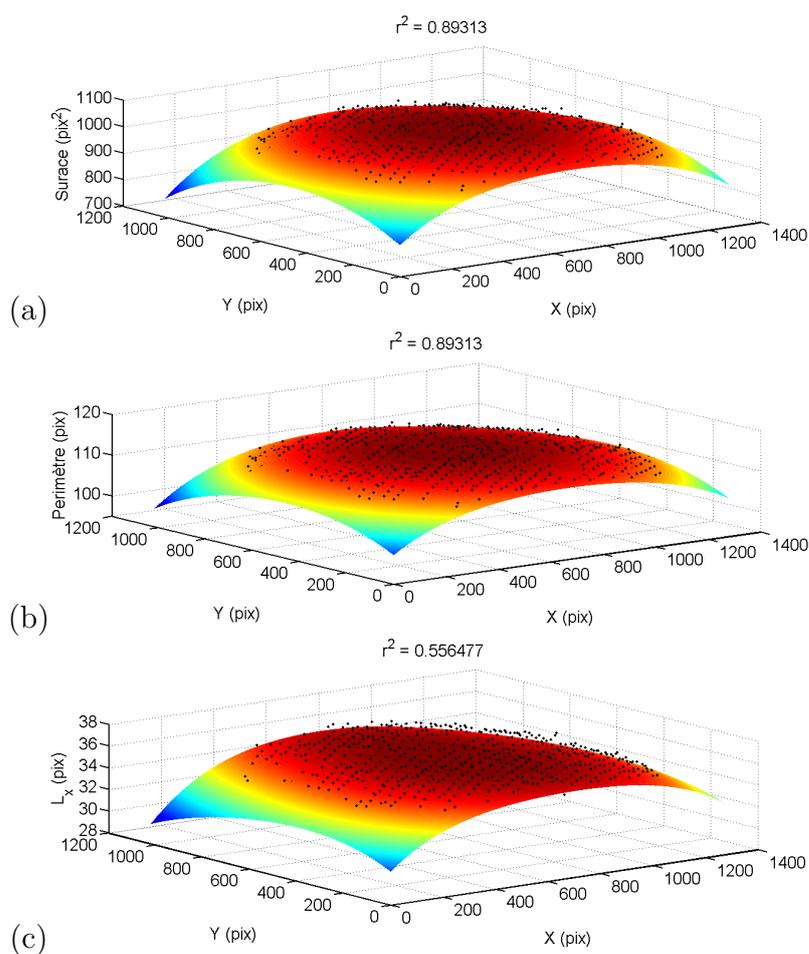


FIGURE 11.11 – Données et ajustements du modèle pour différentes variables : (a) ● : Aire apparente des plots ronds en fonction de leur position X et Y dans le champ d’observation. (b) ● : Périmètre des plots ronds en fonction de leur position X et Y dans le champ d’observation. (c) ● : Longueurs horizontales des plots ronds en fonction de leur position X et Y dans le champ d’observation. Les surfaces sont des polynômes d’ordre 4 à deux dimensions ajustés sur les points expérimentaux.

Après correction, on peut voir que la courbe de l’aire apparente est redressée à ses extrémités mais pas en son centre. De plus, l’histogramme des surfaces est considérablement resserré après l’opération (Fig. 11.10c).

La détermination est et doit être réalisée indépendamment des expériences sur les cellules. Cela nous assure que la correction des courbes ne tiendra compte que de l’effet géométrique et pas des éventuels changements de forme des cellules lors de leur transport.

Chapitre 12

Calibration des réseaux

Les réseaux forment une structure complexe, composée de multiples résistances hydrodynamiques en série et en parallèle. Afin de mieux comprendre le comportement de l'écoulement et de déterminer ses caractéristiques principales, nous avons réalisé plusieurs opérations d'étalonnage du dispositif.

Dans ce chapitre, nous présentons tout d'abord les résultats de l'étalonnage des circuits microfluidiques, réalisé par simulations numériques ainsi que par mesures de résistance hydrodynamique réalisées. Nous étudions ensuite le mouvement d'objets modèles dans les réseaux. Pour finir, nous observons les caractéristiques du mouvement de cellules à travers les réseaux.

12.1 Étalonnage de l'écoulement

Avant de réaliser des expériences de passage de cellules à travers les réseaux, il est important de bien connaître le comportement du fluide lors de son écoulement et les caractéristiques du dispositif. Pour cela, nous réalisons des simulations numériques qui permettent d'observer précisément les paramètres de l'écoulement. Nous voyons ensuite comment la mesure de la résistance hydrodynamique du dispositif permet de caractériser le réseau et de calculer la vitesse moyenne du fluide à l'intérieur des canaux.

12.1.1 Simulation avec Comsol

Pour connaître la forme de l'écoulement à l'intérieur des plots, nous utilisons le logiciel de simulation Comsol avec lequel nous reproduisons les réseaux de plots utilisés. La validité des approximations de Hele-Shaw est testée avec une simulation en trois dimensions qui donne des résultats similaires aux simulations en deux dimensions. On considère donc que la hauteur est faible devant les autres dimensions

du circuit et que l'écoulement ne dépend pas de la variable z . L'étude du système est donc réalisée avec des simulations en deux dimensions, moins gourmande en temps de calcul.

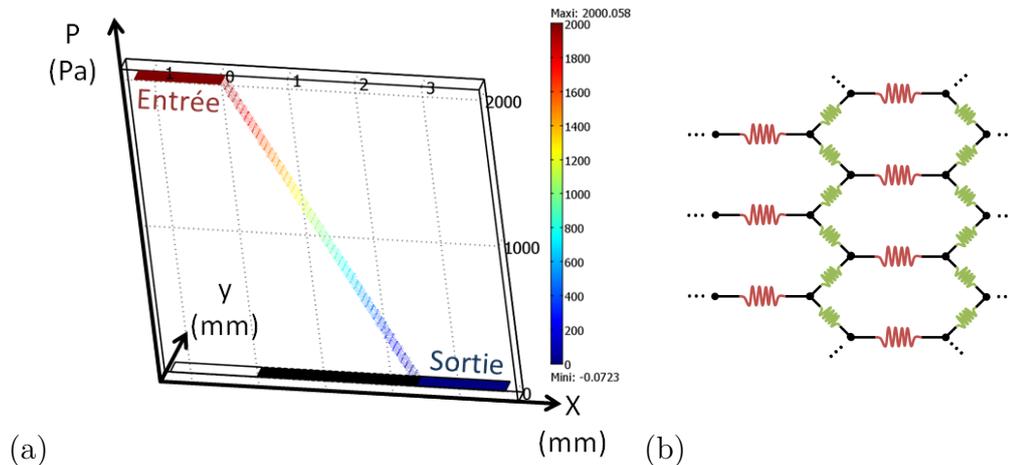


FIGURE 12.1 – (a) Représentation en 3 dimensions de la pression dans les canaux. On a appliqué une différence de pression de 2 000 Pa entre l'entrée (en haut à gauche) et la sortie (en bas à droite). Le code couleur représente lui aussi la pression. (b) Schéma équivalent du réseau. Les lignes rouges représentent les résistances des canaux droits. Les lignes vertes représentent les résistances des canaux diagonaux.

Pression La figure 12.1a montre le champ de pression calculé pour une dépression totale de 2000 Pa pour chaque point du dispositif. La représentation 3D permet d'observer la décroissance linéaire de la pression entre le début et la fin des plots. Le réseau est, en effet, constitué de 50 colonnes de plots successives, soit 50 résistances hydrodynamiques identiques en série. La chute de pression est identique aux bornes de chaque colonne, la décroissance globale est donc linéaire.

Nous remarquons, de plus, que la pression ne varie pas selon l'axe Oy . En effet, chaque colonne est constituée de résistances hydrodynamiques (les canaux) identiques, placées en parallèle. La chute de pression aux bornes de chaque canal est donc identique.

Le réseau de microcanaux se comporte ainsi comme un réseau de résistances hydrodynamiques représenté sur la figure 12.1b. Il est composé de deux types de résistances, représentant les canaux droits et diagonaux, et agencées en forme de nid d'abeille. Sa maille élémentaire est constituée d'une résistance de canal droit et d'une bifurcation contenant deux résistances de canaux diagonaux. La différence de pression aux bornes des mailles est identique tout au long du réseau, créant ainsi le profil linéaire de la chute de pression.

Vitesse Pour avoir une représentation plus détaillée de l'écoulement, nous traçons sur la figure 12.2 les valeurs du module de la vitesse en chaque point de la

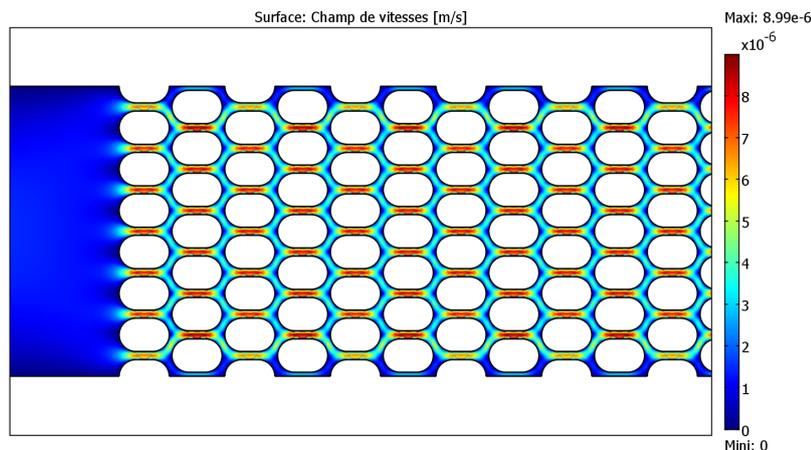


FIGURE 12.2 – Représentation du module de la vitesse de l'écoulement dans le dispositif.

zone sélectionnée. Les valeurs de la vitesse sont périodiques et prennent la même valeur dans chaque maille du réseau. Des effets de bord apparaissent en haut et en bas, mais ne s'étendent que sur deux lignes de canaux. Dans les demi canaux sur les bords (ligne 0), la vitesse de l'écoulement est très faible, similaire à celle observée dans le grand canal à gauche du réseau. Dans la ligne 1, la vitesse est inférieure à ce qui est observé dans les lignes centrales car les canaux droits ne sont alimentés que par un seul canal diagonal. Inversement, la vitesse dans la ligne 2 est plus élevée que pour les autres canaux. En effet, comme l'écoulement dans la ligne 0 est faible, une grande majorité du fluide passant dans un canal de la ligne 1 continue dans le canal adjacent de la ligne 2, où entre aussi la moitié de celui de la ligne 3. Le débit est alors plus important, ce qui nécessite une vitesse d'écoulement plus grande.

Hormis les lignes de canaux proches des bords, les vitesses de l'écoulement dans les canaux et à chaque vitesse sont identiques d'une maille du réseau à une autre.

Ligne de Courant La figure 12.3 montre les lignes de courant de l'écoulement. L'écoulement étant stationnaire, chaque ligne de courant représente la trajectoire d'une particule fluide [42]. On n'observe aucun vortex sur l'image. L'écoulement est donc bien laminaire.

A leur entrée dans le réseau, les particules de fluide adoptent un mouvement en zig-zag : elles traversent le réseau en passant alternativement par les canaux de deux lignes voisines. Ainsi, si une particule de fluide entre par la ligne 3 et tourne ensuite vers la ligne 4, elle alternera tout le long de son transport entre ces deux niveaux de canaux. Cette propriété est due à l'impossibilité pour deux lignes de courant d'un écoulement stationnaire de se croiser. Il existe alors une séparation au centre de chaque canal droit : les particules appartenant à la moitié haute

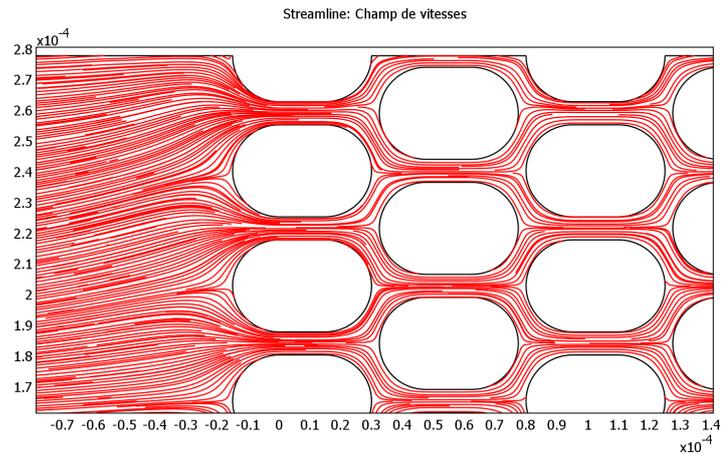


FIGURE 12.3 – Ligne de courant dans le dispositif.

poursuivent leur mouvement vers la ligne supérieure, les particules appartenant à la moitié inférieure faisant l'inverse.

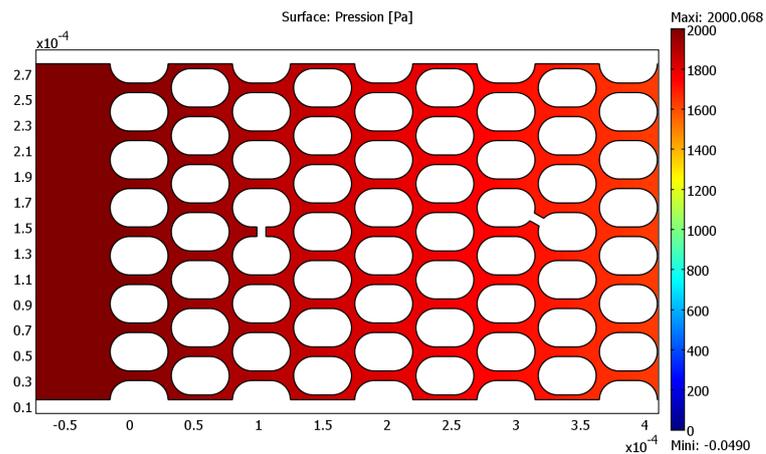


FIGURE 12.4 – Représentation de la pression dans le dispositif. Deux des canaux ont été coupés pour représenter une cellule en train de circuler.

Pression agissant sur les cellules Lorsqu'une cellule traverse le dispositif, elle occupe pratiquement toute la section disponible, à l'exception de petites gouttières situées vers les arêtes. Ainsi, pour simuler la présence d'un THP-1 et observer la pression qui s'applique à ses bornes, nous coupons un canal et nous calculons l'écoulement correspondant.

La figure 12.4 représente la pression dans le dispositif. Dans la troisième colonne, le canal horizontal de la ligne 7 est coupé. De même, nous fermons le canal

en diagonale allant de la ligne 7 à la ligne 6, entre les colonnes 8 et 9. La répartition de la pression est peu modifiée par ces deux coupures. Le passage d'une cellule ne perturbe donc pas fortement l'écoulement dans le réseau. La pression ressentie lors de la traversée du réseau sera donc périodique, se répétant d'une maille à une autre.

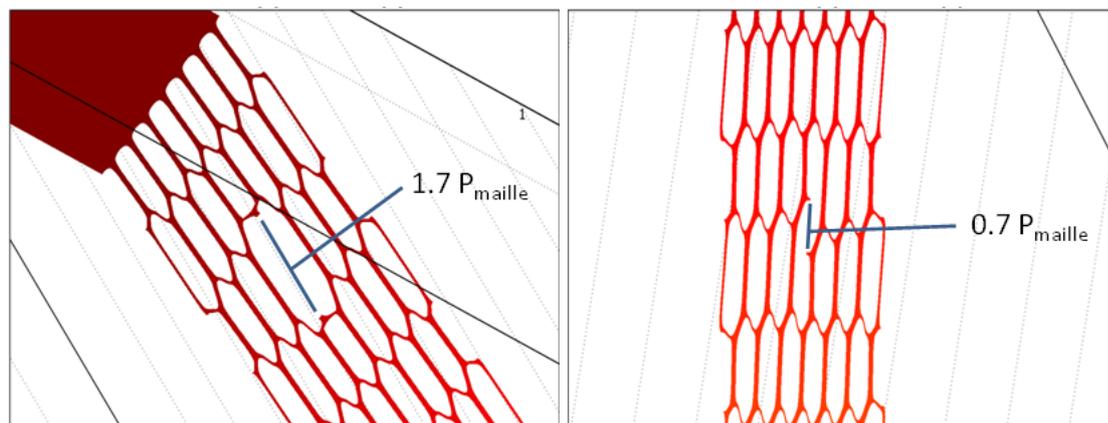


FIGURE 12.5 – Représentation en 3 dimensions de la pression dans le dispositif avec des canaux coupés. Différence de pression totale : 2 kPa. Gauche : Agrandissement autour du canal horizontal coupé. La chute de pression entre le début et la fin de la coupure est de 68.41 Pa. Droite : Agrandissement autour du canal diagonal coupé. La chute de pression entre le début et la fin de la coupure est de 28.82 Pa.

La figure 12.5 fournit une observation plus précise de la pression dans le dispositif. Chaque graphique montre un agrandissement autour d'une zone coupée. Pour déterminer la chute de pression aux bornes d'une cellule, nous mesurons la pression dans l'écoulement à l'avant et à l'arrière de chaque coupure. Nous trouvons ainsi une chute de 68.4 Pa pour le canal droit et 28.8 Pa pour le canal diagonal.

En imposant une pression de 2000 Pa à une série de 50 colonnes en série, il s'applique une chute de pression caractéristique par maille de $P_{maille} = 2000/50 = 40 Pa$. Pour le canal horizontal (Fig. 12.5Gauche), la chute de pression de 68.41 Pa correspond à $1.7 \times P_{maille}$. Elle est supérieure à ΔP_{maille} car, en fermant un canal droit, on coupe aussi l'accès aux quatre canaux diagonaux qui y sont connectés. La différence de pression observée correspond ainsi à une zone de taille supérieure à la maille. Pour le canal en diagonale (Fig. 12.5Droite), 28.82 Pa correspond à $0.7 \times P_{maille}$. Ces rapports de proportionnalité avec P_{maille} sont valables pour différentes pressions totales mais aussi pour les autres largeurs de canaux utilisées. Ainsi, la dépression s'appliquant aux bornes d'une cellule dans un réseau contenant 50 séries de canaux s'expriment :

$$\text{Canal droit : } \Delta P_{cell,droit} = 1.7 \frac{\Delta P_{tot}}{50} \quad (12.1)$$

$$\text{Canal diagonal : } \Delta P_{cell,diag} = 0.7 \frac{\Delta P_{tot}}{50} \quad (12.2)$$

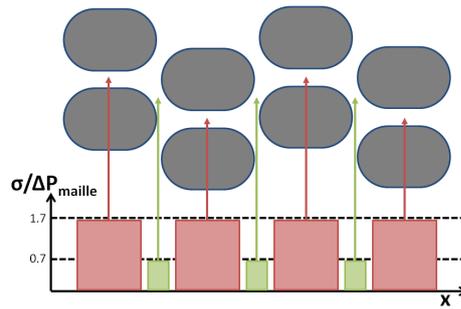


FIGURE 12.6 – Illustration de la pression ressentie par une cellule lors de son transport dans le réseau. Le graphique représente la contrainte ressentie par la cellule divisée par la pression par maille en fonction de la position horizontale dans le réseau.

Nous pouvons alors représenter la pression ressentie par la cellule lors de son voyage dans le réseau (Fig. 12.6). La contrainte sera alternative avec une fréquence dépendant de la vitesse avec laquelle une cellule traverse chaque maille.

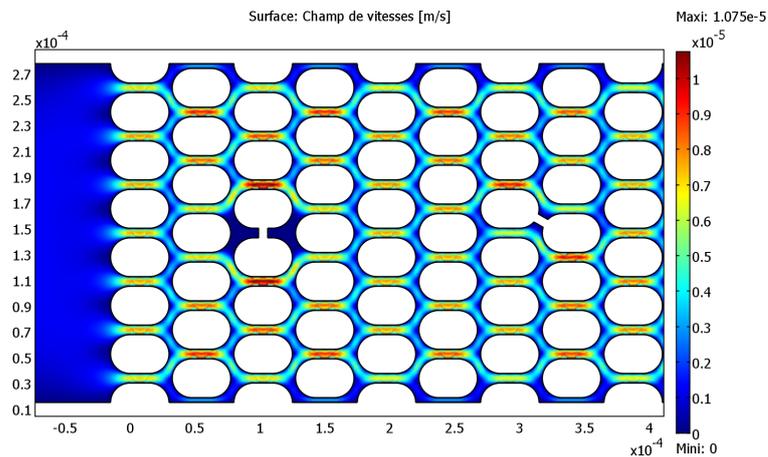


FIGURE 12.7 – Représentation du module de la vitesse de l'écoulement dans le dispositif. Deux des canaux ont été coupés pour représenter une cellule en train de circuler.

Vitesse du fluide autour de la cellule La figure 12.7 représente le champ de vitesse dans le réseau lorsque deux des canaux sont coupés. Des variations des valeurs de vitesse dans les canaux existent dans le voisinage proche des coupures, sur une échelle d'un canal. La coupure du canal (4;3) perturbe ainsi les canaux (3;3), (3;5), (4;2), (4;4), (5;3), et (5;5). Un effet similaire existe pour la coupure du canal diagonal.

La variation des vitesses dans les canaux est due aux transferts de débits qui appauvrissent ou enrichissent les canaux adjacents. La faible dimension de la perturbation indique que le passage d'une cellule n'affecte l'écoulement que localement. Le reste du dispositif conserve un flux normal.

12.1.2 Mesure de la résistance hydrodynamique

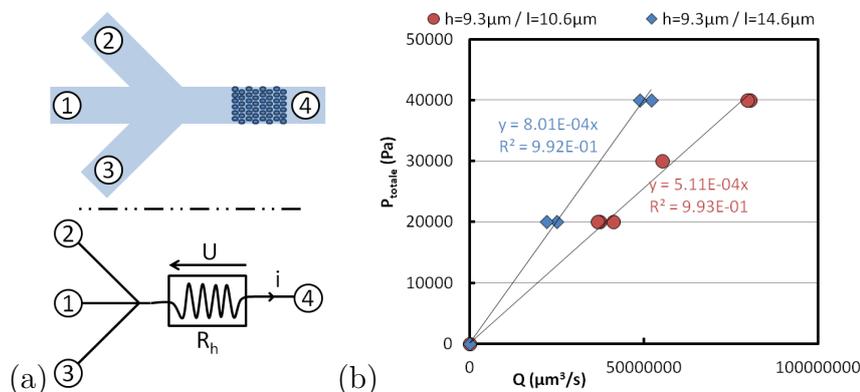


FIGURE 12.8 – (a) Schéma montrant l'analogie entre le système microfluidique et un système électrique équivalent. (b) Pression appliquée en fonction du débit mesuré. Les lignes noires sont l'ajustement d'une droite affine aux données expérimentales. La pente de ces droites est la résistance hydrodynamique des réseaux.

L'écoulement dans le système est laminaire et suit la loi de Stokes. Il existe donc une résistance hydrodynamique du dispositif qui satisfait la relation 2.3. Les quatre gros canaux d'alimentation du réseau de plots ont des dimensions bien plus importantes que les petits canaux internes. Comme le montre la figure 12.1, la chute de pression dans le système est presque complètement située dans le réseau : il n'y a presque aucune baisse de pression sur les segments en amont et en aval du réseau. Le réseau est équivalent à une grosse résistance électrique R_H aux bornes de laquelle seraient branchés quatre fils électriques de résistance négligeable (Fig. 12.8a).

Pour mesurer la résistance hydrodynamique du dispositif, nous appliquons une différence de pression constante entre la gauche (entrée 1, 2 et 3) et la droite (sortie 4) pendant 30 minutes environ, et nous mesurons à l'aide d'une balance de précision la quantité de matière qui a été transférée. Connaissant la masse volumique du fluide utilisé, en l'occurrence de l'eau dé-ionisée, nous pouvons calculer le débit volumique lors de l'expérience et ainsi déterminer R_H .

La figure 12.8b montre les pressions appliquées en fonction des débits mesurés pour deux largeurs de canaux. Chaque série de points est disposée de manière linéaire. La résistance hydrodynamique du réseau est constante dans cette gamme de pression et égale, pour chacune des séries de points, à la pente de la droite. Nous mesurons ainsi $R_h = 0.81\text{mPa}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{m}^{-3}$ pour les dispositifs de petite largeur, et $R_h = 0.51\text{mPa}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{m}^{-3}$ pour les canaux de grande largeur. Ce sont bien les canaux les plus larges qui ont la résistance la plus faible.

Le débit volumique de fluide s'exprime comme $Q = \Sigma(x) \cdot \langle V_{fluide} \rangle$, où $\Sigma(x)$ est la section effective du dispositif à la position x et $\langle V_{fluide} \rangle$ est la vitesse moyenne du fluide en x . En insérant l'expression du débit dans la formule 2.3, nous déterminons

l'expression de la vitesse du fluide dans le réseau :

$$\langle V_{\text{fluide}} \rangle(x) = \frac{\Delta P}{R_H \Sigma(x)} \quad (12.3)$$

Grâce à la valeur de R_H , nous pouvons calculer la vitesse du fluide dans les canaux pour n'importe quelle pression appliquée. La valeur déterminée dépend de l'endroit, et donc de la section, que nous choisissons : à débit constant, plus la section est large, plus la vitesse du fluide est faible. La vitesse maximale du fluide est déterminée au centre des canaux droits, à l'endroit où $\Sigma(x)$ est le plus petit.

12.2 Passage d'objets modèles

Après avoir étudié les caractéristiques physiques de l'écoulement dans le réseau en interprétant son comportement par un réseau complexe de résistances hydrodynamiques et en mesurant la résistance hydrodynamique globale, nous cherchons à pousser encore plus loin la compréhension du système en y faisant circuler des objets modèles. L'objectif est d'observer des comportements qui nous serviront de repère pour comprendre le mouvement des cellules.

Nous nous intéressons tout d'abord au mouvement de microbilles de polystyrène rigide circulant entre les plots. Nous observons ensuite le comportement de vésicules visqueuses. Pour finir, nous évoquons le cas de billes de gels élastiques.

12.2.1 Microbilles de polystyrène rigides

Ces expériences sont réalisées sur un réseau de plots ronds, constitués de cercles de $15\mu m$ de rayon espacés d'une distance de $7.5\mu m$ ou $10\mu m$. Des microbilles de polystyrène (Polybead Microspheres, PolySciences Inc) sont suspendues dans une solution de PBS-BSA 1% et envoyées à travers le réseau avec des dépressions comprises entre 20 et $100mb$.

Trajectoire Des images de billes circulant dans le réseau sont montrées dans la figure 12.9. Les billes circulent en effectuant une alternance de virage à gauche et virage à droite. La trajectoire possède une période de deux mailles dès le premier virage. Toutes les billes à même de circuler dans le réseaux, qui sont donc plus petites que les canaux, adoptent des trajectoires similaires.

Vitesse Le graphique 12.10a montre la position sur l'axe Ox d'une bille en fonction du temps. Dès $t = 0.1s$, la progression de la bille dans le réseau est linéaire en fonction du temps. La vitesse moyenne de l'objet est constante. Le graphique 12.10 représente la composante horizontale la vitesse instantanée V_x de cette bille

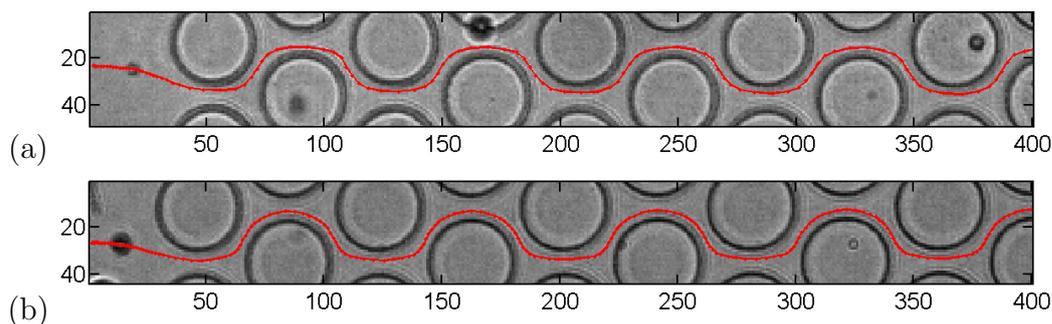


FIGURE 12.9 – Trajectoires de billes dans un dispositif de largeur $7.5\mu m$. Une image de la bille est visible sur la gauche de chaque image. (a) trajectoire d'une bille de $2\mu m$. (b) trajectoire d'une bille de $6\mu m$.

en fonction du temps. V_x est périodique et se répète toutes les $0.04s$. La période correspond au temps pour parcourir deux mailles du réseau. Dans chaque période, il existe deux maxima, à $2mm/s$ et $6mm/s$, correspondant chacun au passage d'un canal droit. La trajectoire étant alternée sur deux lignes de canaux, nous en déduisons que le passage d'une série de canaux est plus rapide que le passage de l'autre. La figure 12.10c trace les vitesses moyennes des billes en fonction de la pression appliquée aux bornes du réseau, pour deux diamètres de billes. Les points sont situés sur une droite, ce qui indique que la vitesse des billes est proportionnelle à la pression appliquée.

Influence de la position des billes La présence des deux maxima de la vitesse et la périodicité sur deux mailles du mouvement s'explique en étudiant la position de la bille dans le réseau.

Considérons une bille entrant dans le réseau au centre du canal comme sur la figure 12.11a. La traversée du premier canal, dans la colonne 1, est très rapide. La bille continuera ensuite sa route et touche le plot de la seconde colonne. Pour traverser la deuxième colonne, la bille doit rouler sur le plot. Elle adopte alors une vitesse plus faible que lors de la traversée de la colonne 1. Elle reste ensuite en contact avec le plot jusqu'à atteindre le milieu du plot pour finalement se détacher et poursuivre son chemin à travers la troisième colonne de plots. La vitesse dans la colonne 3 est identique à la colonne 1. Une dynamique similaire, décalée d'une maille, est observée si la bille commence son mouvement en touchant le plot de la colonne 1.

La dynamique du mouvement dépend donc de la position y à laquelle la bille entre dans le réseau. Nous mesurons donc pour chaque cellule sa position d'entrée dans le réseau Y_{bille} définie sur la figure 12.11b. Nous avons vu à la section précédente que les lignes de courant de l'écoulement sont laminares et ne se croisent donc jamais. Il existe alors une correspondance univoque entre la position d'arrivée devant le réseau Y_{bille} et la position Y_{canal} de chaque bille dans les canaux de la

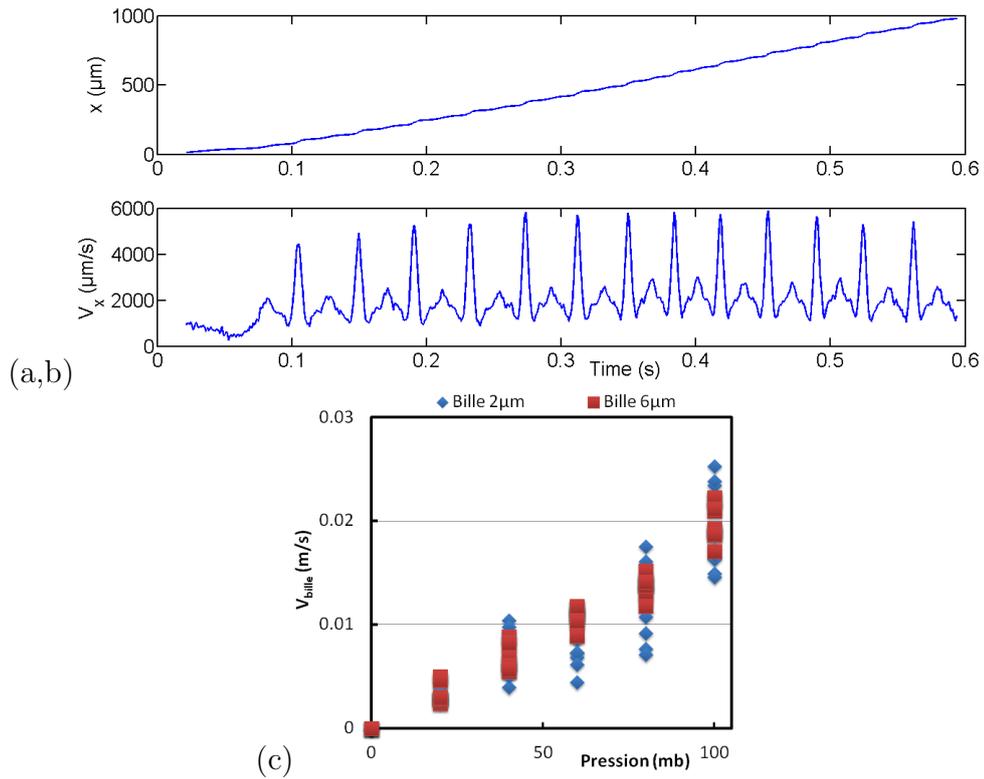


FIGURE 12.10 – (a) Position d’une bille de $2\mu\text{m}$ en fonction du temps. $\Delta P = 20\text{mb}$. (b) Module de la vitesse d’une bille de $2\mu\text{m}$ en fonction du temps. $\Delta P = 20\text{mb}$. (c) Vitesse moyenne des billes en fonction de la pression appliquée. Bleu : Billes de $2\mu\text{m}$ de diamètre. Rouge : Billes de $6\mu\text{m}$ de diamètre.

colonne 1. La mesure de Y_{bille} est en revanche beaucoup plus précise. Les comportements ne dépendant que de la position relative dans le canal, nous définissons une variable modulée en fonction de la distance interplot d_{plot} par

$$Y_{mod} = \frac{Y_{cellule} \pmod{d_{plot}}}{d_{plot}} \quad (12.4)$$

Comme indiqué sur la figure 12.11b, la position modulée d’un plot est toujours égale à 0, celle du centre d’un canal toujours égale à 0.5.

Nous représentons alors sur la figure 12.12 le rapport de la vitesse dans les colonnes impaires sur la vitesse dans les colonnes paires V_1/V_2 en fonction de Y_{mod} . Les points d’expériences réalisées dans différentes largeurs de canaux et à différentes pressions se regroupent sur une même courbe, pour les deux diamètres de billes. Pour les deux types de billes, les cellules arrivant à la hauteur d’un plot de la première colonne, en $Y_{mod} = 0$, ont une vitesse dans les colonnes impaires inférieure à la vitesse dans les colonnes paires : $V_1 < V_2$. L’inverse se produit pour les cellules entrant dans le réseau au centre d’un canal : $V_1 > V_2$ pour $Y_{mod} = 0.5$.

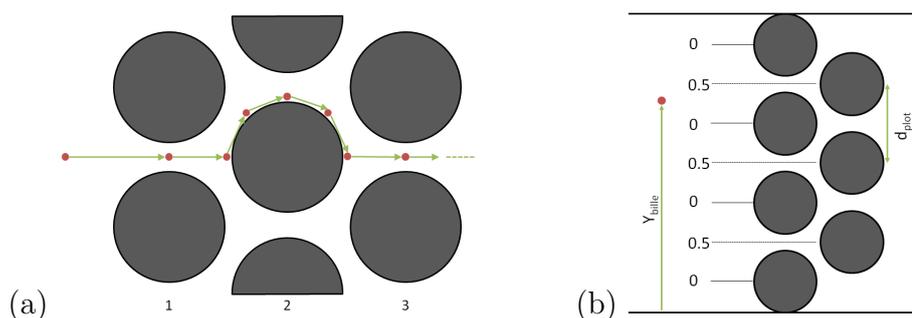


FIGURE 12.11 – A : Illustration d'une trajectoire de bille. B : Schéma définissant la position modulée dans un canal.

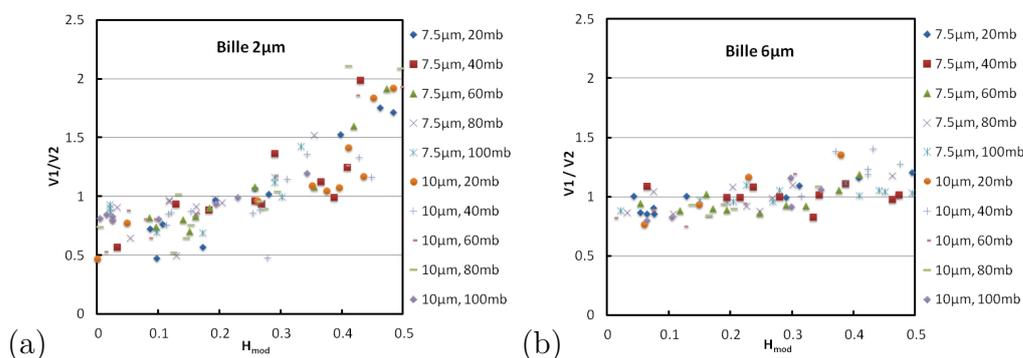


FIGURE 12.12 – Valeur du rapport $\frac{V_1}{V_2}$ en fonction de la position relative d'entrée Y_{mod} . (a) Diamètre des billes : $2\mu\text{m}$. (b) Diamètre des billes : $6\mu\text{m}$.

L'équilibre entre les vitesses $V_1 = V_2$ est atteint entre les deux, pour $Y_{\text{mod}} = 0.25$.

Une différence entre les courbes existe en fonction du diamètre des billes : les plus petites ont des écarts de vitesses plus importants que les grandes, engendrant des valeurs extrêmes de V_1/V_2 plus importantes pour les billes de $2\mu\text{m}$. Les billes de $6\mu\text{m}$ ont en effet un intervalle de positions possibles plus petit que les billes de $2\mu\text{m}$: dans un canal de $7.5\mu\text{m}$ par exemple, la position d'une bille de $2\mu\text{m}$ peut varier de $5.5\mu\text{m}$, contre $1.5\mu\text{m}$ pour une bille de $6\mu\text{m}$.

Les billes ont donc une vitesse de transport constante en moyenne et dépendant linéairement de la pression. Les variations de la vitesse instantanée en fonction de la position d'entrée Y_{mod} sont d'autant moins ressenties que la taille des billes s'approche de la taille du canal.

12.2.2 Vésicules

Après avoir observé le comportement d'objets rigides, nous nous intéressons au mouvement dans le réseau d'objets visqueux : des vésicules unilamelaires géantes. Afin de créer un excès de surface nécessaire à leur déformation dans le réseau,

les vésicules sont dégonflées grâce à une légère différence de pression osmotique appliquée lors des expériences. Ces objets étant très fragiles, nous appliquons des différences de pression plus faibles afin de ne pas rompre la membrane.

Les images particulières présentées pour les vésicules sont le résultat d'une visualisation en contraste de phase à laquelle on a soustrait l'image des plots sans vésicules.

Ce travail avec les vésicules a été réalisé au laboratoire en partenariat avec Katia Cosentino.

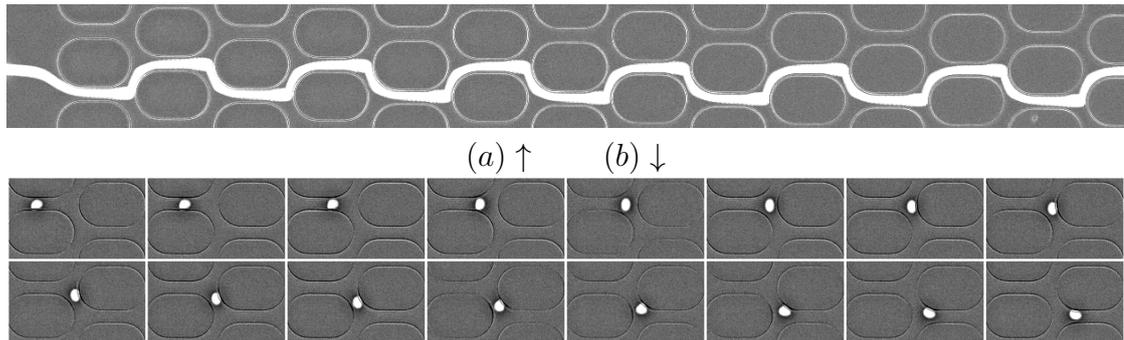


FIGURE 12.13 – a : Résultat du traitement des images d'une petite vésicule traversant le réseau. Chaque pixel est le maximum de l'intensité lumineuse observée à cet endroit au cours du film complet. Les points blancs correspondent à une position occupée par la vésicule à un moment du mouvement. Dépression aux bornes du réseau : 5mb. Durée de la traversée : 5.5s. b : Montage photo montrant le passage d'une maille du réseau par une petite vésicule. Les images se regardent de gauche à droite, de haut en bas. 0.04s entre chaque image.

Petites vésicules Les vésicules de petites tailles ont les mêmes caractéristiques de mouvement que les billes de polystyrène. Comme l'illustre la figure 12.13a, la trajectoire est régulière et périodique. La vitesse de l'objet est régulière, constante en moyenne et périodique sur une maille.

Contrairement aux billes cependant, les vésicules se déforment lors du passage d'une maille, comme le montrent les images de la figure 12.13b. La vésicule, lorsqu'elle est plaquée contre un pilier, est étirée verticalement par l'écoulement sortant dans les deux canaux diagonaux (Image n°6). Elle est ensuite étirée par l'écoulement en sortant du canal diagonal, avant d'entrer à nouveau dans le canal droit (Image n°16 et 17). La faible viscosité de ces objets nous permet ainsi d'observer la contrainte appliquée par l'écoulement à chaque instant du mouvement.

Rupture de vésicules Pour les grosses vésicules, l'entrée dans le réseau aboutit très souvent à la rupture de la membrane. La figure 12.14 montre l'explosion d'une vésicule au passage d'un canal diagonal. Son liquide interne s'écoule alors très rapidement et nous observons sur la dernière image la formation de deux vésicules filles plus petites.

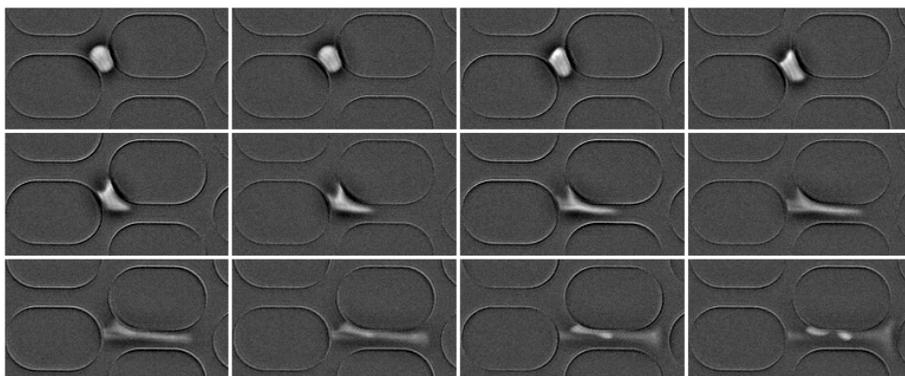


FIGURE 12.14 – Montage photo montrant la rupture d'une vésicule lors du passage d'une maille du réseau. Les images s'enchaînent de gauche à droite et de haut en bas. Dépression aux bornes du réseau : 20mb. 0.08s entre chaque image.

La rupture des vésicules apparaît dès que leur taille impose une déformation trop grande à la membrane. La bicouche lipidique est en effet très peu extensible et l'application d'une contrainte d'extension provoque très rapidement la lyse de l'objet.

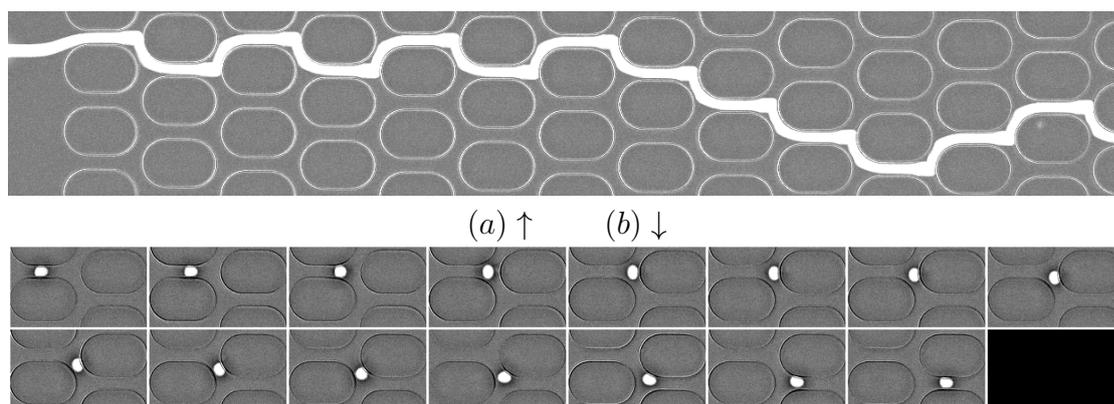


FIGURE 12.15 – a : Résultat du traitement des images d'une vésicule de taille moyenne traversant le réseau. Chaque pixel est le maximum de l'intensité lumineuse observée à cet endroit au cours du film complet. Les points blancs correspondent à une position occupée par la vésicule à un moment du mouvement. Dépression aux bornes du réseau : 5mb. Durée de la traversée : 7.5s. b : Montage photo montrant le passage d'une maille du réseau par une vésicule taille moyenne. Les images s'enchaînent de gauche à droite et de haut en bas. 0.06s entre chaque image.

Vésicules de taille équivalente au canal. Nous observons parfois des vésicules de taille comparable au canal, qui montrent une dynamique différente. La figure 12.15a montre la trajectoire d'une vésicule de taille limite. Si le début est identique à ce que l'on observe pour de petits objets, le chemin change après la 8^{ème} colonne. La vésicule ne prend alors plus que des virages à droite. L'image de la figure 12.15b

montre que la vésicule a une taille légèrement supérieure à la petite vésicule de la figure 12.13.

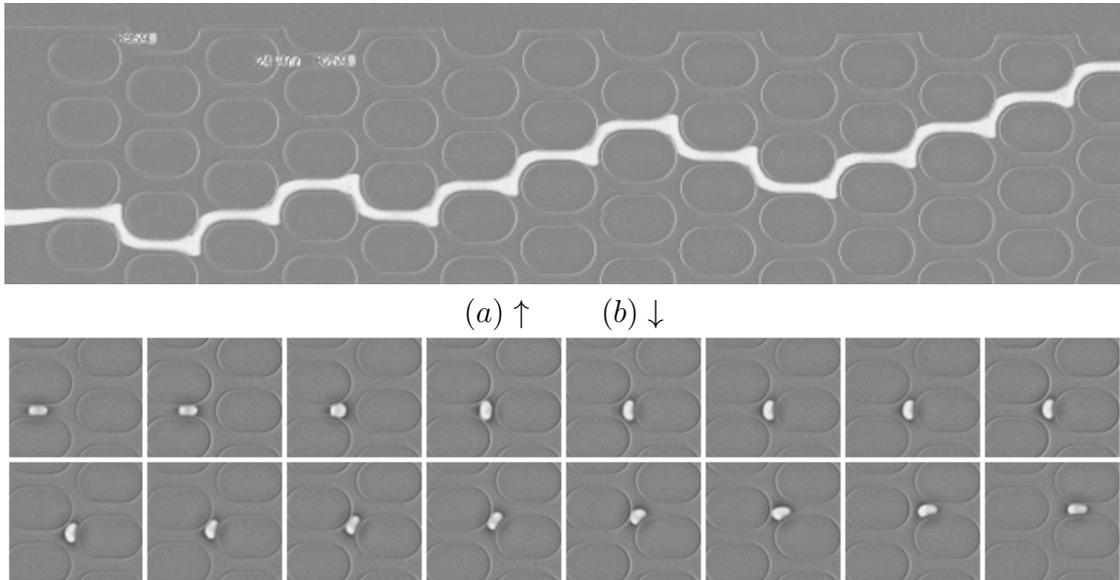


FIGURE 12.16 – Haut : Montage photographique d'une vésicule de grande taille traversant le réseau. Chaque pixel est le maximum de l'intensité lumineuse observée à cet endroit au cours du film complet. Les points blancs correspondent à une position occupée par la vésicule à un moment du mouvement. Dépression aux bornes du réseau : 5mb. Durée de la traversée : 10.5s. Bas : Montage photo montrant le passage d'une maille du réseau par une vésicule de grande taille. Les images s'enchaînent de gauche à droite et de haut en bas. 0.4s entre chaque image.

En observant une vésicule plus grande, la déstabilisation du mouvement est encore plus visible. Ainsi, la trajectoire montrée sur la figure 12.16 est complètement irrégulière : il n'y a plus aucune zone où la vésicule alterne les virages à gauche et à droite régulièrement. La figure 12.16b montre les images de la grande vésicule lors du passage d'une maille. Elle remplit bien plus le canal droit que les deux vésicules précédentes, et subit une grande déformation lors du passage de la jonction.

Discussion Il existe une grande différence de comportement des vésicules en fonction de leur taille par rapport au réseau. Les petits objets adoptent, comme les billes rigides, une trajectoire régulière, similaire aux lignes de courant de l'écoulement. Les objets de taille comparable à la taille des canaux montrent, quant à eux, un régime irrégulier, dans lequel le choix du virage à prendre semble être soumis à un processus aléatoire. Les vésicules n'ayant pas la capacité de se déformer suffisamment finissent inexorablement par exploser au passage d'un canal.

Cependant, la taille des vésicules n'est pas à proprement parler le facteur limitant du mouvement. En effet, malgré la grande différence de comportement, les vésicules des figures 12.14 et 12.16 ont des volumes assez similaires. Elles diffèrent

en réalité par leur taux de gonflement, et donc par l'aire de leur membrane. L'autre de la membrane de la vésicule au comportement irrégulier est plus grande que celle qui a été lysée, et peut donc se déformer bien plus que celle dont la membrane s'est rompue. Le paramètre important pour le mouvement est donc la déformation maximale acceptable par les vésicules. Il faut alors comparer la section efficace minimale σ_{ves} que peut adopter une vésicule par rapport à la section du canal $\sigma_{canal} = h.l$. Les mouvements réguliers concernent ainsi les vésicules telles que $\sigma_{ves} < \sigma_{canal}$, les mouvements très irréguliers les vésicules telles que $\sigma_{ves} \approx \sigma_{canal}$ et les ruptures les vésicules pour lesquelles $\sigma_{ves} > \sigma_{canal}$

12.2.3 Bille de Gel

Pour finir, après avoir étudié le mouvement d'objets visqueux dans les réseaux, nous nous intéressons au mouvement de billes de d'hydrogels de polyacrylamide élastiques. Ce travail est réalisé par Clémence Vergne, Mathilde Reyssat et Patrick Tabeling au laboratoire Microfluidique, Mems et Nanostructures de l'ESPCI, Paris.

Les billes de gels utilisées ont des tailles plus importantes que les vésicules ou les cellules, de l'ordre de $50\mu m$. Ainsi, afin d'obtenir des rapports d'aspects équivalents, un agrandissement du réseau d'un facteur 4 est utilisé. Les canaux mesurent alors $40\mu m$ de large pour $40\mu m$ de haut.

La figure 12.17 représente les trajectoires de plusieurs billes de gels lors de leur transport dans le réseau. Les films sont réalisés à différents endroits du réseau afin de pouvoir s'intéresser aux variations statistiques du comportement en fonction de la position dans le réseau.

On n'observe aucun comportement régulier périodique des billes de gels lors de leur traversée. Les seules trajectoires régulières observées ne sont que des conséquences des effets de bords du réseau.

Les billes de gels adoptent donc un comportement équivalent à celui de vésicules de taille limite par rapport au réseau. Le gel ne diffère des vésicules que par sa capacité à supporter une déformation plus importante. Il est alors plus facile d'observer un comportement irrégulier, la limite de rupture se situant à des dimensions plus importantes pour les billes de gels que pour les vésicules.

12.3 Passage de cellules

Nous connaissons dorénavant le comportement de plusieurs objets modèles, qui présentent une évolution du comportement en fonction de la dimension des objets similaires : les petits adoptent un régime régulier et périodique, les objets de taille limite montrent une trajectoire irrégulière, les grands ne peuvent pas circuler.

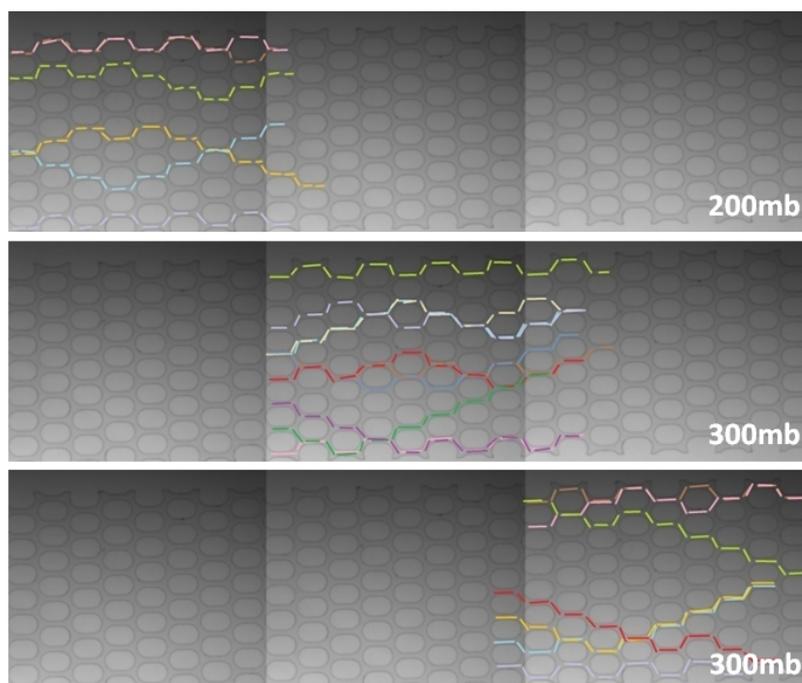


FIGURE 12.17 – Trajectoire de billes de gel dans des réseaux. Largeur des canaux : $40\mu m$. Hauteur des canaux : $40\mu m$. Les pressions appliquées aux bornes des réseaux sont indiquées sur chaque image. Illustrations réalisées et fournies par Clémence Vergne.

Forts de cet ensemble de comportements modèles, nous étudions maintenant le mouvement de cellules THP-1 dans les réseaux.

Nous présentons tout d'abord les distributions de tailles des cellules observées ainsi que leur forme avant d'entrer dans le réseau. Nous discutons ensuite les trajectoires typiques observées. Nous identifions enfin plusieurs régimes de mouvements lors de la traversée des cellules.

12.3.1 Morphologie initiales des cellules

On présente tout d'abord l'histogramme des toutes les cellules ayant traversées les réseaux en figure 12.18a. Le diamètre moyen mesuré est de $14.8\mu m$ avec une déviation standard de $1.45\mu m$ pour 510 individus. Les données sont réparties selon une distribution gaussienne, attendue pour ce genre de statistique. Aucun effet n'est observé en fonction du type des conditions expérimentales ou du traitement biochimique appliquée, ce qui nous permet d'établir pour la totalité des cellules utilisées.

Le diamètre moyen des cellules est supérieur à la hauteur des microdispositifs de $9.3\mu m$. Avant leur entrée dans les réseaux, les cellules sont donc déjà déformées et adoptent une forme similaire à celle présentée en figure 12.18b. A leur arrivée

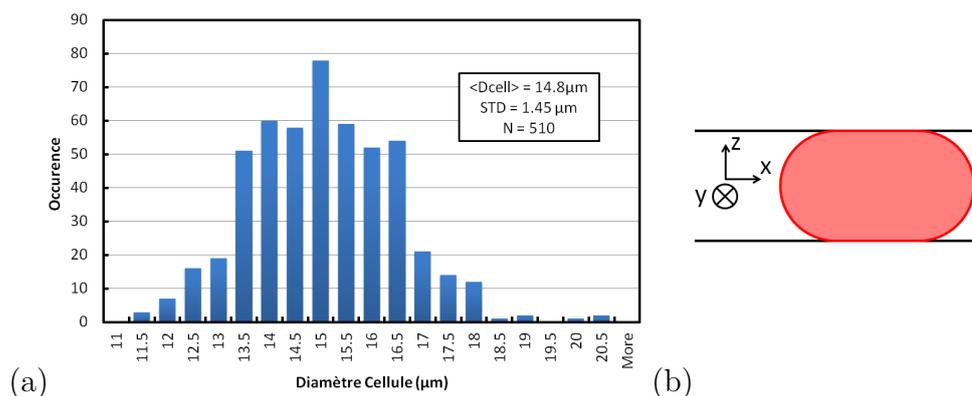


FIGURE 12.18 – a : Histogramme de la taille de toutes les cellules ayant traversées le réseau. b : Forme de la cellule dans le microdispositif avant d'entrer dans le réseau.

dans les canaux, elles sont ainsi pré-contraintes par le dispositif.

12.3.2 Trajectoires typiques

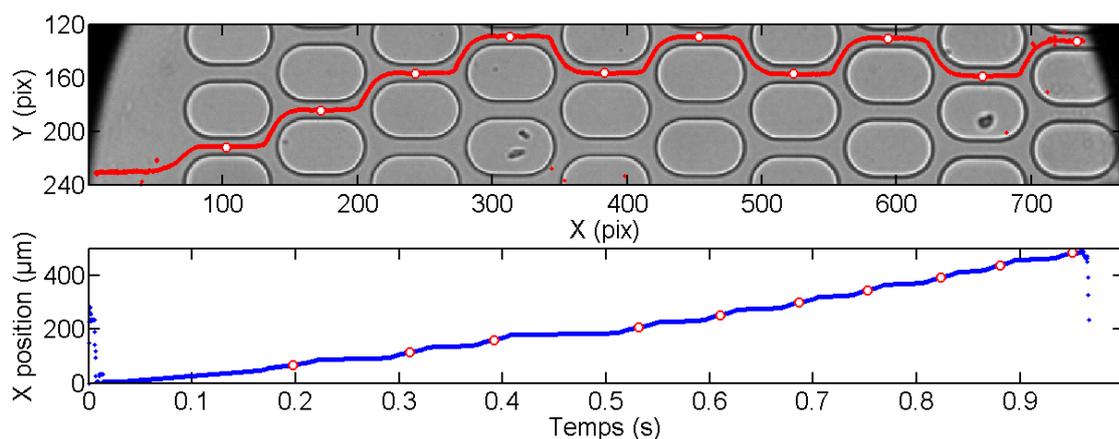


FIGURE 12.19 – Trajectoire d'une cellule de $12.4 \mu\text{m}$ de diamètre dans des petits canaux de $8.6 \mu\text{m}$ à 30mb . Haut : chemin suivi. Bas : Trajectoire horizontale en fonction du temps. Les symboles en rouge indiquent le passage par le centre d'un canal droit.

La figure 12.19Haut montre le tracé de la trajectoire d'une cellule de $12.4 \mu\text{m}$ dans le réseau, mûe par une dépression de 30mb . Le mouvement de la cellule est irrégulier lors du passage des quatre premières colonnes. Il se stabilise ensuite et montre un trajet périodique jusqu'à la fin de l'observation. La figure 12.19Bas montre l'évolution de la position x de la cellule en fonction du temps. Les ronds rouges sur la courbe indiquent les instants où la cellule traverse les canaux droits. La vitesse moyenne de la cellule devient constante à partir de $t = 0.52\text{s}$, qui correspond au temps de passage du 4^{ème} canal droit.

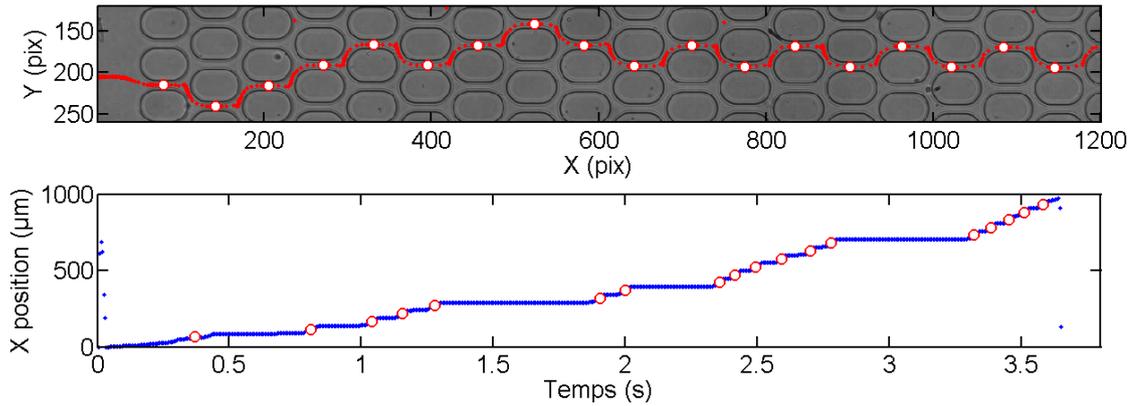


FIGURE 12.20 – Trajectoire d’une cellule de $15\mu m$ de diamètre dans des petits canaux de $10.6\mu m$ à $40mb$. Gauche : chemin suivi. Droite : Trajectoire en fonction du temps. Les symboles en rouge indiquent le passage par le centre d’un canal droit.

La figure 12.20 représente les mêmes variables que la figure 12.19 pour une autre cellule : il s’agit d’une cellule de $15\mu m$ de diamètre circulant dans des canaux de $10.6\mu m$ de large, sous une dépression de $40mb$. La trajectoire de la cellule (Fig. 12.20Haut) est d’abord irrégulière lors de la traversée des dix premières colonnes, puis se stabilise en alternant les virages à gauche et à droite sur le reste du trajet. La figure 12.20Bas indique que l’avancée de la cellule se fait à un rythme irrégulier pendant $3.3s$. Le temps nécessaire pour passer d’une maille à l’autre n’est par exemple pas constant. Il existe aussi des phases d’arrêt de la cellule, dont trois principales autour de $t = 1.5s$, $t = 2.1s$ et $t = 3s$. À partir de $t = 3.3s$, la progression se fait à un rythme régulier et la vitesse moyenne de la cellule devient constante.

Ainsi, les cellules adoptent au début de leur mouvement une trajectoire irrégulière, très similaire à ce que nous observons pour les gros objets déformables. Les deux cellules étudiées ont en effet une taille relative $D_{cell}/l = 1.4$ plus importante que celle des billes de gels ($D_{cell}/l = 1.25$) ou des vésicules ($D_{cell}/l \gtrsim 1$). Nous attendons donc un comportement similaire à celui des gros objets.

Le mouvement des cellules se stabilise toutefois après un certain temps passé dans les canaux qui varient entre les deux cellules. La première cellule stabilise ainsi sa trajectoire et sa vitesse simultanément en $0.52s$. La deuxième cellule stabilise tout d’abord sa trajectoire en $2.5s$ mais doit attendre $3.3s$ pour atteindre une vitesse moyenne constante.

12.3.3 Régime de mouvement

Le passage des cellules à travers le réseau présente trois régimes illustrés figure 12.21.

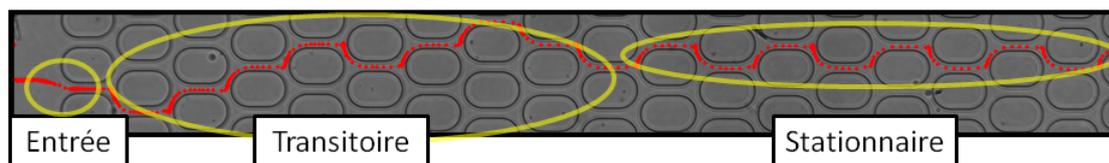


FIGURE 12.21 – Schéma définissant les trois régimes de mouvement d'une cellule.

Le premier régime correspond à l'entrée de la cellule dans le réseau. Il commence lorsque la cellule touche les deux côtés du canal initial et se termine lorsque le barycentre de la cellule coïncide avec le centre du canal droit. Il s'agit de la première déformation de la cellule, qui la fait passer d'une forme de pavé circulaire à une forme beaucoup plus allongée. La configuration de ce régime permet l'étude du lien entre contrainte appliquée et déformation observée afin d'obtenir des informations sur la rhéologie de la cellule.

La cellule entre dans un deuxième temps dans le régime transitoire. Il est marqué par la non stationnarité de la trajectoire et/ou par la non régularité de la vitesse. Nous considérons que cette phase du mouvement dure tant que les deux variables ne sont pas stabilisées.

En dernier lieu, la cellule atteint le régime stationnaire du mouvement. Il est défini par une trajectoire régulière faite d'une alternance de virages à gauche et à droite et par une périodicité de la vitesse instantanée qui engendre une vitesse moyenne constante.

Nous attirons l'attention sur le fait que les mouvements présentés ci-dessus sont des exemples typiques de comportement des cellules. L'étude de la totalité montrerait des variations de comportement autour du cadre dressé. Ainsi, certaines cellules adoptent directement leur régime stationnaire après la phase d'entrée : le régime stationnaire est inexistant. D'autres cellules décrivent une trajectoire toujours régulière mais nécessitent du temps pour stabiliser leur vitesse. D'autres, enfin, n'effectuent qu'un mouvement irrégulier à la manière des grosses billes de gels. Elles atteignent alors généralement une des parois du réseau où elles finissent leur traversée.

12.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons cherché à étudier et à caractériser le réseau créé.

Tout d'abord, nous avons présenté les travaux visant à connaître les propriétés de l'écoulement seul. Des simulations numériques sont réalisées, grâce auxquelles nous visualisons les répartitions de pression et vitesse de l'écoulement. Nous créons alors une coupure dans le réseau pour simuler l'effet de la présence d'une cellule. Nous mesurons les différences de pression s'appliquant localement aux bornes d'une

cellule lorsque celle-ci bouche des canaux droits ou diagonaux. Enfin, nous mesurons la résistance hydrodynamique des différents réseaux grâce à laquelle nous pouvons évaluer la vitesse du fluide à l'intérieur des canaux.

Nous nous sommes ensuite intéressés au mouvement d'objets modèles dans les réseaux. Le mouvement de billes rigides de polystyrène nous renseigne sur l'interaction entre les lignes de courant de l'écoulement et le comportement de petits objets. Nous observons ensuite les comportements de vésicules visqueuses et de billes de gels élastiques. Ces objets montrent tous les deux de fortes différences de comportement en fonction de leur taille relative au réseau.

Pour finir, nous avons observé le mouvement de cellules THP-1. Nous mettons en évidence une stabilisation de leur mouvement. Nous définissons alors trois régimes successifs de mouvement : l'entrée, un régime transitoire et finalement un régime stationnaire.

Les expériences sur les objets modèles présentées ici ouvrent la voie sur la création de dispositifs de tri d'objets déformables. En effet, pour une largeur de canal donnée, une différence de comportements apparaît en fonction des propriétés de déformation des objets. Les objets de taille trop importante, ne pouvant pas se déformer, ne traversent pas le réseau ou sont endommagés lors de la traversée. Les objets trop petits parcourent les canaux sans être déviés. Seuls les individus atteignant une section limite en se déformant sont déviés jusqu'à atteindre un des bords du dispositif. En récupérant les objets circulant sur les bords, on pourrait ainsi obtenir un sous-groupe d'objets possédant des propriétés très semblables.

Des outils de séparation de particules existent déjà dans la littérature [47, 65, 11, 46]. Ils sont toutefois tous basés sur des réseaux de plots asymétriques dont l'interaction avec les particules varie en fonction de leur taille ou de leur forme. Les réseaux exposés ici sont symétriques et ne basent leur pouvoir de séparation que sur les propriétés de déformation des objets. Un système adapté et optimisé permettrait ainsi de séparer des microbilles de gels de polyacrylamide possédant des tailles identiques mais comportant différents degrés de polymérisation, donc des propriétés rhéologiques différentes.

Chapitre 13

Entrée dans le réseau

Nous traitons dans ce chapitre de la première phase du mouvement des cellules : le régime d'entrée. Il s'agit de la première déformation des cellules, qui les fait passer d'une forme de pavé approximativement circulaire à une forme plus allongée, une fois entrées dans le canal droit. La dynamique de ce phénomène est contrôlée par l'équilibre entre les forces hydrodynamiques imposée par l'écoulement et la rhéologie de la cellule. L'objectif de ce travail est alors d'étudier les phénomènes observés pour en extraire toutes les informations disponibles sur la rhéologie des cellules.

Nous nous intéressons tout d'abord à l'étude des expériences de mesure de pression critique d'entrée des cellules dans le réseau. Nous abordons ensuite l'entrée des cellules de façon globale en analysant les temps nécessaires à la pénétration des cellules dans le canal. Nous cherchons alors comment nous pouvons utiliser les données acquises pour obtenir encore plus d'informations sur la rhéologie des cellules. Cela nous amène à étudier l'entrée des cellules sans tension corticale dans un premier temps, puis l'entrée des cellules avec tension corticale dans un second temps. Forts des études réalisées sur les deux groupes de cellules, nous effectuons un bref retour sur les mesures de temps d'entrée pour approfondir l'analyse qui en est faite. Nous analysons finalement les résultats des expériences effectuées avec des micropipettes avant de discuter des résultats obtenus pour les mettre en lien avec la rhéologie de la cellule.

13.1 Pression critique dans le réseau

Avant d'étudier la dynamique du phénomène, nous nous intéressons aux conditions nécessaires pour que les cellules entrent effectivement dans le réseau. En effet, les expériences d'aspiration de cellules par des micropipettes mettent en évidence la présence d'une pression critique d'entrée des cellules dans la pipette liée à l'exis-

tence d'une tension corticale dans les cellules [30, 68, 71, 102, 82]. La mesure de cette pression permet d'évaluer la valeur de la tension des cellules.

Nous réalisons dans un premier temps un bilan des pressions s'appliquant sur une cellule à l'entrée du réseau. Nous sommes alors en mesure d'effectuer des mesures de la pression critique des cellules pour en mesurer la tension corticale. Nous traitons pour finir du cas particulier des cellules traitées à la latrunculine.

13.1.1 Bilan de pression

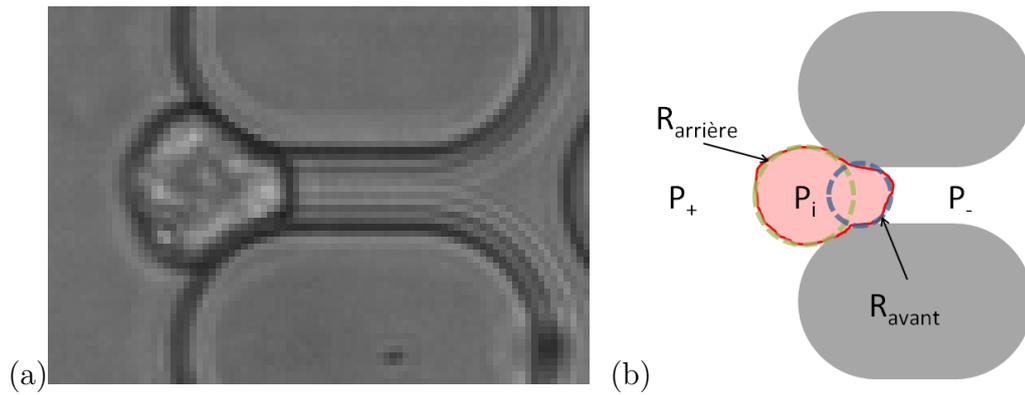


FIGURE 13.1 – (a) Cellule en équilibre à l'entrée d'un canal de $8.6\mu\text{m}$. Pression appliquée : 10mb . (b) Schéma définissant les rayons de courbure horizontaux avant et arrière. La différence de pression appliquée est $\Delta P = P_+ - P_-$.

Lorsque nous appliquons une pression très faible à une cellule, elle n'entre pas dans le réseau et se stabilise à l'entrée du canal droit. La figure 13.1a montre ainsi une cellule supportant une pression appliquée de 10mb sans entrer dans le dispositif. Une résistance à l'écoulement peut exister pour un objet élastique par exemple. On observe alors une infinité de position d'équilibre en fonction de la pression, de l'entrée de la cellule jusqu'au moment où la cellule peut glisser dans le canal. Pour les cellules, nous observons plutôt un seuil de déformation au delà duquel elles entrent progressivement dans le canal. Nous déduisons donc la présence d'une tension corticale, qui offre une résistance à la courbure de la membrane.

Pour comprendre ce phénomène, nous réalisons un bilan des contraintes agissant sur la cellule. Nous rappelons la loi de Laplace qui, pour une tension identique en tout point de l'interface, établit un lien de proportionnalité entre la courbure d'une interface libre C et la différence de pression existant entre les deux côtés de l'interface :

$$\Delta P_{\text{interface}} = \tau_0 C \quad (13.1)$$

τ_0 est la tension de l'interface, qui est la tension de surface dans le cas de gouttes ou la tension corticale dans le cas de cellules. La courbure de l'interface est égale

à l'inverse des deux rayons de courbure principaux : $C = 1/R_1 + 1/R_2$. Avec l'aide de la formule 13.1 et en supposant que la tension corticale est identique en tout point de la membrane, nous effectuons un bilan des pressions autour des interfaces avant et arrière de la cellule :

$$\text{A l'arrière : } P_i - P_+ = \tau_0 \left(\frac{1}{R_{\text{arriere},H}} + \frac{1}{R_{\text{arriere},V}} \right) \quad (13.2)$$

$$\text{A l'avant : } P_i - P_- = \tau_0 \left(\frac{1}{R_{\text{avant},H}} + \frac{1}{R_{\text{avant},V}} \right) \quad (13.3)$$

où τ_0 désigne la tension corticale de la membrane cellulaire, $R_{i,H}$ les rayons de courbure horizontaux, selon le plan de l'image, et $R_{i,V}$ les rayons de courbure verticaux, dans un plan perpendiculaire à l'image. Les rayons de courbure de la cellule ainsi que les pressions sont définis par la figure 13.1b. En soustrayant l'équation 13.3 par l'équation 13.2, on obtient une expression de la pression appliquée :

$$\Delta P = P_+ - P_- = \tau_0 \left(\frac{1}{R_{\text{avant},H}} - \frac{1}{R_{\text{arriere},H}} + \frac{1}{R_{\text{avant},V}} - \frac{1}{R_{\text{arriere},V}} \right) \quad (13.4)$$

Le raisonnement effectué ici ne prend pas en compte les pertes de charge agissant dans les gouttières situées dans les artères de la cellule. Nous supposons en effet que l'écoulement de liquide à travers ces ouvertures est très faible, et qu'il ne crée alors qu'un gradient de pression négligeable devant la pression appliquée. L'application de la loi de Laplace (eq. 13.1) suppose de plus que la tension corticale est identique en tout point de la membrane. Cette hypothèse est acceptable ici dans la mesure où la cellule est fixe et où les différences de tension sont généralement créées par un écoulement autour de l'objet [16]. Cette hypothèse sera rediscutée par la suite dans le cas de cellules en mouvement.

Les canaux microfluidiques possèdent une hauteur constante. Nous supposons alors que les rayons de courbure verticaux à l'avant et à l'arrière sont les mêmes : $\frac{1}{R_{\text{avant},V}} = \frac{1}{R_{\text{arriere},V}}$. La formule 13.4 se simplifie et la différence de pression appliquée s'exprime alors comme :

$$\Delta P = P_+ - P_- = \tau_0 \left(\frac{1}{R_{\text{avant},H}} - \frac{1}{R_{\text{arriere},H}} \right) \quad (13.5)$$

La pression critique est la valeur de pression maximale applicable aux bornes de la cellule sans que celle-ci n'entre dans le canal. Cette limite est atteinte pour la cellule lorsque son rayon de courbure avant atteint la valeur minimale accessible géométriquement dans le canal $R_{\text{avant}}^{\text{min}} = l/2$, avec l la largeur du canal traversé. Des valeurs inférieures de R_{avant} nécessiteraient l'apparition d'une concavité à l'avant

de la cellule, ce qui est impossible. Nous obtenons alors une expression de la pression critique de la cellule dans les réseaux :

$$\Delta P_c = \tau_0 \left(\frac{2}{l} - \frac{1}{R_{\text{arriere},H}} \right) \quad (13.6)$$

L'expression de la pression critique n'est cependant pas utilisable expérimentalement. Elle demande en effet de connaître exactement le moment où le point critique d'entrée est atteint, ce qui n'est pas possible expérimentalement. Nous préférons utiliser la dernière image obtenue à ΔP_{max} , la pression maximale appliquée avant que la cellule n'entre dans le canal. En mesurant les rayons de courbure avant et arrière et en appliquant la formule 13.5, nous pouvons alors déduire la tension corticale des cellules.

13.1.2 Tension corticale

Nous réalisons alors des expériences de mesure de la pression critique d'entrée des cellules dans les réseaux. Pour cela, nous introduisons une cellule à l'entrée des canaux. On augmente ensuite la pression par paliers, en s'assurant à chaque fois que la cellule est bien stabilisée et en prenant une photo pour chaque pression appliquée, jusqu'à qu'elle entre dans le canal. Cette procédure nous permet d'obtenir une image de la cellule stabilisée avec la pression appliquée la plus grande, et donc la plus précise, possible.

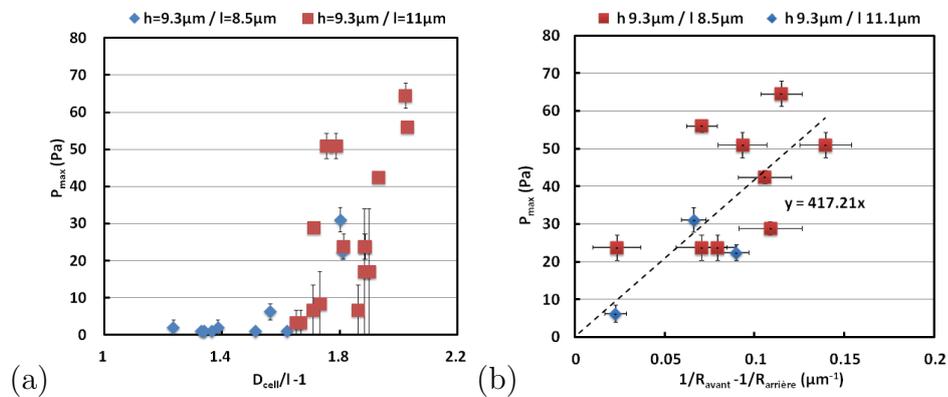


FIGURE 13.2 – (a) Pression maximale appliquée avant l'entrée des THP1 (a) en fonction de D_{cell}/l . D_{cell} est le diamètre des cellules. (b) en fonction de $(1/R_{\text{avant},H} - 1/R_{\text{arriere},H})$. $1/R_{\text{avant},H}$ et $1/R_{\text{arriere},H}$ sont les rayons de courbure mesurés sur l'image à l'avant et l'arrière de la cellule. Les points rouges correspondent à une largeur de canal de $8.5\mu\text{m}$, les bleus à une largeur de $11.1\mu\text{m}$. La ligne noire représente un ajustement par une droite affine des données. Nous considérons une erreur de $2\mu\text{m}$ pour le rayon arrière et $1\mu\text{m}$ pour le rayon avant.

La figure 13.2a représente les valeurs de pressions maximales appliquées avant l'entrée des cellules en fonction de $D_{\text{cell}}/l - 1$, la différence de taille relative entre le

diamètre des cellules D_{cell} et de la largeur des canaux l . La courbe indique que pour les cellules dont $D_{cell} < 1.6.l$, il n'y a pas de pression minimum nécessaire pour leur entrée. La figure 13.2b montre les pressions maximales avant entrée mesurées pour des cellules entrant dans le dispositif en fonction de $\frac{1}{R_{avant,H}} - \frac{1}{R_{arrière,H}}$, les rayons de courbure étant mesurés sur les images. Chaque point de la figure correspond à une cellule différente. Les points sont disposés de manière à peu près linéaire, ce qui permet de mesurer une tension corticale moyenne pour le groupe de cellules. En ajustant une droite affine sur les points et en mesurant sa pente, on mesure $\langle \tau_0 \rangle = 417 \pm 98 pN.\mu m^{-1}$.

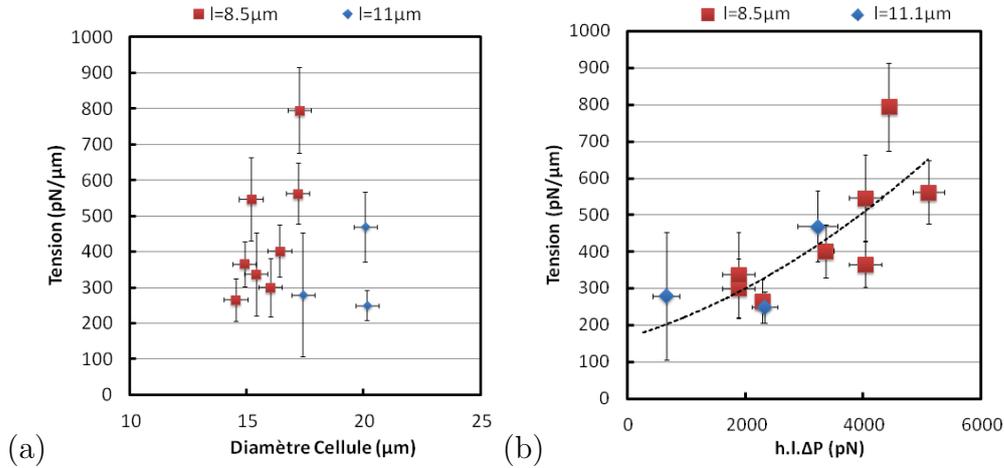


FIGURE 13.3 – (a) Tension corticale des cellules. (a) en fonction du diamètre cellulaire. (b) en fonction de la force appliquée lors de la mesure. Les points rouges correspondent à une largeur de canal de $8.5\mu m$, les bleus à une largeur de $11.1\mu m$

On détermine ensuite une tension corticale pour chaque cellule en calculant le rapport $\Delta P_{max}/(1/R_{avant} - 1/R_{arrière})$. Les valeurs obtenues sont tracées sur la figure 13.3a en fonction du diamètre des cellules utilisées. Les valeurs individuelles de la tension sont réparties entre 250 et $800 pN.\mu m^{-1}$. Aucune dépendance particulière de la tension en fonction de la taille des cellules n'est observée.

La figure 13.3b représente les valeurs individuelles de la tension corticale en fonction de la force appliquée pour la mesurer $f_{mes} = h.l.\Delta P_{max}$, avec h la hauteur de canaux. Les points obtenus pour différentes largeurs se regroupent sur une même courbe croissante : plus la force appliquée est grande, plus la tension mesurée est importante. Si nous ne pouvons fournir une explication à la forme de cette courbe, nous pouvons extrapoler que l'ordre de grandeur de la tension corticale des cellules en l'absence de force appliquée est $100 pN/\mu m$.

La tension corticale pour des neutrophiles, mesurée par aspiration dans des micropipettes, vaut environ $30 pN.\mu m^{-1}$ [30, 71, 102, 82], soit un peu moins grandes que les tensions mesurées ici. L'ordre grandeur mesuré est toutefois satisfaisant,

les monocytes n'étant pas des neutrophiles. Les cellules dans les réseaux sont de plus contraintes en hauteur au départ ($D_{cell} > h$). Ce confinement crée une force sur les cellules qui, d'après la figure 13.3b, augmente la tension mesurée.

13.1.3 Cas particulier des cellules traitées à la latrunculine

Les expériences de mesure de pression critique d'entrée sont répétées avec des cellules traitées à la latrunculine.

Nous observons que toutes les cellules entrent dans les réseaux, même lorsque nous appliquons au réseau la pression minimale de $\Delta P_{tot} = 0.3mb$ accessible avec le distributeur de pression. D'après la formule 12.1, la pression critique de ces cellules est donc inférieure à $\Delta P_{cell} = 1Pa$. En considérant des cellules de $15\mu m$ de diamètre moyen, une pression de $1Pa$ et un canal de $8\mu m$ de largeur, nous pouvons estimer par l'équation 13.5 que la tension corticale des cellules est inférieure à $8.5pN/\mu m$. La tension corticale des cellules traitées à la latrunculine est donc très inférieure à la tension de cellules normales. Ce résultat montre très clairement que le traitement à la latrunculine, qui inhibe la polymérisation de l'actine, réduit très fortement la tension corticale de la cellule. Ce résultat est en accord avec les observations de Gabriele et al. [36] qui montre que des cellules traitées à la latrunculine entrent beaucoup plus facilement et rapidement que des cellules normales, illustrant qu'un frein à la déformation est détruit par l'action de la toxine. Le rôle de la latrunculine sur l'actine des cellules THP-1 devra être conforté par une visualisation de l'actine cortical par microscopie de fluorescence.

Cette expérience nous permet de déduire une deuxième information sur le comportement rhéologique de la cellule. En effet, les cellules, même à très petite contrainte, entrent dans le canal. Cela n'est possible que si le matériau à l'intérieur de la cellule a un comportement visqueux à temps long. Une cellule "solide", que ce soit un solide élastique ou un solide visco-élastique, adopterait une déformation constante en accord avec son module élastique et trouverait un équilibre à l'entrée du canal.

13.2 Entrée globale

Une première façon de regarder l'entrée, et aussi la plus simple expérimentalement, est de s'intéresser à ce phénomène dans sa globalité. Nous mesurons pour cela le temps d'entrée de plusieurs cellules à différentes pressions et dans différentes largeurs de canaux que nous relierons à un paramètre rhéologique effectif global.

Nous définissons tout d'abord le temps d'entrée et les déformations de la cellule. Nous présentons alors les valeurs expérimentales pour les cellules normales et leurs

variations. Nous comparons finalement les observations en fonction des différents traitements appliqués aux cellules.

13.2.1 Variables pertinentes

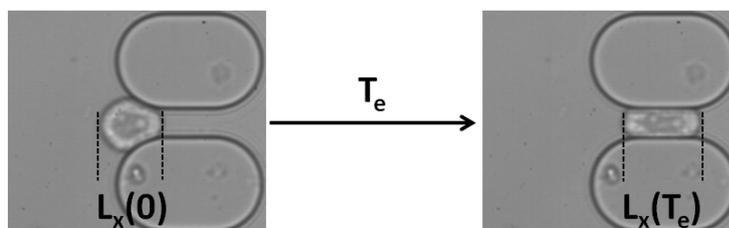


FIGURE 13.4 – Définitions du temps d'entrée et de la déformation globale.

L'entrée globale est caractérisée par 3 paramètres illustrés sur la figure 13.4 : la longueur de la cellule dans la direction de l'écoulement au moment où elle touche pour la première fois les deux côtés du canal $L_x(0)$; la longueur de la cellule $L_x(T_e)$ quand elle est au centre du canal et le temps T_e écoulé entre ces deux instants.

On définit à partir de ces valeurs un taux de déformation global de la cellule $\epsilon_{tot} = \frac{L_x(T_e) - L_x(0)}{L_x(0)}$, qui est de fait un taux d'étirement. Pour tenir compte de l'effet de la pression sur l'entrée, nous définissons ensuite une grandeur effective J_{tot} ayant la dimension d'une complaisance, c'est-à-dire d'une déformation divisée par une contrainte :

$$J_{tot} = \frac{\epsilon_{tot}}{\Delta P_{cell}} = \frac{1}{\Delta P} \frac{L_x(T_e) - L_x(0)}{L_x(0)} \quad (13.7)$$

Il s'agit d'un paramètre rhéologique global, qui représente la valeur de la fonction de fluage qu'aurait une cellule au temps T_e soumise à une contrainte constante ΔP_{cell} au cours du mouvement.

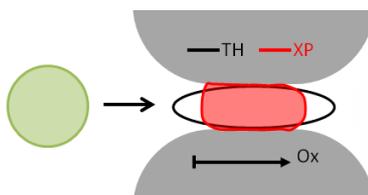


FIGURE 13.5 – Dessin illustrant la différence entre les deux déformations ϵ_{TH} et ϵ_{tot} . La ligne noire représente le contour de la cellule après une déformation correspondant à ϵ_{TH} . La ligne rouge est une représentation plus réaliste de la forme de la cellule, pour laquelle on mesure une déformation ϵ_{tot} .

La mesure de ϵ_{tot} nécessite la mesure de deux dimensions $L_x(0)$ et $L_x(T_e)$. Pour une mesure plus rapide (intégrable dans un système automatisé par exemple), nous

pouvons calculer une estimation de la déformation simplement à partir de la taille de la cellule, accessible avec une seule mesure. Il faut pour cela considérer une transformation comme ce qui est représenté sur la figure 13.5 entre la forme verte et la forme noire. La déformation est alors modélisé comme l'étirement d'une cellule partant d'une pavé circulaire de diamètre D_{cell} (Forme verte) en un pavé elliptique de même volume (ligne noire), dont les diamètres principaux selon Ox et Oy sont $(\frac{D_{cell}}{l} \cdot D_{cell}; l)$. Dans ce cas, la déformation est $\epsilon_{TH} = \frac{D_{cell}^2/l - D_{cell}}{D_{cell}} = \frac{D_{cell}}{l} - 1$. Nous définissons alors une complaisance théorique $J_{TH} = \epsilon_{TH}/\Delta P_{cell}$.

La formule de ϵ_{TH} fournit une bonne évaluation de la déformation réelle ϵ_{tot} , compatible en ordre de grandeur. Cependant, nous observons toujours $\epsilon_{TH} > \epsilon_{tot}$.

13.2.2 Mesure du temps d'entrée

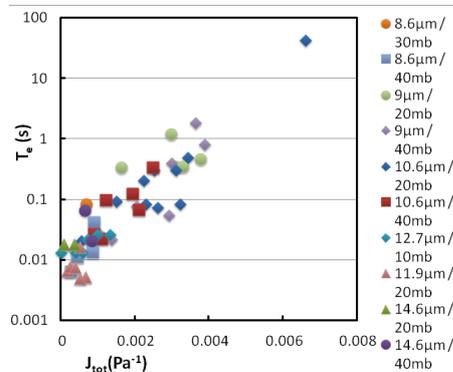


FIGURE 13.6 – Temps d'entrée des cellules non traitées en fonction du pseudo-fluage J_{tot} mesuré expérimentalement.

Les données du temps d'entrée T_e sont représentées sur la figure 13.6 en fonction de J_{tot} pour plusieurs tailles de canaux et plusieurs pressions appliquées. Le premier résultat est que le temps d'entrée T_e est distribué sur un intervalle de plus de 2 ordres de grandeurs, allant de $10ms$ à $1s$ principalement. Ce résultat indique que le processus d'entrée dans le canal implique une contribution visqueuse. En effet, pour un solide purement élastique, la déformation est instantanée à l'application de la contrainte.

Le deuxième résultat majeur est que les valeurs de T_e obtenues se regroupent sur une courbe maîtresse en fonction de J_{tot} pour des conditions expérimentales variables, pour la taille de canal (agissant sur le taux de déformation) et pour la pression extérieure appliquée (agissant sur la contrainte appliquée). La courbe présentée est une courbe de pseudofluage (la contrainte appliquée n'est pas constante) tracée sur une population de cellules, chaque cellule fournissant un point obtenu au moment où la cellule passe au milieu du canal. Cette courbe permet de ca-

racteriser des propriétés viscoélastiques du matériau "THP-1". La dispersion de la courbe reflète la dispersion des propriétés rhéologiques des cellules, qui reste assez limitée.

13.2.3 Effet des traitements biochimiques

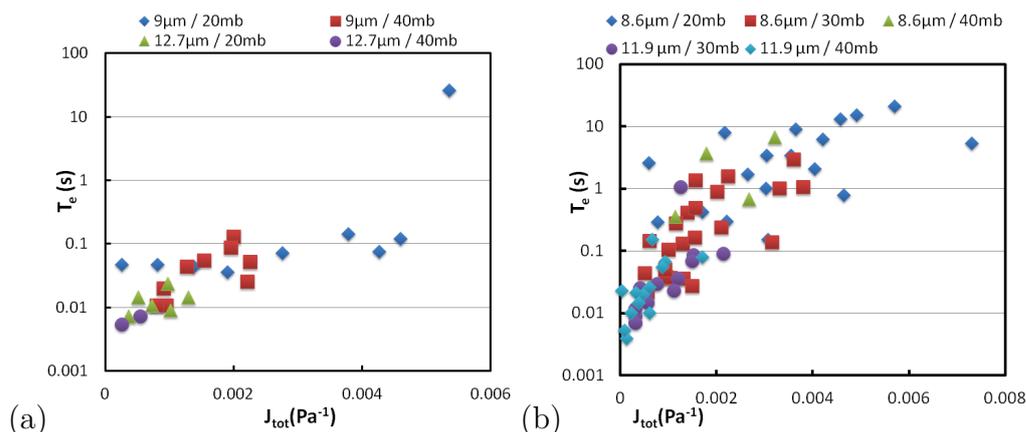


FIGURE 13.7 – Temps d'entrée en fonction du fluage expérimental J_{tot} . (a) Cellules traitées à la latrunculine. (b) Cellules traitées à la jasplakinolide.

La figure 13.7 représente les courbes (J_{tot}, T_e) pour les cellules traitées à la latrunculine (a) et les cellules traitées à la jasplakinolide (b), pour différentes conditions expérimentales de largeur de canaux et de pressions appliquées. La grande majorité des temps d'entrée des cellules LAT ont un temps d'entrée compris entre 5ms et 100ms . Les points pour différentes conditions expérimentales décrivent une courbe unique, de forme empiriquement exponentielle. Les cellules JASP ont des temps d'entrée aux valeurs plus dispersées, allant de 5ms à plus de 10s . Les points des différentes conditions expérimentales décrivent aussi une courbe unique, dont la forme ne semble toutefois pas être exponentielle. Les courbes de la figure 13.7 valident ainsi l'utilisation de la représentation (J_{tot}, T_e) pour des cellules dont la rhéologie a été modifiée par une drogue.

Nous comparons alors les données obtenues pour les trois types de cellules en traçant la totalité des couples (J_{tot}, T_e) sur la figure 13.8. Les trois courbes se rejoignent au point $J_{tot} = 0$: pour les cellules se déformant peu, qui subissent donc un pseudo-fluage très faible, les différences de rhéologie des cellules n'interviennent pas et elles rentrent toutes à la même vitesse. Pour des J_{tot} plus importants, les trois courbes se différencient : les vitesses de variations des courbes pour les faibles J_{tot} sont différentes, les formes globales des courbes sont différentes, notamment pour les cellules traitées à la jasplakinolide. Nos observations sont compatibles avec

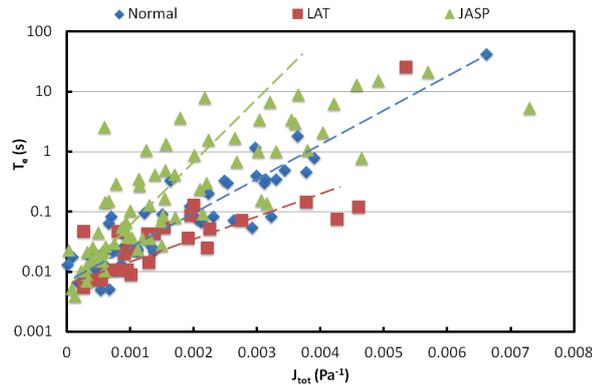


FIGURE 13.8 – Temps d’entrée en fonction du fluage expérimental J_{tot} . Bleu : Cellules non traitées. Rouge : Cellules incubées dans de la jasplakinolide. Vert : Cellules incubées dans de la latrunculine. Les trois lignes sont des guides pour les yeux, positionnées pour représenter la tangente des courbes à fluage nul.

les résultats d’une étude précédente menée sur l’entrée de THP-1 dans un microcanal microfluidique, déterminant des temps d’entrée de cellules THP-1 traitées à la latrunculine environ 100 fois plus faibles que pour les cellules traitées à la jasplakinolide [36]. Dans ce système, les déformations ϵ_{tot} imposées aux cellules sont comprises entre 50 et 100%. Sur la courbe 13.8, une déformation de 0.5 atteinte sous une dépression de 30mb (correspondant à une dépression aux bornes de la cellule $\Delta P_{cell} = 100 Pa$ d’après l’équation 12.1), crée un compliance $J_{tot} \approx 0.005$. Pour cette valeur de J_{tot} , nous mesurons aussi une différence de facteur 100 entre les temps d’entrée des cellules traitées à la latrunculine et à la jasplakinolide, qui indique la compatibilité des résultats.

L’étude du temps d’entrée est un moyen simple et rapide pour comparer l’état rhéologique de populations de cellules. Les courbes (J_{tot}, T_e) sont sensibles aux traitements appliqués aux cellules et donnent des résultats séparés de deux ordres de grandeur pour les déformations importantes.

13.3 Analyse détaillée de l’entrée des cellules

L’entrée des cellules est ainsi sensible aux traitements appliqués aux cellules, donc à leur rhéologie. Afin d’obtenir une description plus détaillée des phénomènes, nous cherchons alors à analyser les observations plus finement en profitant de chaque image disponible.

Ainsi, nous étudions tout d’abord en détail l’entrée des cellules dans le premier canal. Nous reconsidérons alors le phénomène à la lumière des expériences d’aspiration de cellules dans des micropipettes dont nous adaptons la modélisation à notre géométrie.

13.3.1 Description des variables observables

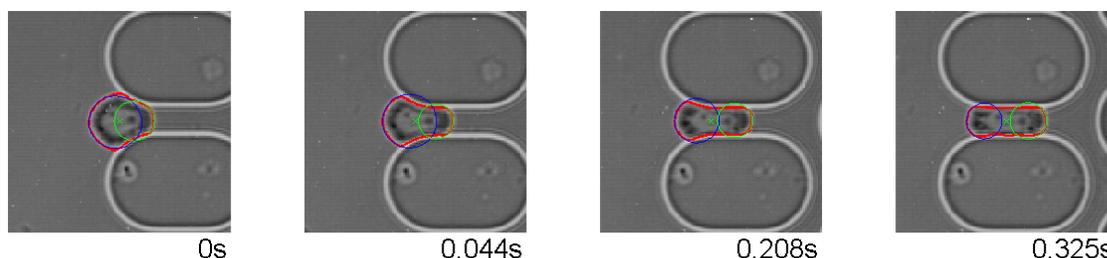


FIGURE 13.9 – Photos d'une cellule entrant dans le réseau de canaux. La ligne rouge représente le résultat de la détection du contour, le cercle bleu représente le résultat pour le rayon de courbure arrière, le cercle vert pour l'avant. Diamètre cellulaire : $15.4\mu\text{m}$. Largeur du canal : $8.6\mu\text{m}$. Dépression appliquée : 20mb .

La figure 13.9 montre quatre images d'une cellule de $15.4\mu\text{m}$ de diamètre entrant dans un canal de $8.6\mu\text{m}$ grâce à une dépression de 20mb . Comme son diamètre est plus grand que la largeur du canal, la cellule doit se déformer pour entrer. Sa longueur s'allonge ainsi d'une image à l'autre pendant que sa dimension perpendiculaire à l'écoulement se réduit pour atteindre la largeur du canal. La déformation finale de la cellule est $\epsilon_{tot} = 0.21$.

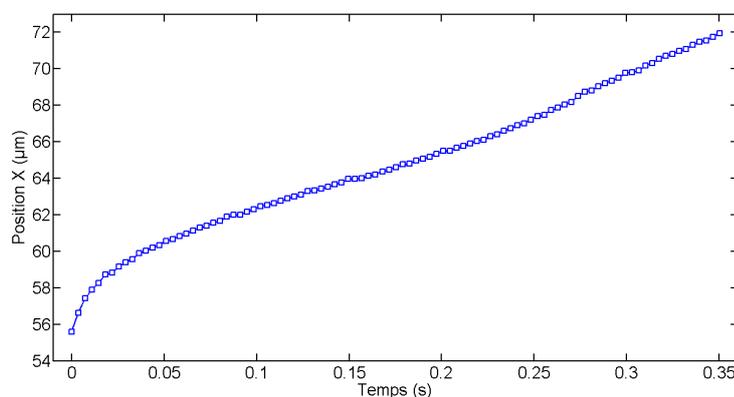


FIGURE 13.10 – Position selon l'axe Ox d'une cellule lors de son entrée dans le dispositif en fonction du temps. Diamètre cellulaire : $15.38\mu\text{m}$.

Trajectoire Sur la figure 13.10, nous traçons l'évolution du centre de gravité de la cellule en fonction du temps, pour laquelle nous observons trois régimes. Tout d'abord, de $t = 0\text{s}$ à $t = 0.05\text{s}$, la cellule avance rapidement dans le canal. Elle progresse ensuite à vitesse constante jusqu'à $t \approx 0.25\text{s}$. Elle adopte finalement une vitesse plus importante marquant une facilitation de son déplacement en fin de parcours.

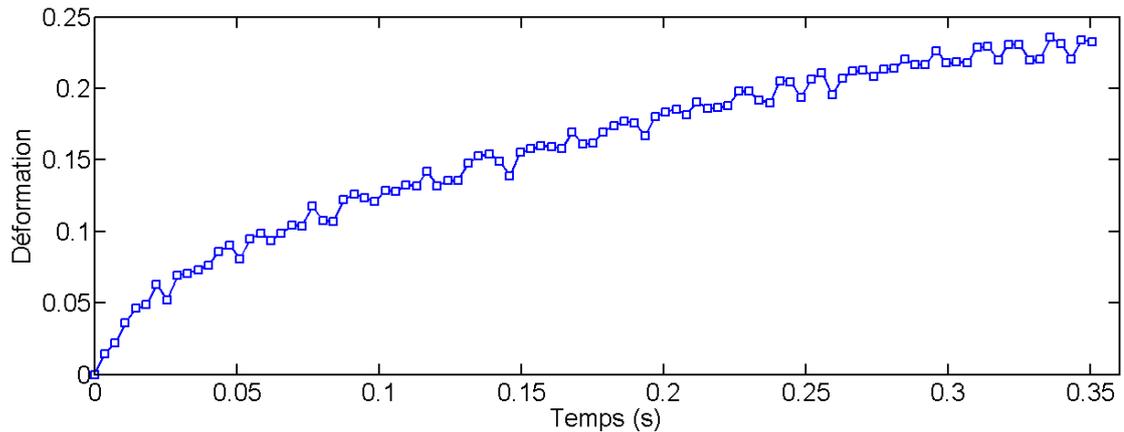


FIGURE 13.11 – Déformation d'une cellule lors de son entrée dans le dispositif. Diamètre cellulaire : $15.38\mu m$. Longueur initiale de la cellule : $18.6\mu m$.

Déformation de la cellule La déformation $\epsilon(t) = \frac{L_x(t) - L_x(0)}{L_x(0)}$ de la cellule en fonction du temps est visible sur la figure 13.11. Nous observons un régime de déformation rapide jusqu'à $t = 0.05s$ puis une progression linéaire jusqu'à $t = 0.25s$. La déformation ralentit finalement jusqu'à la fin de l'entrée.

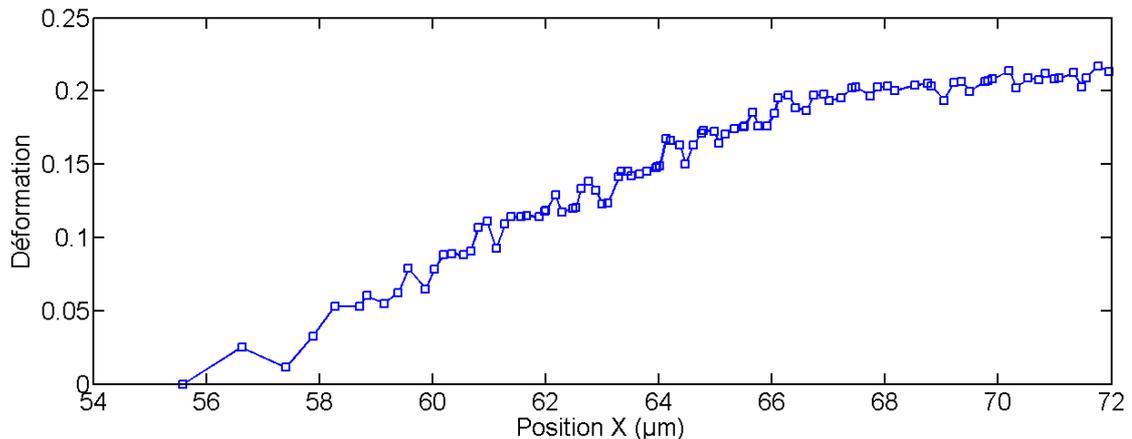


FIGURE 13.12 – Déformation de la cellule lors de son entrée dans le dispositif en fonction de sa position selon l'axe Ox . Diamètre cellulaire : $15.38\mu m$. Longueur initiale de la cellule : $18.6\mu m$.

La trajectoire et la déformation montrent les mêmes dynamiques temporelles. Nous traçons donc la déformation en fonction de la position selon l'axe Ox de la cellule, visible sur la figure 13.12. Le lien entre les deux variables est linéaire pendant les 11 premiers microns du déplacement, de $x = 56\mu m$ à $x = 67\mu m$. Une inflexion de la courbe se produit à $x = 67\mu m$, qui est le point atteint à $t = 0.25s$. La variation de la déformation en fonction de x est alors plus lente jusqu'à la fin de l'entrée.

Nous identifions ainsi trois régimes de déformation de la cellule. L'entrée commence par une déformation rapide de la cellule, jusque $t = 0.05s$. L'allongement se poursuit ensuite à vitesse constante jusque $t = 0.25s$ et $x = 67\mu m$. Cet instant marque un changement dans l'application du travail des forces de pression : avant $t = 0.25s$, il est transmis principalement à la cellule et très peu à son mouvement ; après $t = 0.25s$, la déformation est suffisante et le travail des forces de pression sert principalement à faire avancer la cellule dans le canal.

Rayon de courbure de la membrane L'étude de la pression critique montre que la courbure de l'interface est un paramètre important pour les cellules entrant dans le réseau. Nous étudions donc les variations des rayons de courbure de la cellule, visibles sur les images de la figure 13.9.

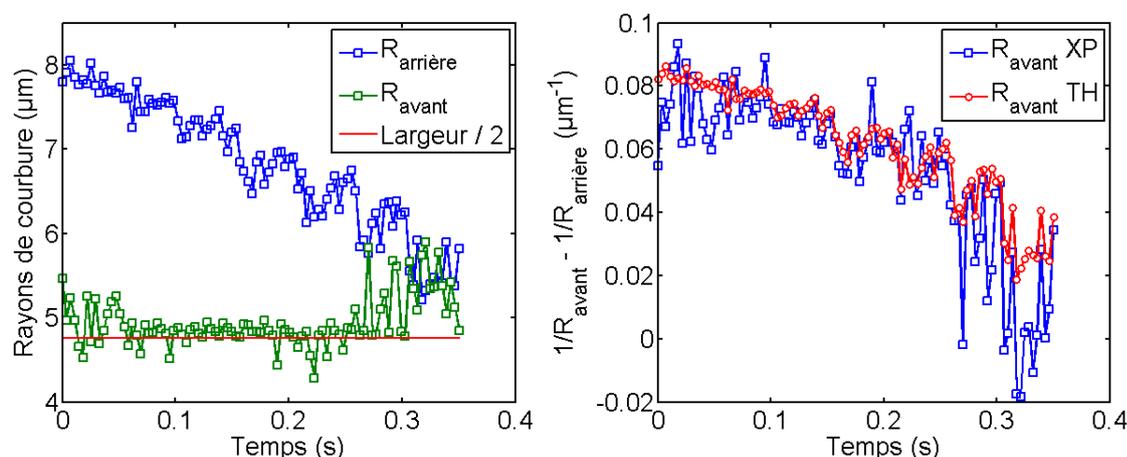


FIGURE 13.13 – Gauche : Rayons de courbure avant (vert) et arrière (bleu) d'une cellule entrant dans le réseau en fonction du temps. La ligne rouge représente la demi-largeur du canal mesurée sur l'image. Droite : Différence de l'inverse des rayons de courbure en fonction du temps. Diamètre cellulaire : $15.38\mu m$. La courbe bleue est obtenue en prenant le rayon avant déterminé à chaque instant sur les images. La courbe rouge est obtenue en prenant le rayon de courbure avant toujours égal à la demi-largeur du canal.

Les valeurs de rayons de courbure avant et arrière en fonction du temps sont représentés sur la figure 13.13Gauche. Le rayon de courbure avant est approximativement constant et très proche de la valeur minimale $l/2$. Le rayon de courbure arrière décroît en fonction du temps, partant d'une valeur proche de $R_{cell} = D_{cell}/2 = 7.7\mu m$ pour s'approcher de la valeur $l/2$ en fin d'entrée. En fin de parcours, lorsque la cellule se situe au centre du canal droit, $R_{avant} \approx R_{arrière}$ ce qui indique que sa forme est symétrique.

Le bilan des pressions de la partie 13.1.1 montre que l'effet de la courbure de la membrane dépend de la différence des courbures $1/R_{avant} - 1/R_{arrière}$. Cette variable est donc représentée en fonction du temps sur la figure 13.13Droite. Les deux courbes correspondent à deux façons de calculer la différence des courbures :

la courbe bleue vaut $1/R_{avant}(t) - 1/R_{arrière}(t)$, la courbe rouge utilise la valeur approchée du rayon avant et vaut $2/l - 1/R_{arrière}(t)$. Les deux courbes sont décroissantes en fonction du temps. La courbure expérimentale atteint 0 autour de $t = 0.32s$, à la fin de l'entrée.

Les deux courbes mesurant la différence de courbure entre l'avant et l'arrière de la cellule donnent des résultats équivalents : leurs différences sont minimales par rapport à la variation globale. La courbe utilisant $R_{avant} \approx l/2$ est toutefois moins bruitée car elle s'affranchit de l'erreur sur la mesure de $R_{avant}(t)$. Ce gain en précision est fait au détriment de la pertinence de la courbe en fin de parcours. En effet, elle n'atteint pas 0 en fin de parcours, alors que les rayons de courbure finaux sont égaux.

13.3.2 Observables mécaniques

Afin d'obtenir des renseignements sur la rhéologie des cellules entrant dans le réseau, nous devons définir la contrainte ressentie par les cellules et la déformation qu'elles subissent.

Approximation d'une déformation d'extension La hauteur du dispositif est constante, l'écoulement du fluide ainsi que tous les mouvements de la cellule se font principalement dans le plan xOy de l'image. A ce titre, nous faisons l'hypothèse qu'aucun effet majeur, tant en terme de contrainte que de déformation, ne se produit selon la direction Oz . Les tenseurs des contraintes et des déformations s'expriment alors :

$$\boldsymbol{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & \sigma_{xy} & 0 \\ \sigma_{yx} & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad \boldsymbol{\epsilon} = \begin{pmatrix} \epsilon_{xx} & \epsilon_{xy} & 0 \\ \epsilon_{yx} & \epsilon_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (13.8)$$

Nous pouvons donc réduire les tenseurs à des matrices $[2 \times 2]$.

Le phénomène d'entrée des cellules est ensuite fortement polarisé selon la direction Ox . La dépression appliquée sur le réseau agit selon Ox , créant un écoulement selon ce même axe dans le réseau, et plus particulièrement dans les canaux droits. La cellule avance de plus dans la direction Ox , et subit dans la direction de cet axe un allongement important. Nous faisons donc l'hypothèse que le phénomène de déformation de la cellule est assimilable à une déformation extensionnelle et nous négligeons les contraintes et déformations de cisaillements apparaissant dans les phénomènes observés. Nous pouvons alors réécrire les tenseurs :

$$\boldsymbol{\sigma} = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} \end{pmatrix} \quad \boldsymbol{\epsilon} = \begin{pmatrix} \epsilon_{xx} & 0 \\ 0 & \epsilon_{yy} \end{pmatrix} \quad (13.9)$$

Dans ces conditions, la rhéologie décrite sera linéaire : σ_{xx} ne sera relié qu'à ϵ_{xx} , de même pour σ_{yy} et ϵ_{yy} .

Il est important de faire quelques précisions sur notre hypothèse. Nous modélisons globalement la résultante des contraintes sur la cellule par une force d'étirement, donc par un tenseur des contraintes diagonales. La complexité de la géométrie de canaux entraîne a priori des effets de cisaillement par l'intermédiaire des parois des canaux. Nous ne sommes pas en mesure d'évaluer l'erreur induite par l'absence de ces termes de cisaillement. Nous aurons toutefois accès aux ordres de grandeur des paramètres rhéologiques, ainsi qu'à une méthode de comparaison des cellules entre elles. Pour obtenir une contrainte mieux définie, il faut changer de géométrie. C'est dans ce but que nous réalisons une croix, présentée dans la partie 16.

Frottement visqueux La cellule est en mouvement dans le canal où il se crée un frottement visqueux avec les parois du dispositif. Dans le bilan des forces, ce frottement est en compétition avec la force nécessaire pour déformer la cellule, que l'on peut exprimer pour une déformation visqueuse ou pour une déformation élastique. Nous cherchons à évaluer l'ordre de grandeur du frottement par rapport aux forces de déformation.

La force de frottement visqueux s'écrit $F_{frot} = S_{frot} K v_{cell}$. Elle est par définition proportionnelle à la vitesse de la cellule. $S_{frot} \sim 10^3 \mu m^2$ est la surface en contact entre la cellule, de l'ordre de la surface de la cellule. $K \sim 10^{-3} N.s/m^3$ est le coefficient de frottement visqueux entre la cellule et le dispositif, dont la valeur est déterminée au chapitre 15. v_{cell} s'estime par L/T_e où $L \sim 10 \mu m$ est la distance parcourue pendant l'entrée et $T_e \sim 0.001 - 1s$ est le temps d'entrée.

Nous estimons la force nécessaire à la déformation visqueuse par le produit de la contrainte visqueuse par la surface considéré : $F_{vis} = h.l.\eta_{cell}\dot{\epsilon}$. Les valeurs $h \sim 10 \mu m$ et $l \sim 10 \mu m$ sont la hauteur et la largeur du canal. $\eta \sim 10 - 100 Pa.s$ est la viscosité de la cellule, dont on estime l'ordre de grandeur par les valeurs de viscosité des neutrophiles (Table 1.1). $\dot{\epsilon}$ est la vitesse de déformation typique de la cellule, estimée par ϵ_{tot}/T_e avec $\epsilon_{tot} \sim 0.1$.

La force nécessaire à la déformation élastique s'estime de la même manière que F_{vis} mais avec une contrainte visqueuse : $F_{el} = h.l.k\epsilon$. $k \sim 100 - 1000 Pa$ est le module élastique de la cellule, dont l'ordre de grandeur est estimé par les valeurs d'élasticité des neutrophiles (Table 1.1) ou des cellules de leucémies HL-60 [59].

Avec ces valeurs, nous calculons le rapport de la force de frottement avec les forces nécessaires à la déformation :

$$\frac{F_{frot}}{F_{visq}} = \frac{S_{frot}KL}{h.l.\eta\epsilon} \sim 10^{-8} - 10^{-7} \quad \& \quad \frac{F_{frot}}{F_{el}} = \frac{S_{frot}KL}{h.l.k\epsilon} \sim 10^{-9} - 10^{-6}$$

Le frottement est ainsi toujours négligeable lors du mouvement d'entrée des cel-

lules. Nous n'en tenons donc pas compte pour le calcul de la contrainte ressentie par la cellule.

Contrainte effective En entrant dans un canal, les cellules se déforment sous l'effet de la pression appliquée à ses bords ΔP_{cell} et il apparaît une différence entre les rayons de courbure avant et arrière de la cellule. En réalisant le même bilan des pressions qu'à la partie 13.1.1 pour une cellule qui n'est plus à l'équilibre, nous déterminons la contrainte effective $\langle \sigma_{xx} \rangle$ ressentie par la cellule dans l'axe du canal :

$$\langle \sigma_{xx} \rangle(t) = \Delta P - \tau_0 \left(\frac{1}{R_{avant,H}(t)} - \frac{1}{R_{arriere,H}(t)} \right) \quad (13.10)$$

La formule 13.10 considère implicitement que la tension est constante en tout point de la membrane de la cellule en mouvement. Nous remarquons que, lorsque la cellule est au centre du canal et qu'elle subit un confinement identique à l'avant et à l'arrière, ses rayons de courbure sont équivalents, comme le montre la figure 13.13Droite. La symétrie des deux extrémités de la cellule indique une égalité de la tension à l'avant et à l'arrière lors de l'entrée de la cellule.

Nous observons sur la figure 13.13Droite que le terme $[1/R_{avant,H}(t) - 1/R_{arriere,H}(t)]$ est positif. Sous l'influence de la tension corticale, la contrainte mettant la cellule en mouvement sera inférieure à la dépression ΔP_{cell} appliquée aux bornes de la cellule. La différence des courbures étant de plus décroissante, cela implique que les cellules avec une tension corticale non nulle ressentent une contrainte croissante en fonction du temps. Empiriquement, nous identifions la variation de contrainte dans le régime de forte déformation (qui correspond à la période entre $t = 0s$ et $t = 0.25s$ dans la figure 13.13) à une droite et nous écrivons donc pour cette période :

$$\langle \sigma_{xx} \rangle(t) = \Delta P - \tau_0(\alpha - \beta t) \quad \text{pour } t \leq T_\sigma \quad (13.11)$$

où T_σ est défini comme le temps limite de validité de l'approximation de variation linéaire de la contrainte. Ce temps est aussi la durée du régime déformant, pour lequel le travail des forces de pression sert principalement à déformer la cellule. α est la différence de courbure initiale et est donc de l'ordre de $\alpha \sim 2/l - 2/D_{cell}$. β est la vitesse de variation de la contrainte et est donc de l'ordre de $\beta \sim \alpha/T_e$. Pour finir, on identifie dans la formule de $\langle \sigma_{xx} \rangle$ la pression critique d'entrée de la cellule, qui vaut $\Delta P_c = \tau_0 \alpha$.

Ramrque : Pour les micropipettes, la géométrie du système crée des contraintes différentes [30, 39]. Les pipettes, de rayon R_p , sont choisies de façon à vérifier $R_p \ll R_{cell}$. Cela permet de faire l'hypothèse d'une très faible déformation de la cellule par l'expérience et ainsi de supposer $R_{arriere} \approx R_{cell}$. Le rayon avant étant

égal au rayon de la pipette, l'expression de la contrainte de l'équation 13.10 devient $\sigma = \Delta P - \Delta P_c$ avec $\Delta P_c = \tau_0 (1/R_p - 1/R_{cell})$. La contrainte ressentie par une cellule lors de son aspiration est donc constante.

Déformation de la cellule Le phénomène d'entrée engendre des déformations faibles : les valeurs de déformation finale ϵ_{tot} sont comprises entre 1% et 50%. Nous nous plaçons donc dans le régime des petites déformations où les termes du second ordre sont négligeables et où les déformations s'expriment simplement comme $\epsilon_{ii} = \partial u_i / \partial i$, avec u_i le champ des déplacements selon l'axe Oi .

En première approximation, nous écrivons alors dans cet intervalle de temps la déformation moyenne de la cellule :

$$\langle \epsilon_{xx} \rangle(t) = \frac{\Delta L_x}{L_x} = \frac{L_x(t) - L_x(0)}{L_x(0)} \quad (13.12)$$

avec L_x la longueur totale de la cellule selon l'axe Ox . Nous remarquons que cette expression s'identifie avec les valeurs utilisées pour l'entrée globale : $\epsilon_{tot} = \langle \epsilon_{xx} \rangle(T_e)$.

13.3.3 Modèle rhéologique cellulaire

Le lien entre les valeurs $\langle \sigma_{xx} \rangle(t)$ et $\langle \epsilon_{xx} \rangle(t)$, et plus généralement entre les tenseurs correspondants, est assuré par un modèle rhéologique. Nous cherchons à déterminer le modèle le plus simple possible en adéquation avec les observations expérimentales.

Dans les expériences de mesure de pression critique, les cellules traitées à la latrunculine entrent toujours dans les canaux, même pour les pressions appliquées les plus faibles. L'écoulement pour de très petites contraintes indique que les cellules sont fluides (par opposition aux modèles de solide visco-élastique [84, 93]). Le modèle rhéologique doit donc contenir un composant visqueux isolé qui donne aux cellules un caractère fluide à temps long. L'élément le plus simple reproduisant ce comportement est un amortisseur visqueux.

Ensuite, les courbes de déformations en fonction du temps montre une Déformation rapide au tout début de l'entrée. Ce comportement indique l'existence d'un temps caractéristique de déformation plus court que le temps d'entrée. De plus, nous n'observons aucune déformation instantanée de la cellule au début des expériences. L'élasticité instantanée de la cellule est trop donc faible pour être visualisée et nous choisissons donc de la négliger. L'élément visco-élastique le plus simple reproduisant ces caractéristiques est un solide de Kelvin-Voigt.

En regroupant toutes ces informations, nous obtenons un modèle de liquide visco-élastique représenté sur la figure 13.14. Il est constitué d'un solide de Kelvin-Voigt de viscosité η_1 et d'élasticité k_1 mis en série avec un amortisseur de viscosité

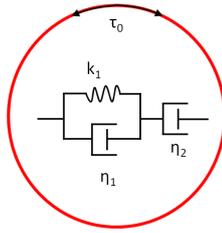


FIGURE 13.14 – Schéma du modèle rhéologique choisi pour les cellules.

η_2 . À l'instant initial d'application de la contrainte, ce modèle est équivalent à deux viscosités en série et il ne montre donc aucune déformation instantanée. Aux temps courts, il présente une relaxation visco-élastique rapide due à l'élément de Kelvin-Voigt, qui a donc un temps caractéristique $T_1 = \eta_1/k_1$ inférieur au temps de déformation de l'amortisseur $T_2 = \eta_2/\Delta P$ dans la gamme de pression utilisée. Aux temps longs, il se déforme quelque soit la contrainte appliquée, donnant son caractère fluide à l'objet.

La loi constitutive de ce matériau s'écrit :

$$\left(1 + \frac{\eta_1}{\eta_2}\right) \dot{\sigma} + \frac{k_1}{\eta_2} \sigma = k_1 \dot{\epsilon} + \eta_1 \ddot{\epsilon} \quad (13.13)$$

Cette loi, définie pour les tenseurs $\boldsymbol{\sigma}$ et $\boldsymbol{\epsilon}$, est valable pour les valeurs moyennes $\langle \sigma_{xx} \rangle(t)$ et $\langle \epsilon_{xx} \rangle(t)$ déterminées plus haut.

Dans la suite de ce rapport, pour simplifier les écritures, nous changeons le dénomination des variables :

- $\langle \sigma_{xx} \rangle(t)$ devient $\sigma(t)$
- $\langle \epsilon_{xx} \rangle(t)$ devient $\epsilon(t)$

13.4 Entrée de cellules sans tension

Les cellules traitées à la latrunculine offrent un cas d'étude intéressant. Les expériences de mesure de pression critique montrent en effet que la tension corticale de ces cellules est inférieure à $8pN \cdot \mu m^{-1}$, soit environ deux ordres de grandeur en dessous de la tension des cellules normales. Nous considérons alors que le traitement à la latrunculine annule la tension des cellules : courber la membrane de ces cellules ne demande aucune énergie.

Dans un premier temps, nous étudions l'entrée et les courbes de déformation des cellules traitées à la latrunculine en détail. Nous résolvons alors le modèle pour ce type particulier de cellules. Nous analysons alors les valeurs rhéologiques mesurées.

13.4.1 Observations expérimentales

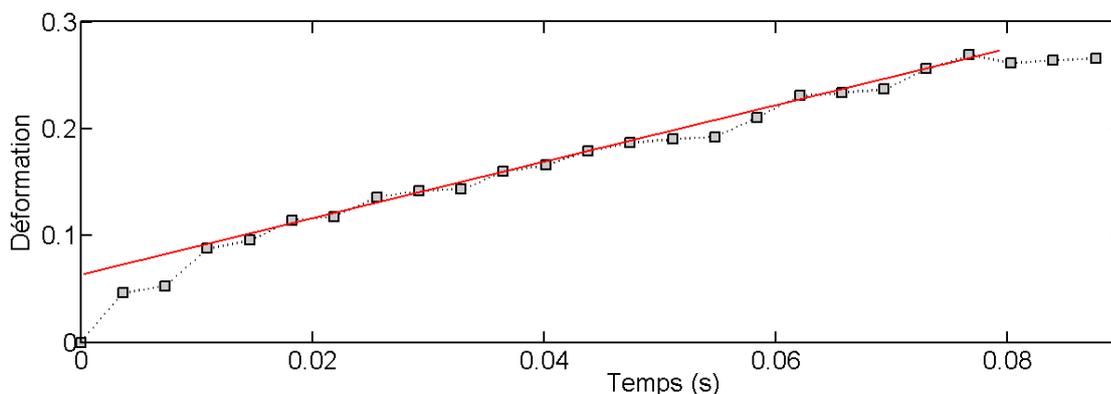


FIGURE 13.15 – Amplitude de la déformation d’une cellule traitée à la latrunculine lors de son entrée dans le réseau en fonction du temps. Pression totale : 40mb . Largeur des canaux : $9\mu\text{m}$. Diamètre de la cellule : $16.3\mu\text{m}$.

La figure 13.15 représente la déformation en fonction du temps d’une cellule de $16.3\mu\text{m}$ dans un canal de $9\mu\text{m}$ avec une dépression globale de 40mb . Nous observons tout d’abord une augmentation rapide de la déformation pour des temps allant de 0 à 20 ms. La hauteur du plateau de déformation atteint vaut ici environ 6%. Il varie d’une cellule à l’autre, allant de 2% à 13% de déformation. La courbe se poursuit ensuite sur une croissance linéaire (Fig. 13.15, ligne rouge) qui dure généralement jusqu’à la pénétration complète de la cellule dans le canal.

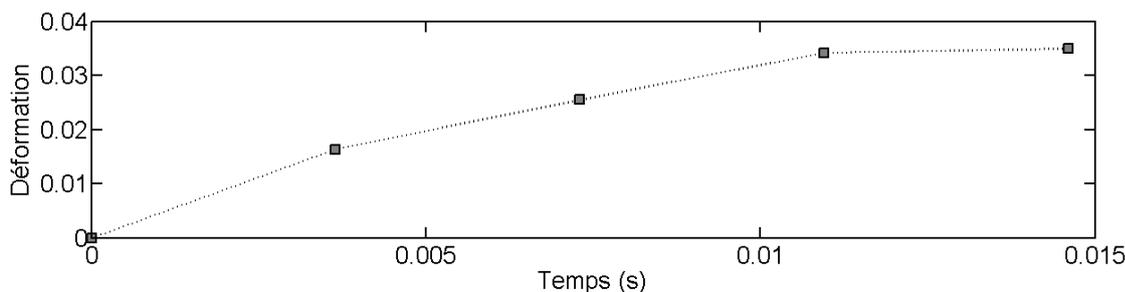


FIGURE 13.16 – Amplitude de la déformation d’une cellule traitée à la latrunculine lors de son entrée dans le réseau en fonction du temps. Pression totale : 20mb . Largeur des canaux : $12.7\mu\text{m}$. Diamètre de la cellule : $16.1\mu\text{m}$.

Lorsque les cellules sont très peu déformées ou lorsque l’entrée est trop rapide, on n’a accès qu’au premier régime de déformation. La figure 13.16 montre ainsi une telle déformation, pour une cellule de $16.1\mu\text{m}$ dans un canal de $12.7\mu\text{m}$ sous une dépression de 20mb . Dans ce cas, l’entrée totale dure aussi longtemps que le régime de déformation rapide de la figure 13.15, indiquant que seul ce régime rapide est visible sur la figure 13.16. Dans un délai si court, la partie linéaire est alors invisible.

13.4.2 Expression de la déformation

Nous considérons la tension des cellules traitées à la latrunculine comme nulle. La contrainte qui s'applique sur la cellule est donc simplement la pression aux bornes de la cellule, calculée à partir de l'équation 12.1 :

$$\sigma(t) = \Delta P_{cell} = 1.7 \frac{\Delta P_{tot}}{50}$$

L'équation 13.13, constitutive du modèle rhéologique, se simplifie alors et devient :

$$\frac{k_1}{\eta_2} \Delta P_{canal} = k_1 \dot{\epsilon} + \eta_1 \ddot{\epsilon} \quad (13.14)$$

Nous devons déterminer les conditions initiales du système pour pouvoir résoudre l'équation 13.14. La première vise la déformation initiale qui doit être nulle. La seconde concerne la vitesse de déformation initiale. En regardant la réponse du système à des temps infiniment courts, il devient équivalent à deux amortisseurs branchés en série. La vitesse de déformation initiale sera donc $\dot{\epsilon} = \Delta P_{canal} (1/\eta_1 + 1/\eta_2)$.

La résolution de l'équation 13.14 avec les conditions initiales donne alors :

$$\epsilon(t) = \frac{\Delta P_{canal}}{k_1} \left(1 - e^{-\frac{k_1 t}{\eta_1}} \right) + \frac{\Delta P_{canal}}{\eta_2} t \quad (13.15)$$

Cette fonction contient deux termes, chacun associé à un régime de déformation spécifique. Le terme exponentiel correspond à la déformation rapide initiale, observée sur la figure 13.15. Le terme linéaire décrit quant à lui la croissante linéaire que nous observons dans la deuxième partie de la courbe. Sur la figure 13.16, nous n'observons que la partie de déformation rapide initiale. Dans ce cas, le temps de l'expérience T_e est trop court devant le temps caractéristique d'apparition du régime linéaire η_2/k_1 . La formule de la déformation se simplifie alors :

$$\epsilon(t) \approx \frac{\Delta P_{canal}}{k_1} \left(1 - e^{-\frac{k_1 t}{\eta_1}} \right) \quad \text{pour } t < \frac{\eta_2}{k_1} \quad (13.16)$$

Ajustement des données expérimentales La procédure d'ajustement des données est la suivante :

- Nous affichons la courbe $\epsilon(t)$ sur toute l'entrée et nous sélectionnons les points valables. Ce sont les points appartenant aux régimes de fortes déformations, correspondant donc à $t < T_{sigma}$.

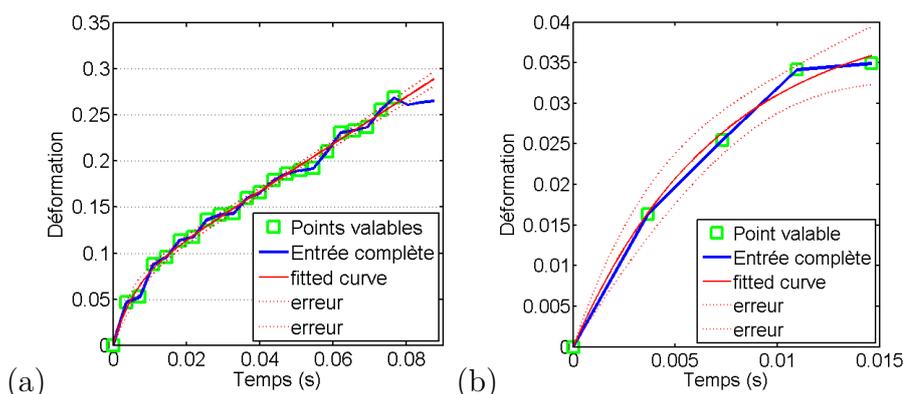


FIGURE 13.17 – Exemple de l’ajustement de la formule $\epsilon(t)$ sur la courbe de déformation expérimentale pour des cellules traitées à la latrunculine. (a) Formule complète. Diamètre de la cellule : $16.3\mu\text{m}$. Largeur des canaux : $9\mu\text{m}$. Pression totale : 40mb. (b) Formule tronquée aux temps courts. Diamètre de la cellule : $16.1\mu\text{m}$. Largeur des canaux : $12.7\mu\text{m}$. Pression totale : 20mb.

- Matlab réalise un ajustement avec chacune des formules de déformation du modèle en utilisant une méthode de minimisation des moindres carrés non linéaires.
- Les résultats des deux ajustements sont affichés avec les valeurs du coefficient de détermination r^2 . L’expérimentateur décide alors quelle formule est valable. Il doit pour cela répondre à la question : le modèle complet apporte-t-il une meilleure description de la courbe que le modèle à temps court ? Si la réponse est affirmative, nous gardons le modèle complet.

Des exemples de deux ajustements sont fournis dans la figure 13.17. Il s’agit du résultat de l’ajustement des courbes des figures 13.15 et 13.16. La première est ajustée par la fonction $\epsilon_{fit} = \delta(1 - e^{-t/T}) + VT$ (où $\delta = \Delta P_{cell}/k_1$, $T = \eta_1/k_1$ et $V = \Delta P_{cell}/\eta_2$) avec laquelle on mesure les paramètres suivants : $k_1 = 1830 \pm 320Pa$, $\eta_1 = 14 \pm 9Pa.s$ et $\eta_2 = 58 \pm 5Pa.s$. La seconde est ajustée par la fonction $\epsilon_{fit} = \delta(1 - e^{-t/T})$ et donne $k_1 = 1650 \pm 390Pa$ et $\eta_1 = 12 \pm 9Pa.s$.

A la recherche des ordres de grandeur, nous conservons, après ajustement, toutes les valeurs dont l’incertitude de l’ajustement donne une erreur inférieure à 100%. Les valeurs du coefficient de détermination r^2 sont toutefois toujours supérieures à 96%.

13.4.3 Valeurs rhéologiques

Les valeurs rhéologiques sont déterminées à partir de l’analyse des courbes de 16 cellules traitées à la latrunculine, parmi lesquels 10 sont décrites par la formule 13.15.

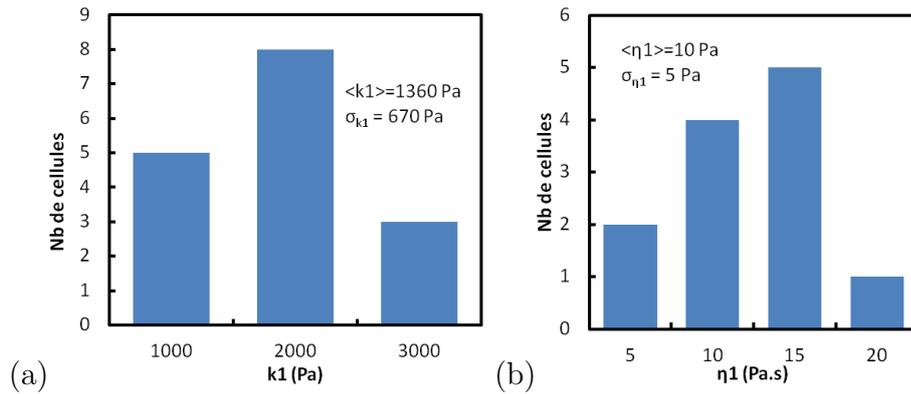


FIGURE 13.18 – (a) Histogramme des valeurs de l'élasticité mesurées pour les cellules traitées à la latrunculine. (b) Histogramme des valeurs de la première viscosité mesurées pour les cellules traitées à la latrunculine.

Elasticité La figure 13.18a montre un histogramme des valeurs d'élasticité obtenues pour les cellules traitées à la latrunculine. Nous déterminons des valeurs de k_1 assez variées, allant de $550Pa$ à $2450Pa$. L'élasticité moyenne est de $1356Pa$, avec une déviation standard de $671Pa$.

Nous comparons nos valeurs aux expériences de Rosenbluth et al. [82] qui mesurent les modules d'Young de divers types de leukocytes avec un microscope à force atomique. Les auteurs mesurent des valeurs d'une centaine de pascals pour les neutrophiles, mais jusqu'à $1400Pa$ pour des cellules HL-60 tirées d'une leucémie. La valeur moyenne de k_1 des THP-1 est du même ordre de grandeur que les mesures du module de Young, ce qui valide le choix d'un élément de Kelvin-Voigt comme composant élastique du modèle.

Première viscosité La figure 13.18b représente l'histogramme des valeurs de η_1 des cellules traitées à la latrunculine, distribuées entre 2 et $20Pa.s$. La viscosité moyenne est de $10Pa.s$ avec une déviation standard de $5Pa$.

Les valeurs de η_1 déterminées sont compatibles avec ce qui a été trouvé pour des neutrophiles dans le cas de petites déformations [84, 93]. Les auteurs réalisent des expériences de micropipettes et modélisent les cellules par un solide visco-élastique standard, qui est semblable à l'élément Kelvin-Voigt inclus dans notre modèle.

Seconde viscosité La figure 13.19 présente les valeurs de la seconde viscosité η_2 mesurées sur 10 cellules en fonction du rapport $\frac{T_e}{J_{tot}}$, avec des valeurs de η_2 se répartissant entre 15 et $80Pa.s$. Les barres d'erreur correspondent à l'incertitude venant de la méthode d'ajustement. Les séries de points, obtenues pour deux pressions différentes, sont situées sur une droite très proche de la première bissectrice du repère, indiquant une très bonne corrélation entre η_2 et $\frac{T_e}{J_{tot}}$.

Les expériences de petites déformations sur des neutrophiles, en utilisant un

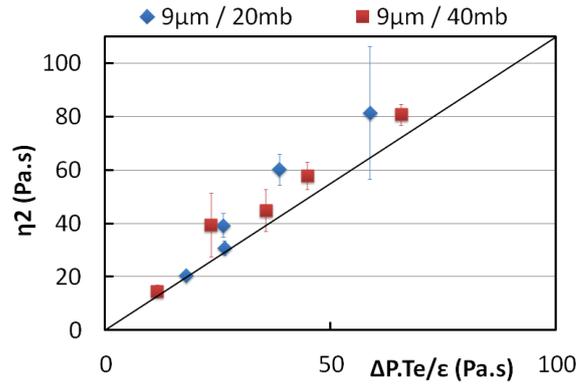


FIGURE 13.19 – Valeur du second coefficient de viscosité des cellules traitées à la latrunculine en fonction de $\frac{\Delta P.T_e}{\epsilon_{tot}}$. La droite noire est la première bissectrice du repère

modèle de goutte visqueuse, mesurent des valeurs d'approximativement $70 Pa.s$ [34, 44] qui sont du même ordre de grandeur que les valeurs mesurées pour η_2 . Dans une certaine mesure, nous pouvons aussi comparer les valeurs de η_2 avec les valeurs d'une centaine de $Pa.s$ obtenues lors de l'application de grandes déformations [30, 70]. Dans les deux cas, les auteurs utilisent un modèle de gouttes visqueuses encapsulées dans une membrane à tension constante, qui est une approximation de notre modèle aux temps longs. Les différentes viscosités concernent donc bien le même élément rhéologique.

L'évolution de η_2 est tracée en fonction de T_e/J_{tot} , déterminé pour l'entrée globale. T_e/J_{tot} est l'équivalent d'une viscosité. Ce serait strictement la viscosité du système s'il était newtonien et si la contrainte appliquée pendant l'entrée était constante. Malgré ces fortes limitations on observe que les points expérimentaux sont très proches de la bissectrice, soit η_2 quasi égal à T_e/J_{tot} . Ce résultat indique que, lors de l'entrée des cellules, leur modèle rhéologique se confond aux temps longs avec un modèle de goutte visqueuse. Cela confirme, d'une part, la validité du choix d'un amortisseur lors de l'élaboration du modèle rhéologique des cellules. Cela montre, d'autre part, que l'élément Kelvin-Voigt n'a que très peu d'importance sur la déformation lorsque les cellules se déforment pendant un temps assez long, c'est-à-dire pour $t \gg \eta_2/k_1$.

Dans le cas de cellules traitées à la latrunculine, nous montrons comment mesurer les paramètres rhéologiques des cellules en se basant sur un modèle rhéologique proposé à partir des observations. Malgré les hypothèses fortes que nous faisons sur la déformation et la contrainte dans la cellule, les valeurs déterminées sont en bon accord avec les valeurs trouvées dans la littérature pour des cellules semblables, validant l'approche faite ici. Après analyse des différents paramètres, nous observons que l'entrée des cellules est principalement dirigée par la seconde viscosité. Nous montrons alors que nous pouvons obtenir une très bonne approximation de

η_2 à partir des variables globales de l'entrée : $\eta_2 \approx \frac{T_e}{J_{tot}}$.

13.5 Entrée des cellules avec tension

Les courbes de déformation observées pour les cellules normales et les cellules traitées à la jaspakolinolide sont très semblables à celles des cellules à la latrunculine : déformation rapide au début de l'entrée, puis linéaire pour les cellules subissant des déformations suffisamment importantes.

Or, les cellules normales et les cellules traitées à la jaspakolinolide ont une tension corticale qui n'est pas négligeable par rapport à celles des cellules traitées à la latrunculine. Le modèle rhéologique permettant de rendre compte de leur déformation au cours du temps lors de leur entrée dans le canal doit prendre en compte cette tension lors de l'intégration de l'équation 13.13, même si l'allure des courbes de déformation en fonction du temps est qualitativement similaire à celle des courbes observées sur les cellules traitées à la latrunculine.

13.5.1 Modèle rhéologique associé

Résolution La tension des cellules n'est pas négligeable, la contrainte n'est donc plus constante lors de leur entrée dans le canal. Elle est inférieure à ΔP_{canal} au début de l'entrée et croît au fur et à mesure de l'avancée des cellules dans le canal. Nous rappelons que, d'après la forme de la courbe 13.13, nous choisissons empiriquement une forme linéaire pour la contrainte :

$$\sigma(t) = \Delta P_{cell} - \tau_0 (\alpha - \beta.t)$$

avec α et β deux réels positifs. Ces deux coefficients sont mesurés sur les courbes de chaque cellule. α est de l'ordre de $2/l - 2/D_{cell}$ et β de l'ordre de α/T_e .

En incluant l'expression de la contrainte dans l'équation 13.13, l'équation différentielle du système devient :

$$\left(1 + \frac{\eta_1}{\eta_2}\right) \tau_0 \beta + \frac{k_1}{\eta_2} (\Delta P_{cell} - \tau_0 (\alpha - \beta.t)) = k_1 \dot{\epsilon} + \eta_1 \ddot{\epsilon} \quad (13.17)$$

Les conditions initiales sont les mêmes que pour les cellules traitées à la latrunculine :

$$\begin{aligned} \epsilon(0) &= 0 \\ \dot{\epsilon}(0) &= \sigma(0) \left(\frac{1}{\eta_1} + \frac{1}{\eta_2}\right) = (\Delta P_{cell} - \tau_0 \alpha) \left(\frac{1}{\eta_1} + \frac{1}{\eta_2}\right) \end{aligned} \quad (13.18)$$

La résolution de l'équation différentielle 13.13 avec les conditions initiales 13.18 donne :

$$\begin{aligned} \epsilon(t) = \frac{1}{k_1} & \left[\Delta P_{cell} - \tau_0 \left(\alpha + \beta \frac{\eta_1}{k_1} \right) \right] \left(1 - e^{-\frac{k_1 t}{\eta_1}} \right) \\ & + \frac{\tau_0 \beta}{k_1} .t + \frac{\Delta P_{cell} - \tau_0 \alpha}{\eta_2} .t + \frac{\tau_0 \beta}{2\eta_2} .t^2 \end{aligned} \quad (13.19)$$

Grandes déformations Les courbes de déformations présentées dans la figure 13.11 ne montrent qu'une croissance finale linéaire. Nous étudions donc les valeurs relatives des différents termes de la formule 13.19 afin d'étudier si les conditions de leur apparition sont remplies.

Étudions tout d'abord les deux termes d'évolution dûs à la variation de contrainte. En réponse à l'augmentation de $\sigma(t)$, l'un traduit la réponse de l'élasticité $\epsilon_{elasticité} = \frac{\tau_0 \beta}{k_1} .t$, l'autre la réponse de la seconde viscosité $\epsilon_{viscosité} = \frac{\tau_0 \beta}{2\eta_2} .t^2$. Leur valeur relative vaut :

$$\frac{\epsilon_{elasticité}}{\epsilon_{viscosité}} = \frac{2\eta_2}{k_1 .t} \quad (13.20)$$

Ce rapport fait apparaître un temps seuil d'apparition du régime quadratique $T_{quad} = 2\eta_2/k_1$. Pour $t < T_{quad}$, le terme dû à l'élasticité est dominant. Dans le cas contraire, le terme parabolique de la viscosité l'emporte. Pour une élasticité $k_1 \sim 1000 Pa$ et une viscosité $\eta_2 \sim 50 Pa.s$, tirées des valeurs pour les cellules traitées à la latrunculine, on estime $T_{quad} \sim 0.1s$.

Le temps de validité de l'approximation sur la contrainte T_σ est de l'ordre de T_{quad} et ne permet pas la visualisation du régime de déformation parabolique sur la figure 13.11. En règle générale, même pour les cellules montrant des temps d'entrée $T_e \sim 1s$, T_σ n'est jamais significativement supérieur à T_{quad} . Le terme quadratique est alors toujours négligeable et la formule 13.19 se réduit à :

$$\begin{aligned} \epsilon(t) \approx \frac{1}{k_1} & \left[\Delta P_{cell} - \tau_0 \left(\alpha + \beta \frac{\eta_1}{k_1} \right) \right] \left(1 - e^{-\frac{k_1 t}{\eta_1}} \right) \\ & + \frac{\tau_0 \beta}{k_1} .t + \frac{\Delta P_{cell} - \tau_0 \alpha}{\eta_2} .t \end{aligned} \quad (13.21)$$

L'ajustement de la formule 13.21 sur des données expérimentales nécessite l'utilisation d'une fonction de la forme $\epsilon_{fit}(t) = \delta.(1 - e^{-t/T}) + V.t$. Nous disposons alors de trois paramètres d'ajustement pour mesurer quatre paramètres physiques. Le système est indéterminé et ne peut pas fournir une série de valeurs pour la rhéologie.

Nous étudions alors la valeur relative des deux termes de variation linéaire de la formule 13.21, dont le rapport s'écrit :

$$\frac{V_{visc}}{V_{el}} = \frac{\frac{\Delta P_{cell} - \tau_0 \alpha}{\eta_2}}{\frac{\tau_0 \beta}{k_1}} = \frac{k_1}{\eta_2} \cdot \frac{\Delta P - \tau_0 \alpha}{\tau_0 \beta} \quad (13.22)$$

$\tau_0 \alpha$ est la pression critique d'entrée des cellules ΔP_c , et β de l'ordre de α/T_e . Le rapport des vitesses de déformation devient donc :

$$\frac{V_{visc}}{V_{el}} = \frac{k_1 \cdot T_e}{\eta_2} \cdot \left(\frac{\Delta P_{cell}}{\Delta P_c} - 1 \right) \quad (13.23)$$

Les pressions critiques mesurées pour les cellules normales sont approximativement de $30Pa$, pour des pressions appliquées aux bornes des cellules comprises entre 60 et $120Pa$, d'où $\frac{\Delta P}{P_c} - 1 \sim 1$. En prenant $k \sim 1000$, $T_e \sim [0.01 - 1]$ et $\eta_2 \sim [10 - 100]$, on trouve $V_{visc}/V_{el} \sim 0.1 - 100$. De manière générale, nous ne pouvons donc pas négliger l'une des vitesses de déformation par rapport à l'autre.

Pour les cellules subissant de grandes déformations, il existe une indétermination du système qui rend impossible la détermination des paramètres rhéologiques du système. Seule la détermination du temps caractéristique $T_c = \eta_1/k_1$, indépendante des conditions expérimentales et de la vitesse de déformation linéaire, est accessible.

Petites déformations Pour de nombreuses cellules, dont $T_e \sim T_c$, nous n'observons que le régime de déformation rapide initial, comme sur la figure 13.16 pour les cellules traitées à la latrunculine. Il s'agit de cellules présentant les plus petites déformations, avec ϵ_{tot} inférieur à 15%. Nous pouvons dans ce cas négliger la partie linéaire dans la formule 13.21.

Les cellules présentant ce comportement sont petites et peu déformées : elles montrent une déformation finale $\epsilon_{tot} < 0.15$ et une taille $D_{cell} < 1.5.l$. Dans ce cas, d'après la figure 13.2a, la pression critique des cellules est presque nulle. Cela implique que $\tau_0 \alpha \ll 1$. Comme $T_c \sim T_e$, on en déduit que $\tau_0 \beta = \tau_0 \alpha T_c / T_e \ll 1$. La formule 13.21 se simplifie alors et devient égale à la formule 13.16 décrivant la déformation des cellules traitées à la latrunculine dans le cas où $T_e < \eta_2/k_1$

Pour les petites cellules présentant de faibles déformations, nous pouvons donc mesurer les paramètres rhéologiques de la partie Kelvin-Voigt du modèle rhéologique : l'élasticité k_1 et la viscosité η_1 . Les autres paramètres, η_2 et τ_0 , restent inaccessibles à nos observations.

Ajustement des données expérimentales La procédure d'ajustement des données expérimentales pour les cellules pourvues d'une tension corticale est la suivante :

- Nous affichons la courbe $\epsilon(t)$ sur toute l'entrée et nous sélectionnons les points valables. Ce sont les points appartenant au régime déformant, correspondant donc à $t < T_\sigma$.
- Matlab réalise un ajustement avec deux fonctions $\epsilon_{fit} = \delta.(1 - e^{-t/T})$ et $\epsilon_{fit} = \delta.(1 - e^{-t/T}) + V.t$ en utilisant une méthode de minimisation des moindres carrés non linéaires.
- Les résultats des deux ajustements sont affichés avec les valeurs du coefficient de détermination r^2 . L'expérimentateur décide alors quelle formule est valable, en répondant à la question : le modèle complet apporte-t-il une meilleure description de la courbe que le modèle à temps court ?
- Si le modèle pour les faibles déformations est valable, on en déduit les valeurs de k_1 et η_1 .
- Si le modèle avec la croissance linéaire est valable, on ne peut en déduire que la valeur de $T_c = \eta_1/k_1$.

Comme pour les valeurs à la latrunculine, on accepte toutes les valeurs dont l'incertitude de l'ajustement est inférieure à 100%. Les coefficients de détermination r^2 ont une valeur moyenne de 91% et une déviation standard de 9%.

13.5.2 Valeurs rhéologiques

Nous procédons à l'ajustement du modèle pour toutes les cellules disponibles : 41 cellules normales (dont 22 en petites déformations), 69 cellules traitées à la jasplakinolide (dont 20 en petites déformations). Nous rappelons au lecteur que les cellules traitées à la latrunculine comptent 17 ajustements (dont 6 en petites déformations).

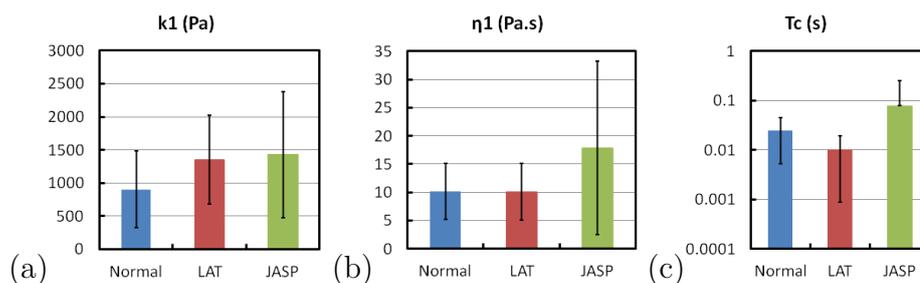


FIGURE 13.20 – (a) Valeur de l'élasticité moyenne $\langle k_1 \rangle$ pour les trois groupes de cellules. Les barres d'erreur représentent la déviation standard. (b) Valeur de la première viscosité $\langle \eta_1 \rangle$ moyenne pour les trois groupes de cellules. Les barres d'erreur représentent la déviation standard. (c) Valeur du temps caractéristique T_c moyen pour les trois groupes de cellules. Les barres d'erreur représentent la déviation standard.

Valeurs rhéologiques moyennes La figure 13.20 trace les valeurs moyennes des paramètres rhéologiques de l'élément Kelvin-Voigt pour les trois groupes de

cellules étudiées. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de la distribution des valeurs.

Les élasticités des cellules normales et traitées à la jasplakinolide respectent les ordres de grandeur des valeurs rhéologiques obtenues avec les cellules traitées à la latrunculine. L'élasticité k_1 est ainsi de l'ordre de $1kPa$, la viscosité η_1 de l'ordre de $10Pa.s$. Le temps caractéristique, mesuré pour un nombre plus important de cellules, est bien de l'ordre de $10ms$, indiquant qu'il n'y a pas de changement entre les cellules à petites déformations, pour lesquelles on mesure les valeurs individuelles k_1 et η_1 , et les cellules à grandes déformations, pour lesquelles on ne peut mesurer que T_c . On n'observe pas de différence significative de ces trois valeurs entre les trois groupes de cellules. Les traitements par les toxines n'ont donc pas d'effet global détectable sur les paramètres k_1 et η_1 .

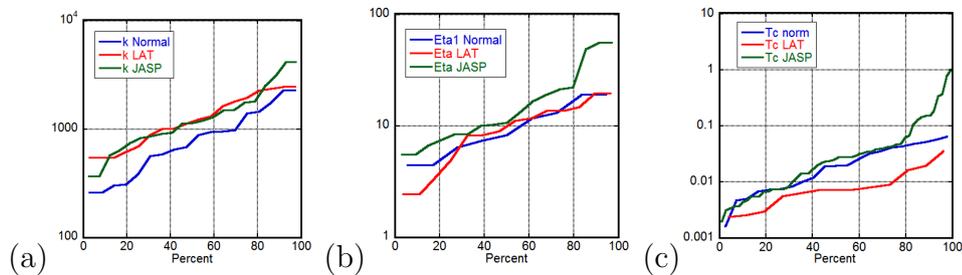


FIGURE 13.21 – (a) Valeur de l'élasticité moyenne $\langle k_1 \rangle$ pour les trois groupes de cellules. Les barres d'erreur représentent la déviation standard. (b) Valeur de la première viscosité $\langle \eta_1 \rangle$ moyenne pour les trois groupes de cellules. Les barres d'erreur représentent la déviation standard. (c) Valeur du temps caractéristique T_c moyen pour les trois groupes de cellules. Les barres d'erreur représentent la déviation standard.

Distribution Les distributions cumulatives des trois paramètres rhéologiques k_1 , η_1 et T_c sont tracées sur la figure 13.21 pour les trois types de cellules. Ces courbes indiquent le pourcentage de cellules (sur l'axe des abscisses) possédant une valeur inférieure ou égale à Y (sur l'axe des ordonnées).

Nous retrouvons que les traitements par les toxines n'induisent pas d'effet significatif sur les valeurs moyennes de k_1 et η_1 . Une différence apparaît sur la figure 13.21c avec 20% des cellules dont la viscosité est supérieure d'un ordre de grandeur pour les cellules traitées à la jasplakinolide. Cet effet reste encore à comprendre et à confirmer.

13.6 Retour sur le temps d'entrée

L'analyse de la dynamique de l'entrée des cellules dans un canal nous a conduit à proposer un modèle rhéologique pour les cellules et à en déduire certains paramètres rhéologiques des cellules, en fonction de la déformation subie. Nous revenons

maintenant à l'étude de l'entrée globale, à la lumière cette fois du modèle rhéologique afin de tenter d'expliquer la forme des courbes obtenues pour le temps d'entrée.

13.6.1 Lien avec le modèle rhéologique

L'entrée complète de la cellule est décrite, selon la formule 13.19, par le point $t = T_e$:

$$\begin{aligned} \epsilon(T_e) = & \frac{1}{k} [\Delta P_{cell} - \tau_0 (\alpha + \beta T_c)] \left(1 - e^{-\frac{T_e}{T_c}}\right) \\ & + \frac{\tau_0 \beta}{k} T_e + \frac{\Delta P_{cell} - \tau_0 \alpha}{\eta_2} T_e + \frac{\tau_0 \beta}{2 \eta_2} T_e^2 \end{aligned} \quad (13.24)$$

β est la vitesse de variation de la contrainte lors de l'entrée de la cellule, dont nous prenons comme approximation $\beta \approx \alpha/T_e$. Nous injectons cette valeur dans l'équation 13.24 qui devient alors :

$$\begin{aligned} \epsilon_{tot} \approx & \frac{1}{k_1} \left[\Delta P_{cell} - \tau_0 \alpha \left(1 + \frac{T_c}{T_e}\right) \right] \left(1 - e^{-\frac{T_e}{T_c}}\right) \\ & + \frac{\tau_0 \alpha}{k_1} + \left(\Delta P_{cell} - \frac{\tau_0 \alpha}{2} \right) \frac{T_e}{\eta_2} \end{aligned} \quad (13.25)$$

Cette équation connaît deux régimes en fonction du temps, autour de $T_c = \eta_1/k_1$. Pour $T_e \gg T_c$, la visco-élasticité de l'élément de Kelvin-Voigt est complètement relaxée et nous pouvons négliger l'exponentielle. Pour $T_e \ll T_c$, nous linéarisons l'exponentielle autour de 0. Nous rappelons de plus que les cellules montrant $T_e \ll T_c$ sont les cellules dont la pression critique $\Delta P_c = \tau_0 \alpha$ est négligeable. En calculant la valeur du pseudo-fluage, nous obtenons :

$$J_{tot}(T_e \ll T_c) \approx \left(\frac{1}{\eta_1} + \frac{1}{\eta_2} \right) T_e \quad (13.26)$$

$$J_{tot}(T_e \gg T_c) \approx \frac{1}{k_1} + \frac{1 - \frac{\tau_0 \alpha}{2 \Delta P_{cell}}}{\eta_2} T_e \quad (13.27)$$

Le modèle prévoit ainsi un régime proportionnel à T_e pour les temps courts, indépendamment de la valeur de la tension.

Pour les cellules traitées à la latrunculine, la tension est très faible et nous la négligeons. L'équation du pseudo-fluage pour les temps longs devient alors :

$$J_{tot}(T_e \gg T_c) = \frac{1}{k_1} + \frac{T_e}{\eta_2} \quad (13.28)$$

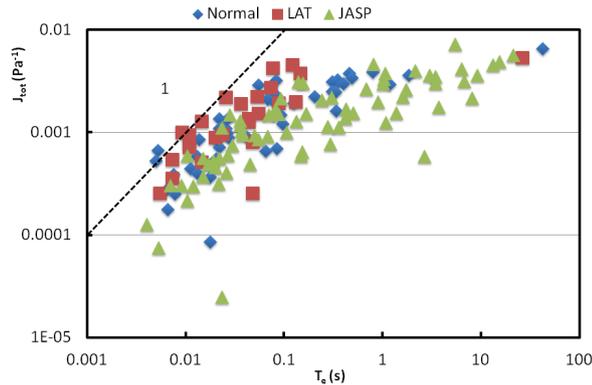


FIGURE 13.22 – Pseudo-fluage $\frac{\epsilon_{tot}}{\Delta P_{cell}}$ en fonction du temps d'entrée. La ligne noire est un guide pour l'oeil représentant une fonction proportionnelle à T_e .

13.6.2 Forme des courbes

Nous traçons sur la figure 13.22 les valeurs du pseudo-fluage en fonction du temps d'entrée pour toutes les cellules. Pour des temps courts, inférieurs à 0.2, la variation des courbes pour les trois types de cellules correspond bien à une dépendance du type $J_{tot} \propto T_e$: la variation en échelle logarithmique est identique à celle de la droite de pente 1, tracé comme guide pour l'oeil. Les trois types de cellules ont donc un comportement équivalent pour les temps courts.

Les effets des traitements biochimiques se font ressentir pour les temps longs $T_e > 0.2s$. Les points des trois groupes de cellules se séparent, laissant apparaître des différences d'un facteur 100 dans les temps d'entrée adoptés [36]. Les variations du pseudo-fluage J_{tot} en fonction du temps d'entrée ne sont toutefois plus linéaires. Ces variations ne sont donc plus expliquées par le modèle rhéologique. La cause de la divergence est à chercher autour de T_σ , le temps de validité de l'approximation de variation linéaire de la contrainte. Ce temps n'est comparable à T_e que pour les cellules à faible déformation totale. Pour les plus grandes déformations, l'écart peut être important. Or, cette période est prise en compte par les mesures de ϵ_{tot} et T_e , mais pas par la formule de contrainte effective $\sigma(t)$. Nous pensons donc qu'une prise en compte plus précise de la contrainte appliquée sur la cellule pourraient permettre une description plus précise de l'entrée globale.

13.6.3 Viscosité effective

Les mesures de viscosités sur les cellules traitées à la latrunculine nous apprennent que nous pouvons obtenir une très bonne estimation de η_2 en calculant le rapport $\frac{T_e}{J_{tot}}$. Pour les autres types de cellules pourvues d'une tension corticale, il ne fournit pas la mesure de η_2 à proprement parler, mais traduit tout de même les propriétés de déformations aux temps long des cellules.

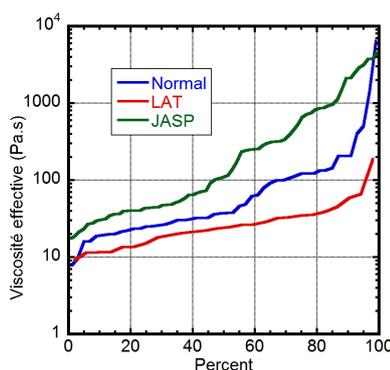


FIGURE 13.23 – Distribution cumulative de la viscosité effective $\frac{\Delta P_{cell} T_e}{\epsilon_{tot}}$ pour les 3 types de cellules.

Sur la figure, nous traçons les distributions cumulatives des valeurs de la viscosité effective pour les 3 groupes de cellules. Nous observons une séparation des courbes, montrant les cellules traitées à la latrunculine comme les moins visqueuses et les cellules traitées à la jasplakinolide comme les plus visqueuses. Les valeurs moyennes des viscosités effectives sont respectivement $\eta_{eff}^{LAT} = 32.5 \pm 6.8 Pa.s$, $\eta_{eff}^{Norm} = 231.4 \pm 129.2 Pa.s$, $\eta_{eff}^{JASP} = 570.72 \pm 117.57 Pa.s$.

La viscosité effective est donc sensiblement différentes entre les 3 types de cellules. Il semble par ailleurs que le traitement à la jasplakinolide diminue la déformabilité des cellules en réduisant leurs capacités de déformation aux temps longs. La latrunculine semble avoir l'effet inverse. Il n'est toutefois pas possible de déterminer l'origine de cet effet : variation de la tension uniquement ou variation de la seconde viscosité.

13.7 Expérience de micropipettes traditionnelles

Nous cherchons à comparer et appuyer nos expériences d'entrée de cellules par des expériences de micropipettes traditionnelles sur nos cellules. Après avoir présenté le principe des expériences et des calculs permettant une mesure de paramètres rhéologiques, nous présenterons les résultats obtenus sur des cellules THP-1 non-traitées.

Contrairement aux expériences de microfluidique réalisées à 37°C, les expériences d'aspiration avec des micropipettes sont réalisées à température ambiante. Il s'agit d'un paramètre important pour la rhéologie et il faudra en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Pierre-Henri Puech.

13.7.1 Principe de l'expérience

On aspire les cellules THP-1 à l'intérieur d'une pipette grâce à une pression constante et contrôlée. Les pipettes utilisées ont un rayon de $5\mu m$ et $7.5\mu m$, les cellules un rayon moyen de $15\mu m$.

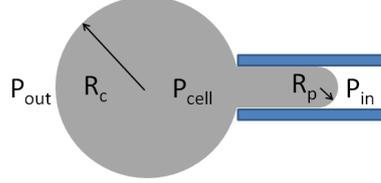


FIGURE 13.24 – Schéma de l'entrée d'une cellule (en gris) dans une micropipette (en bleu).

Contrainte appliquée La contrainte sur la cellule est définie avec une formule équivalente à la formule 13.10. Pour les micropipettes, on doit simplement changer une approximation sur les rayons de courbure de la cellule. Le système ayant une symétrie de révolution autour de l'axe de la pipette, les rayons de courbure verticaux sont égaux aux rayons de courbure horizontaux, à l'avant et à l'arrière de la cellule. On trouve ainsi :

$$\sigma = \Delta P_{cell} - 2\tau_0 \left(\frac{1}{R_{avant}} - \frac{1}{R_{arrière}} \right) \quad (13.29)$$

L'entrée d'une cellule est schématisée sur la figure 13.24. Le diamètre de la pipette étant constant, on a $R_{avant} = R_p$. De plus, les pipettes sont choisies pour être petites devant la cellule. La déformation créée lorsque la cellule est aspirée est alors en général assez faible pour que $R_{arrière} \approx R_{cell}$ à chaque instant. La contrainte est alors constante et vaut :

$$\sigma = \Delta P_{cell} - 2\tau_0 \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_{cell}} \right) \quad (13.30)$$

où la pression critique d'entrée apparait alors comme :

$$\Delta P_c = 2\tau_0 \left(\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_{cell}} \right) \quad (13.31)$$

Cette formule esquisse alors une méthode d'expérience permettant de déterminer la tension de l'objet étudié. En effet, on peut appliquer dans un premier temps une différence de pression pour aspirer la cellule, puis rétablir l'équilibre et observer la rétractation de la cellule. Dans les deux cas, les contraintes effectives agissant sur la cellule sont dépendantes de la tension : $\sigma_+ = \Delta P_{cell} - 2\tau_0 (1/R_p - 1/R_{cell})$ à l'aller et $\sigma_- = -2\tau_0 (1/R_p - 1/R_{cell})$ au retour. Ce type d'expérience permet d'allier les mesures des paramètres rhéologiques à la mesure de la tension en une seule manipulation de la cellule.

Modèle A priori la dynamique d'aspiration obéit au même modèle rhéologique que pour les expériences microfluidiques précédentes. Nous cherchons donc les équations applicables de ce modèle pour les micropipettes.

Pour cela, nous adaptions les formules d'évolution de $L(t)$ utilisées par Guevorkian et al. [39]. Les auteurs utilisent un modèle composé d'un solide visco-élastique standard branché en série à un amortisseur. Notre modèle rhéologique correspond simplement à la limite $k_2 \rightarrow \infty$, permettant de transformer l'élément de modèle standard en élément de modèle Kelvin-Voigt.

Nous ne pouvons toutefois pas appliquer le modèle complet. En effet, le dispositif expérimental à disposition ne permet pas d'établir la différence de pression sur la cellule en moins d'une seconde : c'est le temps nécessaire pour descendre le réservoir d'eau de la hauteur voulue. Or, si le temps d'établissement de la contrainte est plus grand que le temps caractéristique du matériau, alors l'augmentation initiale de la longueur de la langue sera due à l'augmentation de la contrainte, et non à la réaction visco-élastique du matériau. On utilise donc seulement le régime final de la déformation. Pour l'aller et le retour, les formules s'écrivent :

$$\frac{L_a(t)}{R_p} \approx \frac{\Delta P_a - \Delta P_c}{k_1} + \frac{\Delta P_a - \Delta P_c}{3\pi\eta_2} t \quad (13.32)$$

$$\frac{L_r(t)}{R_p} \approx \frac{L_0}{R_p} + \frac{\Delta P_r - \Delta P_c}{k_1} + \frac{\Delta P_r - \Delta P_c}{3\pi\eta_2} t \quad (13.33)$$

où L_a (resp. L_r) est la longueur de la cellule à l'aller (resp. au retour), ΔP_a (resp. ΔP_r) la dépression appliquée à l'aller (resp. au retour) et L_0/R_p la longueur initiale de la langue au moment de la rétractation. On cherche donc maintenant à déterminer deux droites à partir de la courbe de $L(t)$.

13.7.2 Résultats

Obtention des courbes $L(t)$ La figure 13.25 montre un kymographe réalisé à partir d'un film d'aspiration de cellule. Il s'agit d'une représentation picturale de l'évolution temporelle de la langue de la cellule. Pour la réaliser, on sélectionne une ligne de pixel d'intérêt dans le film. Le kymographe final sera créé par la juxtaposition de cette ligne prise sur toutes les images d'un film. Dans notre cas, la ligne sélectionnée est alignée selon l'axe de la pipette, au centre pour suivre l'évolution du front de la langue de la cellule. Finalement, sur la figure 13.25, l'axe horizontal représente le temps, le vertical représente l'abscisse curviligne selon la ligne de pixel choisie.

Pour en déduire la longueur de la langue, nous avons besoin de deux courbes : la position absolue du front de la langue (ligne rouge sur la figure 13.25) et la position du bout de la pipette (ligne verte). Lors des expériences, en effet, il n'est

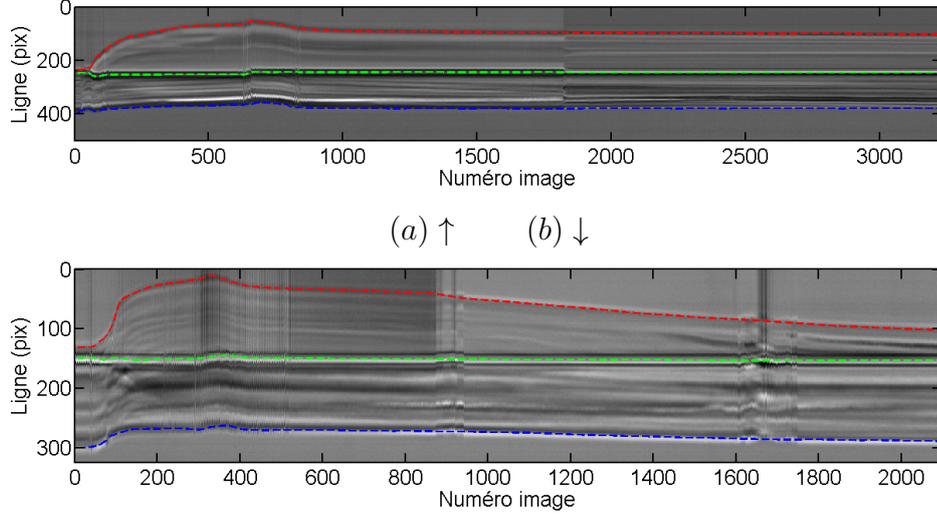


FIGURE 13.25 – Kymographe de deux cellules entrant dans une pipette de $5\mu\text{m}$. $D_{cell} = 13.8\mu\text{m}$, Pression de 1334Pa . Les lignes rouges représentent les positions du front de la cellule dans la pipette, les lignes vertes la position de l'extrémité de la pipette, les lignes bleues la position de l'arrière de la cellule

pas impossible d'avoir à bouger la pipette pour obtenir un meilleur centrage et une meilleure mise au point de l'image. Il est donc important de suivre la position de la pipette en fonction du temps pour gagner en précision.

Avec ces courbes, nous calculons la longueur de la langue $L(t) = x_{front}(t) - x_{pipette}(t)$. Nous mesurons alors les équations de deux droites : la droite d'avancée du front L_a , visible par exemple sur la figure 13.25a entre les images 200 et 350, et la droite de rétractation L_r , visible sur la même figure de 1000 jusqu'à la fin.

Tension Nous obtenons la pression critique et la tension à partir des formules suivantes :

$$\Delta P_c = \frac{\frac{\Delta P_a}{L_a} - \frac{\Delta P_r}{L_r}}{\frac{1}{L_a} - \frac{1}{L_r}} \quad \Rightarrow \quad \tau_0 = \frac{1}{2} \frac{\Delta P_c}{\frac{1}{R_p} - \frac{1}{R_{cell}}} \quad (13.34)$$

Nous traçons les valeurs de tension obtenues sur la figure 13.26, avec les valeurs de tension déterminées par microfluidique. Les valeurs de τ_0 sont réparties entre 100 et $1000\text{pN}/\mu\text{m}$. Elles correspondent toutefois aux valeurs déterminées par mesure de pression critique dans les réseaux.

Comme nous l'avons noté dans la partie 13.1.1, la tension mesurée dépend de la force appliquée à la cellule (Fig. 13.1.1b). Avec les micropipettes, nous utilisons deux forces pour mesurer la tension : la pression à l'aller, et la relaxation naturelle au retour. D'une part, cette dualité des forces appliquées empêche d'observer

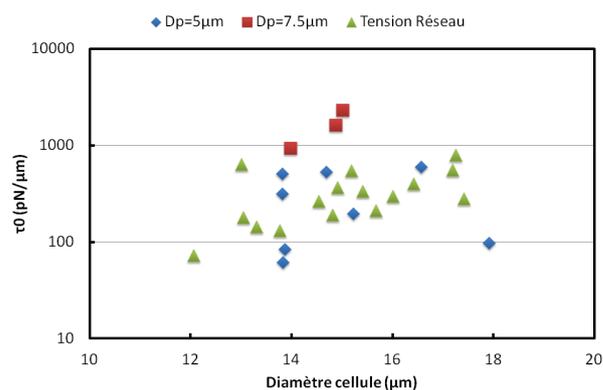


FIGURE 13.26 – Tension corticale mesurée avec les micropipettes et avec les réseaux microfluidiques.

la dépendance de la tension avec la force. D'autres part, elle fait certainement changer la tension en cours d'expérience, ce qui explique la dispersité des mesures.

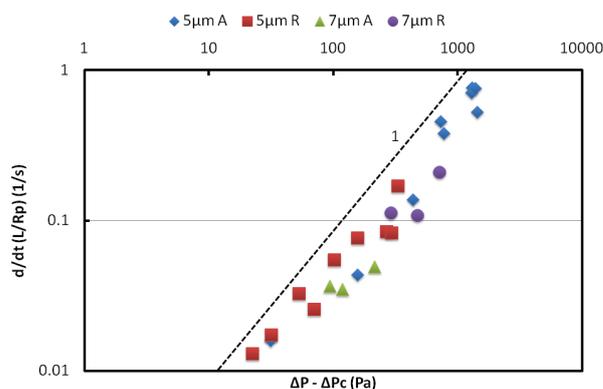


FIGURE 13.27 – $\frac{L}{R_p}$ en fonction de $\sigma = \Delta P_i - \Delta P_c$. Dans la légende, "A" réfère à Aller, "R" à Retour.

Viscosité Pour mesurer la viscosité du système, nous traçons la contrainte appliquée en fonction de la vitesse de déformation mesurée, visualisée sur la figure 13.27. Les points s'alignent selon une droite, ce qui indique que la viscosité des cellules ne change pas beaucoup d'un individu à l'autre. Un ajustement affine donne $\eta_2 = 198 \pm 15 Pa.s$ à température ambiante. Cette valeur s'accorde bien avec les $210 Pa.s$ mesurés sur des granulocytes [112, 30] ainsi qu'avec les $139 Pa.s$ obtenus pour des neutrophiles [70].

13.8 Discussion

Nous couplons des expériences de pression critique sur des cellules normales et traitées à la latrunculine, une analyse d'un temps d'entrée global dans le canal

en proposant des courbes maîtresses de pseudo-fluage à contrainte non constante et une analyse de la dynamique d'entrée dans le canal sur les trois populations de cellules normales et traitées. Dans ce dernier cas, nous proposons un modèle viscoélastique permettant de décrire les courbes expérimentales. Le modèle est celui d'une membrane sous une tension constante encapsulant un matériau de Kelvin-Voigt couplé en série avec un amortisseur. Nous faisons finalement quelques expériences de micropipettes à température ambiante pour les cellules non traitées.

13.8.1 Latrunculine et choix du modèle

Nous avons tout d'abord montré que la tension des cellules traitées à la latrunculine est négligeable. Nous pouvons donc supposer que l'effet de la drogue est de dépolymériser l'actine corticale.

Nous avons ensuite montré que la contribution de Kelvin-Voigt est associée aux faibles déformations et aux dynamiques rapides. La seconde viscosité est sensible pour des déformations plus importantes, et dans des temps plus longs. Les valeurs trouvées sont compatibles avec celles reportées dans la littérature.

En effet, les expériences menées par Schmid-Schönbein et al. étudient la rhéologie de neutrophiles soumis à de petites déformations, en aspiration [84] et en relaxation [93]. Avec un modèle de solide standard, ils mesurent des viscosités de l'ordre $10 Pa.s$, compatibles avec les valeurs de η_1 mesurées ici. Les expériences à plus fortes déformations [30] révèlent des viscosités plus importantes, $200 Pa.s$ à $23^\circ C$ sur des granulocytes. Ils montrent de plus que la viscosité dépend de la température, avec une variation similaire à une loi d'Arrhénius $\eta = \eta_0 e^{\frac{E}{k_B T}}$, et donne une viscosité d'environ $100 Pa.s$ à $37^\circ C$. Nos expériences déterminent une viscosité moyenne de $200 Pa.s$ à température ambiante par micropipette et des viscosités η_2 comprises entre 20 et $80 Pa.s$ dans les microcanaux avec des cellules traitées à la latrunculine à $37^\circ C$. La comparaison ne doit cependant pas aller plus loin que les ordres de grandeur. Il ne s'agit en effet pas des mêmes types de cellules.

13.8.2 Tension et effet des drogues

La présence de la tension corticale limite l'exploitation des courbes de dynamique de l'entrée dans le canal. Nous mesurons néanmoins le temps caractéristique de la partie Kelvin-Voigt, et, dans les cas des cellules ne subissant qu'une petite déformation, nous pouvons de plus mesurer les valeurs de k_1 et η_1 .

13.8.3 Effet du traitement des cellules

Dans le cadre du modèle proposé, la partie Kelvin-Voigt associée aux faibles et rapides déformations ne semble pas sensible au traitement par les toxines. Le

temps d'entrée total est dépendant du traitement mais il est difficile de savoir si la cause provient de la perturbation de la seconde viscosité par le traitement biochimique ou de l'effet de la tension de la membrane.

En effet, la tension de la membrane, sensible au traitement biochimique, a pour effet de résister à la déformation de la membrane et donc de transmettre une force de déformation à l'intérieur de la cellule plus faible que la force externe. En d'autres termes, la tension réduit la force externe appliquée à l'intérieur de la membrane et donc réduit la déformation.

L'origine de la viscosité η_2 n'est pas élucidée mais elle pourrait être liée à la viscosité du noyau car elle ne contribue à la déformation que lorsque le taux de déformation est grand, et est associé à une véritable déformation du noyau. Elle serait dans ce cas peu sensible au traitement. Prendre en compte le noyau nécessite aussi de prendre en compte la tension de la membrane nucléaire, à base de filaments intermédiaires et donc insensible aux toxines. C'est cette membrane qui pourrait être alors à l'origine de la lente relaxation des cellules observée lorsque la contrainte de déformation est annulée.

Notre modèle rhéologique propose des paramètres rhéologiques qui semblent pertinents pour décrire la dynamique des cellules dans des microréseaux. Les résultats sont difficiles à comparer avec la littérature car les cellules et les géométries des expériences rapportées sont différentes mais ils sont cohérents avec les valeurs rhéologiques rapportées. Bien que cohérent sur les expériences que nous avons menées, ce modèle reste aujourd'hui une conjoncture nécessitant des mesures complémentaires. Il paraît crucial maintenant d'imager les éléments du cytosquelette et le noyau lors des expériences pour valider cette approche.

Chapitre 14

Régime transitoire

Une fois entrées dans le réseau, les cellules sont transportées dans le réseau de microcanaux. Elles présentent alors, au début du parcours, une phase d'adaptation au mouvement au cours duquel leur trajectoire est parfois irrégulière et leur vitesse moyenne plus faible qu'à la fin. C'est ce régime que l'on qualifie de transitoire, en opposition au régime stationnaire observé par la suite.

Nous présentons tout d'abord les caractéristiques précises de ce régime transitoire, en terme de trajectoire, de forme et de vitesse. Nous poursuivons ensuite sur une étude des temps caractéristiques du système afin de comprendre quelles relaxations sont possibles, et quelles déformations sont conservées au cours du mouvement. Nous discutons enfin le scénario de stabilisation du mouvement des cellules, que nous comparons à ce que nous observons pour des vésicules et des billes de gels.

14.1 Variabilité des trajectoires

La visualisation la plus directe du régime transitoire concerne les trajectoires des cellules, qui présentent une grande diversité des chemins suivis entre les cellules. Après avoir décrit les phénomènes observés, nous nous intéressons à l'effet que peuvent avoir les traitements sur les cellules pour finalement comparer les taux de stabilisation de la trajectoire en fonction du type de traitement appliqué et du confinement géométrique.

14.1.1 Description des trajectoires

Sur la figure 14.1, nous rassemblons les trajectoires de plusieurs cellules évoluant dans des petits canaux de $8.6\mu m$ sous une dépression globale de $20mb$. Pour gagner en lisibilité, et parce que le choix du premier virage n'a a priori pas d'im-

portance sur le reste du mouvement, toutes les trajectoires sont redressées afin de faire coïncider le premier canal des trajectoires et de faire commencer toutes les trajectoires par un virage à gauche. Pour finir, nous normalisons les distances réelles, en microns, par les distances entre les canaux. Toutes les cellules commencent alors leur mouvement par un canal en $(0,0)$ et effectuent leur premier virage vers le canal $(1,1)$.

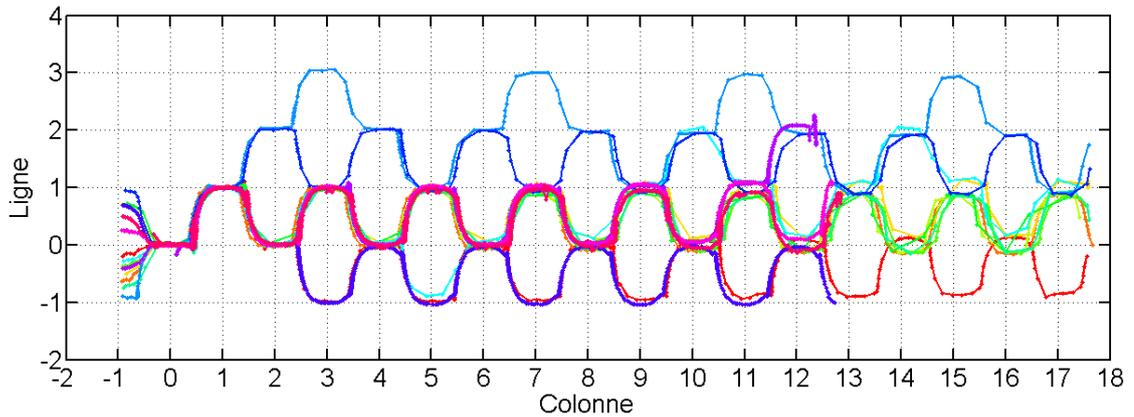


FIGURE 14.1 – Trajectoire de différentes cellules dans des réseaux de largeur inférieure à $11\mu m$ sous une dépression de $20mb$. Pour que ces trajets se recouvrent, nous plaçons le premier canal à l'origine. De plus, certaines trajectoires sont inversées pour uniformiser la direction du premier virage.

La largeur de la figure, en terme de nombre de lignes visitées, résulte de l'effet que peut avoir le régime transitoire. Dans certains cas, le mouvement est droit dès le début : la cellule adopte directement une trajectoire similaire au régime stationnaire, dans lequel nous observons une stricte suite de virages à gauche et de virages à droite (Fig. 14.1, ensemble des courbes alternant entre les lignes 0 et 1). Dans d'autres cas, il faut plusieurs mailles à la cellule pour stabiliser son déplacement (Fig. 14.1, courbe violette en bas par exemple).

Pour finir, nous attirons l'attention du lecteur sur un cas aussi intéressant que marginal : parfois, les cellules adoptant une période de mouvement double. C'est le cas pour la courbe turquoise en haut de la figure 14.1, où le mouvement est constitué de deux virages à droite et deux virages à gauche, et visite ainsi les lignes 2-3-4-3-2. Ce comportement n'est pas fréquent, avec seulement trois occurrences sur les centaines de cellules observées au total. Toutefois, il montre bien la nécessité de considérer le transport des cellules dans le réseau comme un système dynamique dans lequel plusieurs modes peuvent exister.

14.1.2 Traitement sur les cellules

La figure 14.2 est construite de la même façon que la figure 14.1, mais pour les cellules traitées à la latrunculine. Le changement de comportement est majeur :

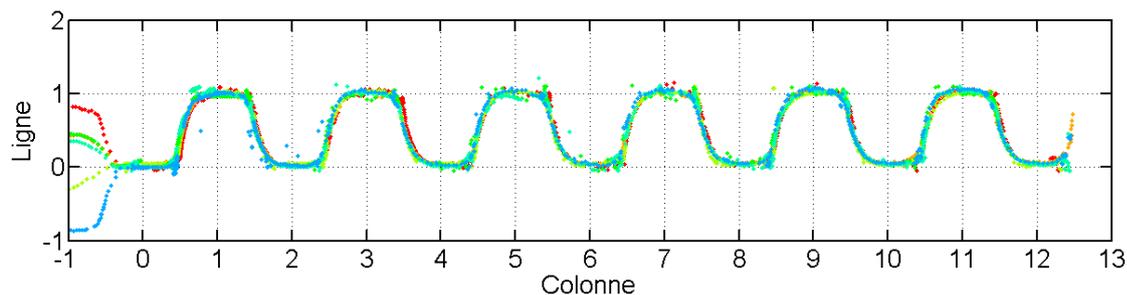


FIGURE 14.2 – Trajectoire de différentes cellules traitées à la latrunculine dans des réseaux de $9\mu m$ sous une dépression de $20mb$.

toutes les cellules adoptent directement une trajectoire droite et ne visitent que les lignes 0 et 1. Du point de vue de la trajectoire, il ne semble pas y avoir de régime transitoire.

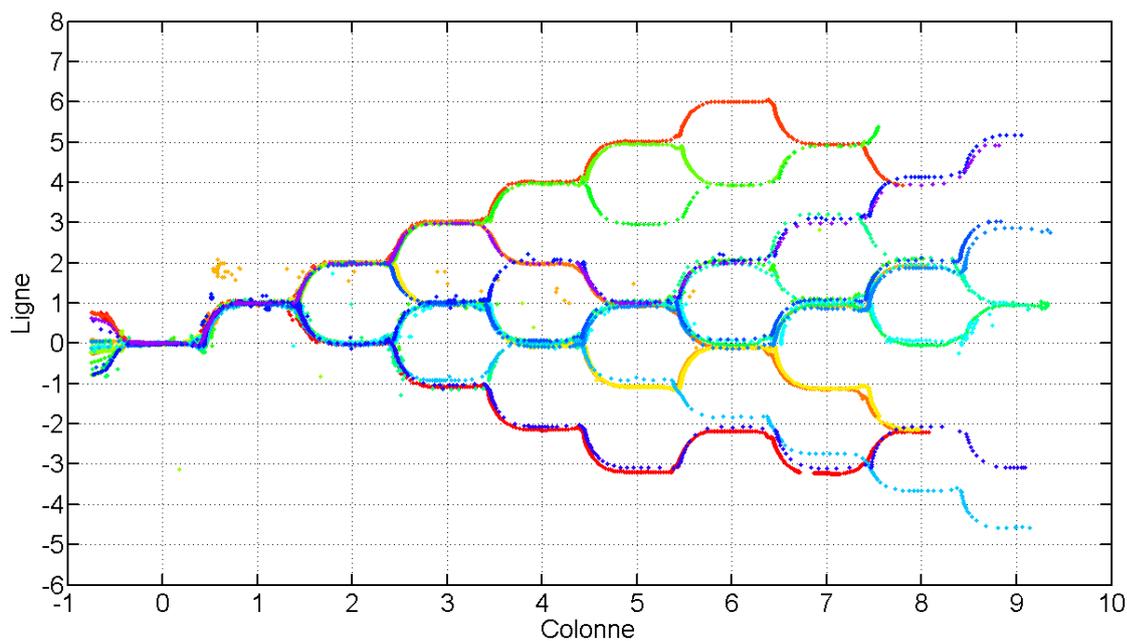


FIGURE 14.3 – Trajectoire de différentes cellules traitées à la jasplakinolide dans des réseaux de $8.6\mu m$ sous une dépression de $20mb$.

Les trajectoires des cellules traitées à la jasplakinolide, tracées sur la figure 14.3 présentent un comportement très irrégulier qui est clairement visualisé par la dispersion des courbes avant d'arriver au régime stationnaire.

14.1.3 Taux de stabilisation de la trajectoire

Pour quantifier la stabilisation de la trajectoire, nous calculons le taux de stabilisation des cellules. Il est défini comme le rapport du nombre de cellules ayant atteint le régime stationnaire sur le nombre total d'individus du groupe considéré. Nous séparons les cellules par largeur de canaux, ainsi que par traitement appliqué. Ainsi, les canaux de largeur inférieure à $11\mu m$ sont qualifiés de "Petit", les canaux supérieurs à $11\mu m$ sont qualifiés de "Grand".

	Latrunculine	Normale	Jasplakinolide
Petit	90% (n=19)	82 % (n=38)	42% (n=59)
Grand	100% (n=19)	89 % (n=35)	51% (n=41)
Moyenne	95% (n=38)	85 % (n=73)	46% (n=100)

TABLE 14.1 – Taux de stabilisation pour différents groupes de cellules. "Petit" désigne les canaux inférieurs à $11\mu m$ de largeur, "Grand" les canaux de largeur supérieure. "Moyenne" représente les résultats totaux. Le nombre d'individus est indiqué pour chaque catégorie.

Les différences de stabilisation de la trajectoire dues au traitement biochimique évoquées plus haut s'observent dans le tableau 14.1. Le taux de stabilisation diminue quand la polymérisation de l'actine augmente (en fonction des traitements) et semble augmenter un peu avec le degré de confinement des cellules.

14.2 Évolution des formes

Le confinement géométrique a un effet sur le taux de stabilisation des trajectoires. Nous étudions donc l'évolution de la forme des cellules dans le régime transitoire à partir du volume réduit, défini au chapitre 11 par $V_{red} = \frac{V_{cell}}{\frac{4}{3}\pi\left(\frac{S_{cell}}{4\pi}\right)^{\frac{3}{2}}}$.

14.2.1 Variation du volume réduit au sein d'une maille

Nous superposons les données obtenues à chaque maille du réseau sur une courbe unique, visible sur la figure 14.4. La taille d'une maille est de $46\mu m$. Les variations du volume réduit présentent deux maxima à $17\mu m$ et $28\mu m$ et deux minima à $0\mu m$ et $22.5\mu m$. Des photos de la cellule à ces différents instants sont incluses sur la figure.

Les minima, lorsque la cellule est la plus déformée, correspondent aux moments où la cellule traverse un canal, que ce soit un droit (à $0\mu m$) ou un diagonal (à $22.5\mu m$). Les valeurs du volume réduit atteintes sont très similaires, marquant un état de déformation équivalent dans les deux types de canaux. Il existe toutefois une plus grande variabilité dans les canaux diagonaux. Des deux types de canaux,

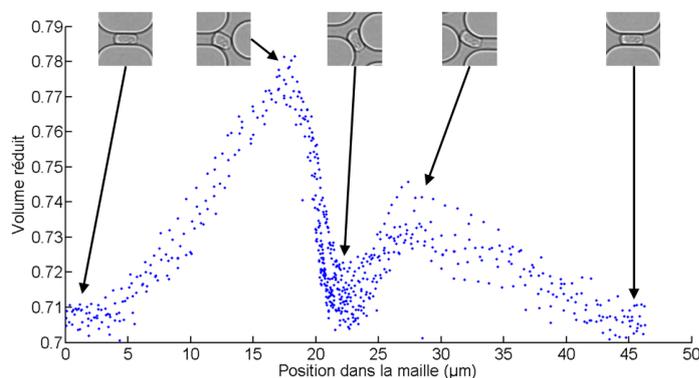


FIGURE 14.4 – Volume réduit d’une cellule en fonction de sa position relative dans la maille du réseau. $D_{cell} = 13.2\mu m$. $l = 8.6\mu m$. $\Delta P_{tot} = 40mb$. Les photos indiquent la forme de la cellule à différents instants du mouvement.

c’est en effet le canal diagonal qui impose le moins de contrainte géométrique à la cellule et laisse donc le plus de formes différentes accessibles à la cellule.

Les deux maxima sont atteints lorsque la cellule sort d’un canal. Ces hautes valeurs du volume réduit représentent la relaxation de la cellule lorsque le confinement diminue et que celle-ci reprend une forme plus circulaire. Les deux relaxations ne sont toutefois pas équivalentes. A $17\mu m$, la cellule sort d’un canal droit et entre en collision avec le plot suivant. Le choc avec le pilier déforme fortement la cellule et lui fait adopter rapidement une forme plus ronde, ce qui engendre des valeurs du volume réduit très grande. La relaxation à $28\mu m$ est beaucoup plus douce. En effet, dans ce cas, la cellule ne subit aucun choc avec le réseau et circule simplement du canal diagonal vers le canal droit. La relaxation qui apparaît alors est la relaxation naturelle de la cellule, différente de la relaxation forcée précédente. Cette relaxation naturelle est moins prononcée, et engendre donc un pic de volume réduit plus faible.

14.2.2 Variation du volume réduit d’une maille à une autre

Il est alors intéressant de comparer les courbes du volume réduit maille à maille pour étudier comment leur évolution.

Sur la figure 14.5 se trouvent les mêmes données de volume réduit qu’à la figure 14.4. Cette fois-ci cependant, nous traçons les valeurs de chaque maille d’une couleur différente. Les numéros de la légende indiquent le numéro spécifique de chaque maille.

Les valeurs des minima de volume réduit sont peu affectées par l’avancée de la cellule. Le volume réduit mesuré dans le canal droit (à $0\mu m$ dans la maille) ne change pas du tout. Celui correspondant aux canaux diagonaux diminue un peu, indiquant une légère adaptation de la cellule au passage de ces canaux particuliers.

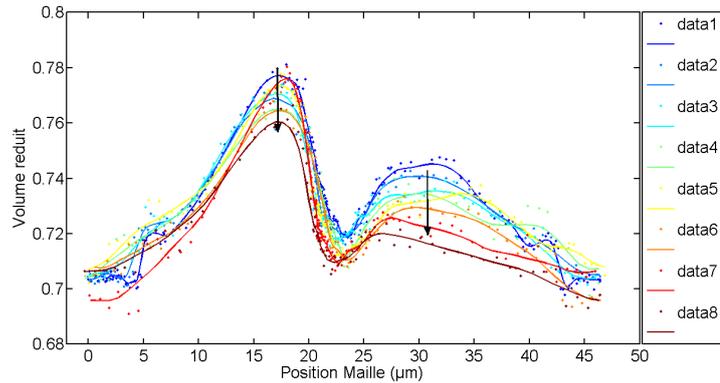


FIGURE 14.5 – Volume réduit d'une cellule en fonction de sa position relative dans la maille du réseau. $D_{cell} = 13.2\mu m$. $l = 8.6\mu m$. $\Delta P_{tot} = 40mb$. Les lignes sont les résultats d'une moyenne mobile sur 11 points, permettant d'accroître la visibilité. Le numéro de la courbe de la légende indique le numéro de la maille traversée.

Les effets les plus sensibles concernent les deux zones de relaxation décrites précédemment. Nous voyons en effet que le pic de volume réduit diminue au fur et à mesure que la cellule avance dans le réseau. Celle-ci, en sortant des canaux droits ou diagonaux, reprend une forme de moins en moins circulaire. Nous en déduisons que le choc contre le plot en sortie du canal droit est de moins en moins fort. De même, la relaxation naturelle de la cellule en sortie de canal diagonal est de plus en plus faible.

14.3 Évolution des vitesses

Le régime transitoire est la phase d'accélération des cellules avant d'atteindre le régime stationnaire. Nous caractérisons donc l'évolution de la vitesse des cellules en suivant la même approche "par maille" que précédemment.

14.3.1 Variation de la vitesse de la cellule au sein de la maille

La figure 14.6 représente les valeurs du module de la vitesse de la cellule en fonction de sa position relative dans la maille du réseau, ainsi que des images représentant la cellule à quelques instants particuliers. Comme pour le volume réduit, nous observons un fort lien entre vitesse de la cellule et confinement géométrique. La cellule montre deux pointes de vitesse à $14\mu m$ et $33\mu m$, ainsi que deux minima à $0\mu m$ et $21\mu m$.

Ces pointes correspondent aux moments où la cellule sort d'un canal. Le confinement se réduit alors et la cellule, qui a encore la forme profilée nécessaire pour traverser le canal, accélère fortement jusqu'à ce qu'elle rencontre le canal suivant.

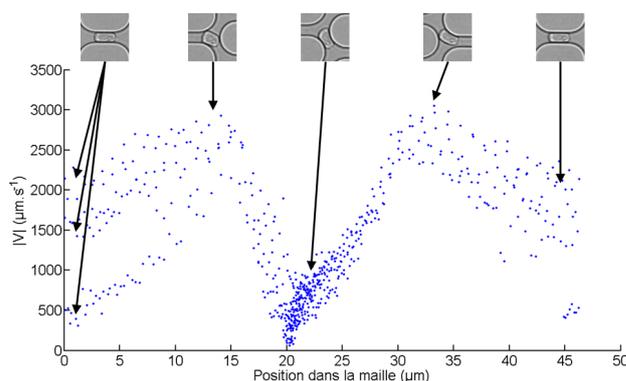


FIGURE 14.6 – Vitesse d’une cellule en fonction de sa position relative dans la maille du réseau. $D_{cell} = 13.2\mu m$. $l = 8.6\mu m$. $\Delta P_{tot} = 40mb$. Les photos indiquent la forme de la cellule à différents instants du mouvement.

Les minima de vitesse se rencontrent lorsque la cellule traverse les canaux. Dans le cas du canal diagonal, nous remarquons que le minimum de vitesse se situe entre 1 et $2\mu m$ avant la position du centre du canal, déterminée par la position du minimum de volume réduit visible sur la figure 14.4. Le minimum de vitesse correspond en fait au moment où la cellule entre en collision avec le pilier. Elle accélère ensuite régulièrement au fur et à mesure de son avancée dans le canal.

Il existe une différence importante de vitesse de la cellule entre le canal droit et le canal en diagonale. A priori, la largeur des canaux est la même et, à quelques effets de forme du canal près, la vitesse devrait être comparable. La différence de pression locale, appliquée aux bornes de la cellule lorsqu’elle bouche ces canaux, est toutefois différente entre les deux types de canaux. Comme nous l’avons vu au chapitre 12, nous mesurons seulement $0.7\Delta P_{maille}$ dans le canal en diagonale pour $1.7\Delta P_{maille}$ dans le canal droit. Les différences de vitesse de la cellule entre les deux canaux résultent donc en grande partie des différences de pression ressenties.

Il existe une différence importante de vitesse de la cellule entre le canal droit et le canal en diagonale car La différence de pression aux bornes de la cellule lorsqu’elle bouche ces canaux est seulement de $0.7\Delta P_{maille}$ dans le canal en diagonale pour $1.7\Delta P_{maille}$ dans le canal droit (voir chapitre 12) .

14.3.2 Vitesse d’une maille à l’autre

La figure 14.7 représente l’augmentation de la vitesse observée d’une maille à une autre. Nous pouvons observer une augmentation de la vitesse moyenne, correspondant à l’accession progressive au régime stationnaire.

L’augmentation de la vitesse la plus importante a lieu au centre du canal droit, à $0\mu m$. Cette augmentation progressive est liée à la diminution simultanée du volume réduit de la cellule en sortie de canal diagonal, à $30\mu m$ sur la figure 14.5.

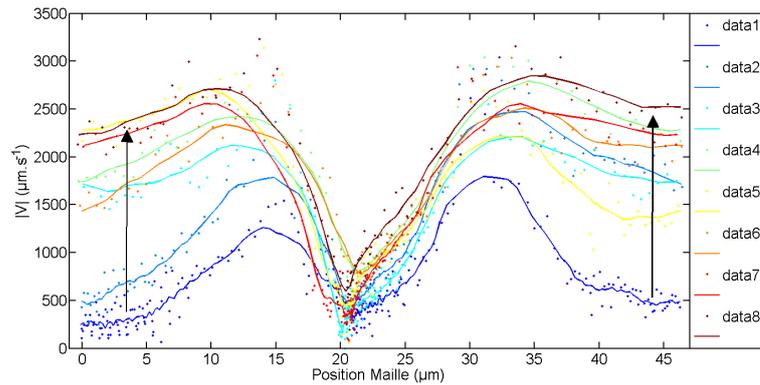


FIGURE 14.7 – Vitesse d’une cellule en fonction de sa position dans la maille du réseau. $D_{cell} = 13.2\mu m$. $l = 8.6\mu m$. $\Delta P_{tot} = 40mb$. Les lignes sont le résultat d’une moyenne mobile sur 11 points. Les numéros dans la légende indiquent le numéro de la maille traversée.

La persistance de la forme en sortie de canal diagonal aide la cellule à traverser le canal droit et lui permet d’acquérir une plus grande vitesse.

Le passage du canal diagonal reste le passage le plus lent du mouvement. En effet, l’arrêt à $21\mu m$ est identique pour toutes les mailles. L’accélération de la cellule après la collision contre le plot augmente toutefois avec l’avancée dans le canal, permettant à la cellule de reprendre plus rapidement sa vitesse. Cette plus forte accélération découle de la baisse du volume réduit, autour de $22.5\mu m$ sur la figure 14.5 : la cellule est de plus en plus étirée en traversant le canal diagonal, et nécessite donc une déformation plus faible pour reprendre son mouvement.

14.4 Mécanisme de stabilisation

Lors de son avancée dans le réseau, la cellule accélère progressivement grâce à des déformations successives. Nous cherchons maintenant à comprendre comment ces phénomènes se mettent en place. Nous étudions donc tout d’abord les différents processus apparaissant lors du mouvement de la cellule et engendrant des déformations plus ou moins grandes. Nous analysons ensuite les temps caractéristiques du système afin de comprendre comment les différentes dynamiques du système interagissent entre elles.

14.4.1 Marche vers l’équilibre

Évolution temporelle de la forme Nous représentons l’évolution temporelle du volume réduit d’une cellule sur la figure 14.8 pour laquelle nous rattachons des instantanés de la cellule à différents instants.

La diminution régulière du volume réduit en sortie de canal diagonal apparaît

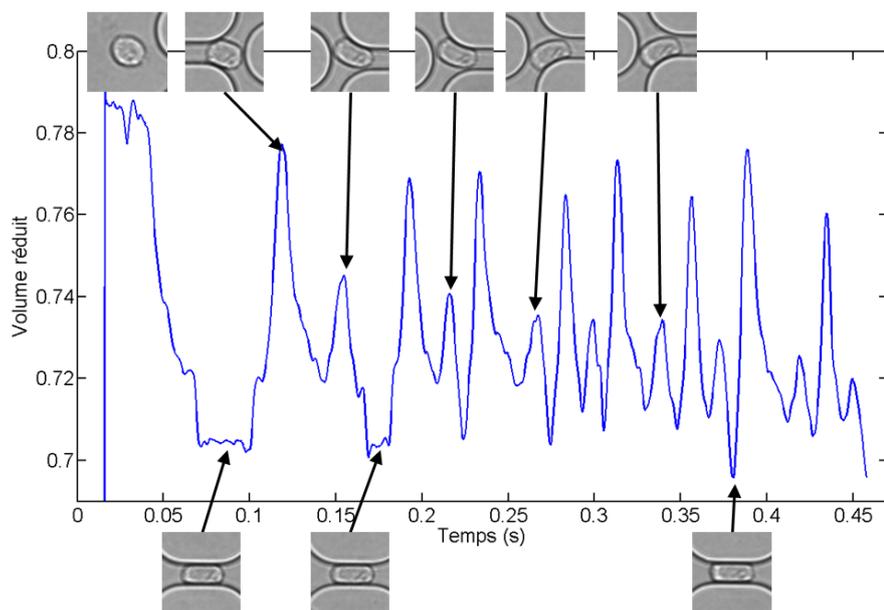


FIGURE 14.8 – Volume réduit de la cellule en fonction du temps. $D_{cell} = 13.2\mu m$. $l = 8.6\mu m$. $\Delta P_{tot} = 40mb$. Les points sont le résultat d'une moyenne mobile sur 11 points.

clairement : le plus petit des pics de volume réduit décroît régulièrement, passant de 0.745 à 0.72 entre le début et la fin de la traversée. Nous remarquons au passage la bonne sensibilité du volume réduit, qui montre une baisse visible sur la courbe alors que le changement de forme associé est presque imperceptible à l'oeil. La déformation dans le canal droit change peu d'une maille à l'autre : les minima de volume réduit conservent une valeur à peu près constante, autour de 0.7.

Le phénomène le plus intéressant a lieu en sortie de canal droit, lorsque la cellule entre en collision avec le pilier du réseau. Les valeurs maximales du volume réduit, autour de 0.77, présentent une oscillation dont l'amplitude croît avec le mouvement. Ces deux types de pics montrent que la déformation de la cellule contre le pilier n'est pas symétrique d'une maille à l'autre, mais sur une période de deux mailles.

Asymétrie des virages Pour mieux comprendre cette asymétrie, nous réalisons des photo-séquences des virages gauche et droite de deux cellules (Fig. 14.9). Pour chaque cellule, nous entourons d'une ellipse rouge le bourrelet apparaissant lorsque la cellule prend le virage le plus déformant, et donc associé au pic de volume réduit le plus haut. Les événements déformants se produisent indifféremment lors d'un virage à gauche ou un virage à droite.

Nous remarquons sur la figure 14.8 qu'il n'existe pas de corrélation entre les valeurs du volume réduit en sortie de canal diagonal et les oscillations des valeurs

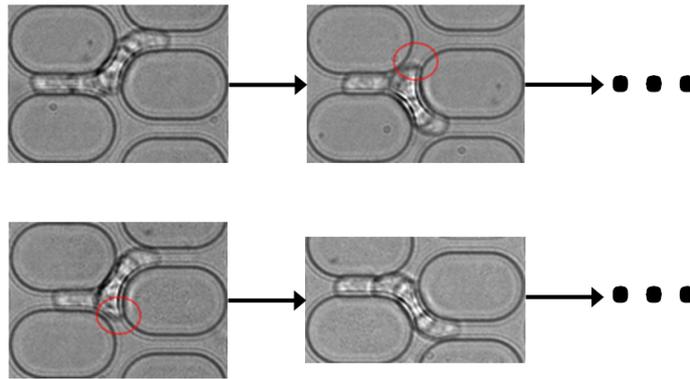


FIGURE 14.9 – Asymétrie entre les virages de deux cellules. Les zones de fortes déformations sont entourées en rouge. Haut : Les virages "à gauche" sont plus rapides et moins déformants que le virage à droite. Bas : Situation inverse. Le virage est plus aisé à droite qu'à gauche.

du volume réduit en sortie de canal droit. Cette variation des virages semble donc être un effet d'une asymétrie propre de la cellule et non un effet de l'écoulement.

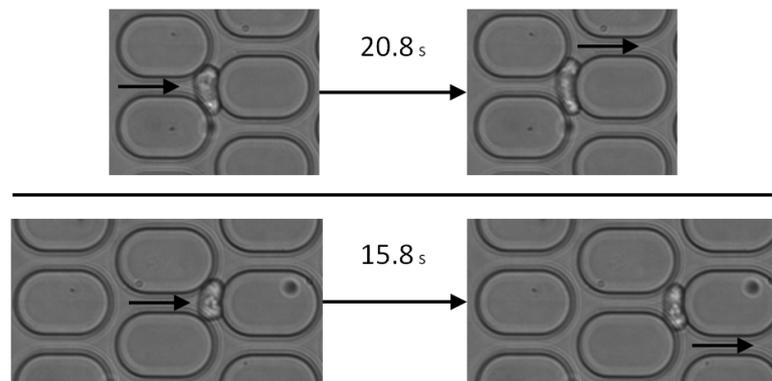


FIGURE 14.10 – Ecrasement de deux cellules contre le pilier en sortie de canal droit. La flèche noire en fin de phénomène indique le prochain canal emprunté. $l = 10.6\mu\text{m}$. $\Delta P_{tot} = 20\text{mb}$. Haut : $D_{cell} = 16.3\mu\text{m}$. Bas : $D_{cell} = 15.1\mu\text{m}$.

Écrasement Lors de la traversée des premiers canaux, la dissymétrie des virages peut être telle que la cellule s'arrête complètement lors d'une bifurcation. Nous montrons, dans la figure 14.10, deux situations où des cellules restent bloquées plusieurs dizaines de secondes contre un des piliers du réseau lors d'un virage. Elles sont alors soumises à la contrainte de l'écoulement à la jonction et subissent une déformation importante avant de reprendre leur mouvement dans le réseau.

Retournement Nous observons parfois un retournement de la cellule en sortie de canal droit (Fig. 14.11). Ce phénomène peut apparaître plusieurs fois lors du mouvement d'une cellule, mais toujours pendant son régime transitoire.

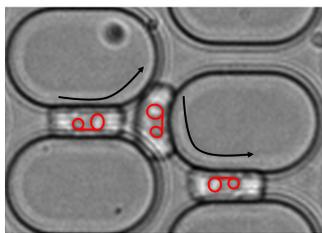


FIGURE 14.11 – Illustration du retournement d’une cellule lors d’un virage dans le réseau. La ligne rouge entoure deux zones très lumineuses de la cellule visibles sur l’image.

14.4.2 Temps caractéristiques

Les déformations cellulaires possibles au sein d’une maille et d’une maille à la suivante dépendent des temps caractéristiques rhéologiques de la cellule et de son mouvement. Nous exprimons ici les différents temps caractéristiques de déformations cellulaires qui peuvent être construits.

Nous pouvons tout d’abord définir un temps caractéristique de retard à la déformation de la partie Kelvin-Voigt du modèle qui s’exprime comme :

$$T_{KV} = \frac{\eta_1}{k_1} \quad (14.1)$$

Ensuite, nous définissons le temps caractéristique de déformation de l’amortisseur visqueux, qui est le temps nécessaire pour que le matériau ait une déformation de ϵ_{tot} sous une pression de ΔP_{maille} :

$$T_{vis} = \frac{\eta_2 \epsilon_{tot}}{\Delta P_{maille}} \quad (14.2)$$

Nous définissons aussi un temps caractéristique de relaxation de la déformation de η_2 sous l’effet de la tension de la membrane :

$$T_{relax} = \frac{\eta_2 \cdot R_{cell}}{\tau_0} \quad (14.3)$$

Il correspond au temps que prendrait une tension τ_0 pour faire relaxer un matériau de viscosité η_2 sur une distance caractéristique R_{cell} .

Enfin, ces temps caractéristiques de la rhéologie de la cellule sont à mettre en relation avec un temps caractéristique de l’écoulement, assimilable à la période de traversée d’une maille du réseau :

$$T_{écoul} = \frac{L_{maille}}{\langle V_{cell} \rangle} \quad (14.4)$$

où L_{maille} est la longueur caractéristique d’une maille, égale environ à $50\mu m$.

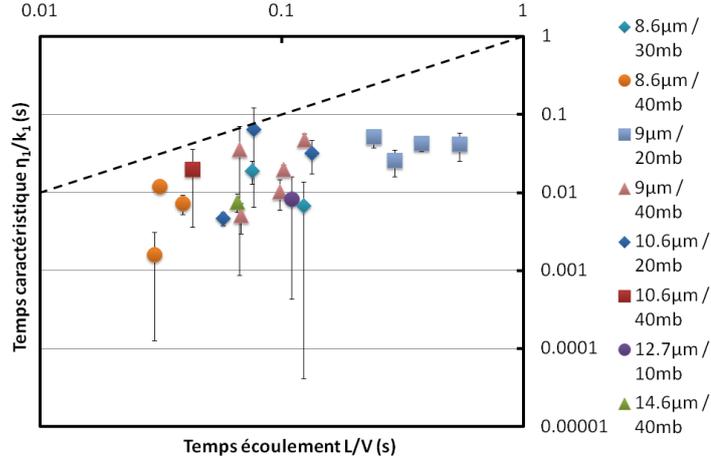


FIGURE 14.12 – Temps caractéristique de Kelvin-Voigt des cellules T_{KV} en fonction de leur temps caractéristique de l'écoulement $T_{écoul}$. Temps mesurés à partir de données du chapitre 13. La ligne noire est la première bissectrice du repère.

Nous pouvons tout d'abord comparer les valeurs de T_{KV} et $T_{écoul}$, que nous pouvons calculer individuellement pour les cellules à partir des données présentées au chapitre 13. Les deux grandeurs sont représentées l'une par rapport à l'autre sur la figure 14.12. Tous les points sont situés sous la bissectrice du graphique et indiquent que, pour toutes les cellules, nous avons toujours $T_{KV} < T_{écoul}$. La déformation et la relaxation de la partie Kelvin-Voigt de la cellule sont donc toujours plus rapides que le temps caractéristique pour passer d'une maille à l'autre.

Pour calculer le temps caractéristique de déformation du piston visqueux T_{vis} , nous nous référons à nos expériences de micropipettes et à la littérature [30, 70] à partir desquelles nous déduisons $\eta_2 \sim 100 Pa \cdot s$. Pour des pressions de maille $\Delta P_{maille} \sim 100 Pa$ et des déformations finales $\epsilon_{tot} \sim 0.1$, nous obtenons $T_{vis} \sim 0.1 s$. Ainsi, les petites cellules ayant $T_{vis} < T_{écoul}$ se stabilisent très rapidement et n'ont pas de régimes transitoires apparant. Les grosses cellules en revanche, pour lesquelles $T_{vis} > T_{écoul}$, nécessitent plusieurs mailles pour se stabiliser, et décrivent donc un régime transitoire au début du transport.

En considérant des rayons de cellules compris entre $5 \mu m$ et $10 \mu m$ et des tensions comprises entre 100 et $500 pN \cdot \mu m^{-1}$ (soit respectivement l'estimation de la tension au repos ou de la tension moyenne dynamique), nous pouvons de même estimer des temps caractéristiques de relaxation compris entre 1s et 10s. La relaxation de la seconde viscosité est donc elle aussi plus longue que le temps de passage d'une maille.

Les variations de forme au sein de la maille, visualisées par les variations de volume réduit sur la figure 14.4, sont donc dues aux déformations/relaxations de la partie Kelvin-Voigt du modèle rhéologique. L'adaptation progressive de la forme est le fruit de la déformation de la seconde viscosité, lente mais conservée d'une

maille à une autre.

14.5 Discussion

14.5.1 Scénario de stabilisation du mouvement

Compte tenu des observations présentées dans cette partie, et éclairées du modèle rhéologique que nous avons déterminé au chapitre précédent, nous proposons une tentative de scénario de stabilisation du mouvement des cellules, basées sur une approche purement dynamique.

Le nombre de Deborah est défini comme le rapport d'un temps caractéristique de réarrangement du matériau sur un temps caractéristique de variation de la contrainte [42]. Nous classons les phénomènes en deux catégories : $De < 1$ pour lequel les contraintes appliquées ont le temps de déformer le matériau qui apparaît comme fluide, et $De > 1$ pour lequel les contraintes ne déforment pas le matériau qui apparaît comme solide. Avec les temps caractéristiques dont nous disposons, nous pouvons construire trois nombres de Deborah :

$$De_{KV} = \frac{T_{KV}}{T_{écoul}} \quad De_{vis} = \frac{T_{vis}}{T_{écoul}} \quad De_{relax} = \frac{T_{relax}}{T_{écoul}}$$

Tout au long du mouvement, la cellule montre des déformations rapides à l'intérieur d'une maille (Fig. 14.5 et 14.8). Ces déformations sont possibles car le nombre de Deborah De_{KV} est toujours inférieur à 1 (Fig. 14.12). Dans ces conditions d'écoulement, la partie Kelvin-Voigt est donc toujours déformable. En parallèle, la cellule montre une autre déformation, qui s'établit lentement d'une maille à l'autre, et pour laquelle la forme moyenne de la cellule s'allonge lentement. Cette déformation nécessite plusieurs mailles pour s'établir, car $De_{vis} > 1$. Elle n'a, de plus, pas le temps de se résorber entre deux mailles car De_{relax} est aussi plus grand que 1, faisant apparaître la cellule comme rigide sur l'échelle de temps du mouvement.

Une explication plus fine peut être faite sur l'action de De_{vis} et De_{relax} . Au début du mouvement, la vitesse de la cellule est faible. Le temps caractéristique de l'écoulement associé est alors très grand et De_{vis} est inférieur à 1. Ainsi, au début du mouvement, l'élément visqueux du modèle est déformable et la cellule s'allonge progressivement. Plus elle s'allonge, plus la vitesse de transport augmente (Fig. 14.7 et 14.5). Le temps de l'écoulement diminue alors. Au bout d'un moment, la cellule se déplace assez rapidement pour que De_{vis} et De_{relax} deviennent inférieurs à 1. L'élément visqueux n'a alors ni le temps de se déformer, ni le temps de relaxer. Sa forme devient constante, de même que la vitesse de déplacement de la cellule. Nous notons de plus que pour que ce phénomène ait lieu, il faut que, au début

du mouvement, la cellule se déforme plus qu'elle ne relaxe, ce qui impose $De_{vis} > De_{relax} > 1$.

Une autre interprétation est possible en considérant la cellule comme un réservoir de déformation. A cause de sa tension, ce réservoir "fuit" : si on le laisse au repos sans sollicitation extérieure, il se vide et la cellule reprend progressivement sa forme initiale. Simultanément, le mouvement de la cellule à travers le réseau le remplit périodiquement. Le passage des canaux droits et diagonaux allongent à chaque fois un peu la cellule et lui impriment un peu plus de déformation. Le régime transitoire apparaît alors comme la phase de remplissage de ce réservoir. Au fur et à mesure que ce réservoir se remplit, et donc que la déformation augmente, le mouvement devient de plus en plus facile et la vitesse de la cellule accélère. Le régime stationnaire correspond alors au régime d'équilibre du réservoir, pour lequel les flux d'apport et de perte de déformation s'équilibrent. La forme de la cellule est alors stationnaire en moyenne, de même que sa vitesse.

Il apparaît alors qu'un mouvement régulier dans les réseaux nécessite la présence de deux composants pour la rhéologie de la cellule, associé à deux temps caractéristiques différents. Ainsi, la partie visqueuse η_2 est longue à déformer sous les contraintes appliquées. Lors de la traversée du réseau, η_2 donne à la cellule une rigidité suffisante pour conserver une forme allongée, plus adéquate au mouvement. La partie de Kelvin-Voigt, associée au temps caractéristique très court, sert quant à elle d'amortisseur à la cellule. Les déformations temporaires, nécessaires pour la traversée d'une maille, sont ainsi réalisées conjointement par k_1 et η_1 .

Dans ce cadre, deux explications sont possibles pour les variations du taux de stabilisation de la trajectoire en fonction du traitement appliquées aux cellules. D'un côté, une augmentation de η_2 entrainerait une augmentation de De_{vis} qui réduirait la capacité des cellules à adopter les déformations adéquates au transport. D'un autre côté, une augmentation de la tension engendrerait une diminution de De_{relax} , ce qui permettrait aux cellules de reprendre leur forme entre deux mailles. Ce gain de tension créerait aussi une baisse de la contrainte effective ressentie par les cellules, donc une augmentation de De_{vis} .

14.5.2 Pas de régime stationnaire pour les objets modèles

Les vésicules ne montrent pas ces capacités de stabilisation. Elles ne possèdent en effet qu'un fluide newtonien, de viscosité $\eta_{GUV} \approx 1mPa.s$ résultant en un nombre de Deborah $De_{vis} \ll 1$. Elles sont déformées fortement par l'écoulement à chaque instant, comme le montrent les figures 12.13, 12.15 et 12.16, ne gardent alors aucune mémoire de leur déformation précédente et ne peuvent donc pas adapter leur forme au cours du temps. Le régime des vésicules de taille critique est de fait un régime transitoire perpétuel, où les vésicules sont déformés au passage de chaque maille, mais n'en conservent aucune mémoire pour la suite du mouvement.

Les billes de gels sont des solides principalement élastiques, pour lequel le temps caractéristique T_{KV} est de l'ordre de $10^{-3}s$. Ces billes ne possèdent pas d'éléments visqueux leur permettant de conserver une déformation sur une distance supérieure à la maille du réseau et ne peuvent donc pas adapter leur forme au mouvement. Elles reprennent instantanément leur forme entre chaque canal comme des ressorts et ne gardent pas mémoire des déformations antérieures.

Chapitre 15

Régime stationnaire

Nous venons de voir comment les cellules sont déformées par le réseau, jusqu'à atteindre une forme optimale pour le mouvement. Elle atteignent alors le régime stationnaire du mouvement, que l'on visualise par une trajectoire régulière et une vitesse constante.

Dans un premier temps, nous étudions la stationnarité de ce mouvement, ainsi que sa stabilité face à un changement de direction de l'écoulement. Nous présentons alors le lien qui existe entre déformation et vitesse finale des cellules. Nous abordons ensuite le problème sous l'angle de la friction entre les cellules et le dispositif, où nous montrons qu'elle explique en grande partie les vitesses adoptées par les cellules. Nous nous intéressons alors à la variation de ce frottement en fonction des drogues appliquées, et donc de l'état rhéologique des cellules. Une poursuite plus fine de l'analyse en terme de frottement nous conduit à proposer une explication à la trajectoire régulière des cellules.

15.1 Un mouvement stable et régulier

Après avoir décrit la stationnarité de la trajectoire, de la forme ou de la vitesse des cellules, nous étudions comment les propriétés du mouvement résistent à une perturbation forte de l'écoulement. Nous établissons alors le lien existant entre vitesse des cellules et déformation.

15.1.1 Stabilité des observables

Trajectoire La trajectoire des cellules ayant atteint le régime stationnaire est très simple : elle est constituée d'une alternance de virages à gauche et de virages à droite, comme le montre la figure 15.1Haut. Les cellules suivent alors les lignes de courant de l'écoulement. Ce mouvement s'effectue de plus à vitesse moyenne

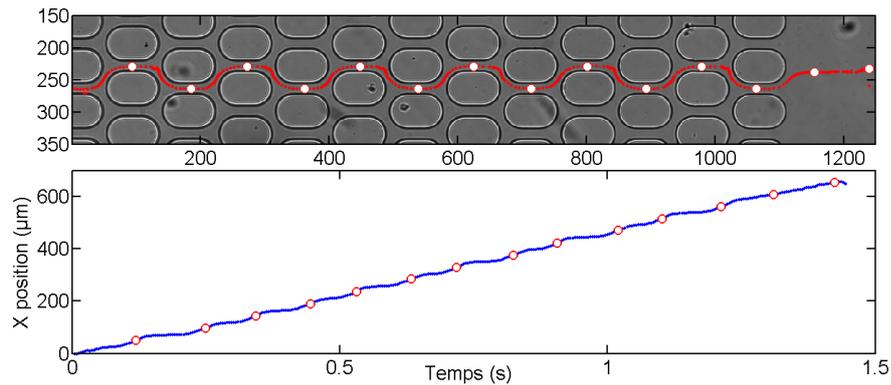


FIGURE 15.1 – Trajectoire d'une cellule circulant à la fin du réseau. $D_{cell} = 15\mu m$. $l = 9\mu m$. $\Delta P_{tot} = 20mb$. Haut : Superposition de la trajectoire de la cellule sur une image des plots. Bas : Position horizontale en fonction du temps. Dans les deux cas, les ronds rouges représentent les instants où la cellule passe au centre d'un canal droit.

constante, comme le montre la figure 15.1Bas.

Nous faisons remarquer que le mouvement final des cellules est similaire à celui d'objets de petite taille, comme nous l'observons pour des microbilles de polystyrène, des microbilles de gels ou des vésicules. Or, les cellules ont une taille bien plus importante que ces objets, qui leur fait occuper presque la totalité de la section du canal. Un comportement plus proche de celui des gros objets aurait été attendu. Cette capacité à stabiliser le mouvement de gros objets est une des principales caractéristiques du transport des cellules.

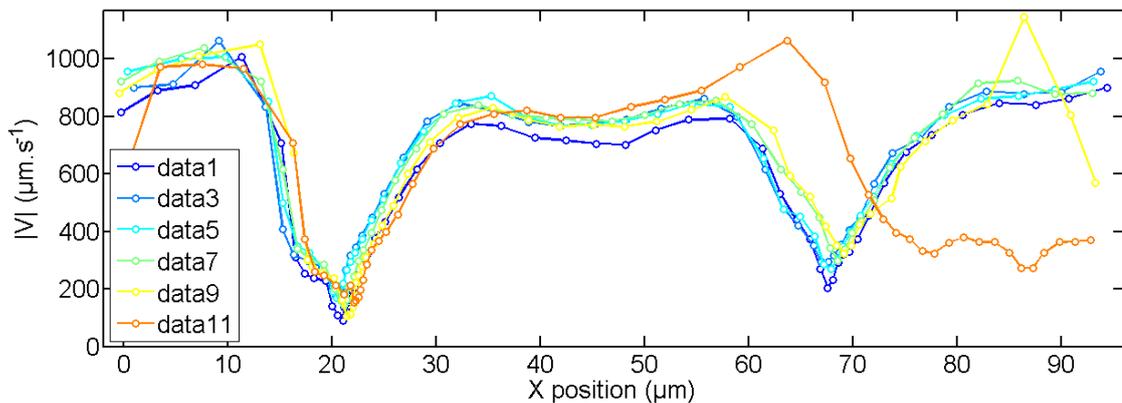


FIGURE 15.2 – Vitesse d'une cellule en fonction de sa position dans une paire de mailles. $D_{cell} = 15\mu m$. $l = 9\mu m$. $\Delta P_{tot} = 20mb$.

Vitesse La périodicité du mouvement peut être observée de façon plus fine en s'intéressant à la vitesse instantanée de la cellule en fonction de sa position horizontale dans la maille. Sur la figure 15.2, nous faisons se recouvrir les courbes

en fonction de leur position relative dans leur maille. Toutefois, ce recouvrement n'est pas fait maille à maille, mais par paire de mailles. Nous observons en effet une dissymétrie entre le passage des mailles "impaires" (moitié gauche de la figure, de $0\mu m$ à $47\mu m$) et le passage des mailles "paires" (moitié droite à partir de $47\mu m$). Cela se traduit sur la courbe par une valeur différente des deux minima de la vitesse, à 21 et $67\mu m$. Ce comportement correspond à l'asymétrie entre les virages gauche et droit, observée dans la figure 14.9 lors du régime transitoire.

Cependant, contrairement au régime transitoire, nous n'observons aucune évolution globale de la vitesse : les différentes courbes se recouvrent très convenablement, montrant que la vitesse se reproduit d'un cycle à l'autre. Celle-ci ne change que lorsque la cellule sort du réseau (fin de la courbe n°11 sur la figure 15.2). Cette périodicité de la vitesse instantanée au sein des mailles confirme le fait que la vitesse moyenne soit constante, et donc que le régime stationnaire est atteint.

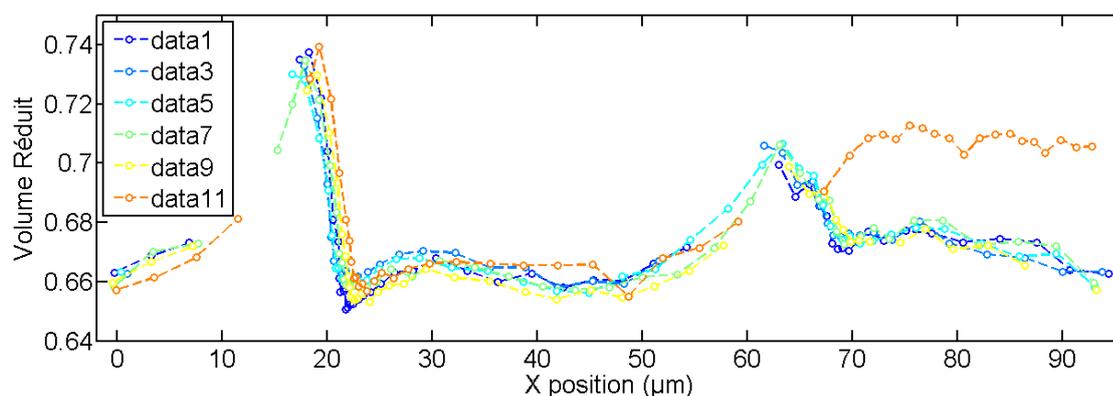


FIGURE 15.3 – Volume réduit d'une cellule en fonction de sa position dans une paire de mailles. $D_{cell} = 15\mu m$. $l = 9\mu m$. $\Delta P_{tot} = 20mb$.

Forme La figure 15.3 représente le volume réduit de la cellule en fonction de sa position. A l'instar de la vitesse, son évolution est périodique sur une distance de deux mailles. Nous observons que les mailles impaires présentent des amplitudes de variation du volume réduit plus importantes que les mailles paires. Les mailles impaires correspondent ainsi au virage très déformant pour la cellule. La collision avec le pilier en sortie de canal droit (à $19\mu m$) rend à la cellule une partie de sa circularité. La cellule doit ensuite rapidement reprendre une forme plus allongée pour passer le canal diagonal, ce qui explique le fort changement de volume réduit entre 19 et $21\mu m$, ainsi que le minimum absolu de vitesse atteint à ce moment (Fig. 15.2). Pour le passage des mailles paires, le choc avec le pilier est moins déformant, les variations de volume réduit sont donc plus faibles.

15.1.2 Stabilité face au retournement

Afin de tester la stationnarité du mouvement, nous observons comment les cellules réagissent à un changement de sens de l'écoulement. Reprennent-elles leur régime stationnaire ? Si oui, instantanément ? Qu'en est-il de la trajectoire ?

Expérience L'idée d'un "Aller-Retour" consiste à changer le signe de la dépression appliquée à un moment pour faire changer de sens de mouvement à la cellule. Le fabricant du distributeur de pression garantit un temps de réponse de 200ms, ce qui nous assure une inversion suffisamment rapide du flux.

Ces expériences s'effectuent dans deux situations différentes. Tout d'abord, nous créons des retournements d'écoulement au début du réseau. En fonction de la caméra et du champ de vision accessible, une cellule parcourt donc 10 à 15 mailles avant de revenir en arrière. Nous voulons alors perturber le mouvement d'une cellule qui n'aurait pas été complètement stabilisée, afin de voir comment sa forme continue d'évoluer. Nous cherchons aussi à retourner le mouvement d'une cellule à l'intérieur du réseau. Nous effectuons cette même expérience sur des cellules en fin de réseau. Dans ce cas, les cellules ont déjà traversé les 50 mailles du réseau. Dès leur sortie du réseau, nous inversons le flux et les regardons entrer à nouveau dans le réseau. Nous voulons alors observer les différences entre l'entrée d'une cellule vierge de déformation et la seconde entrée d'une cellule qui a déjà subi une multitude de déformations dans les canaux. Pour finir, nous avons parfois appliqué une dépression différente au retour qu'à l'aller, afin de tester la robustesse du régime stationnaire par rapport à la force appliquée.

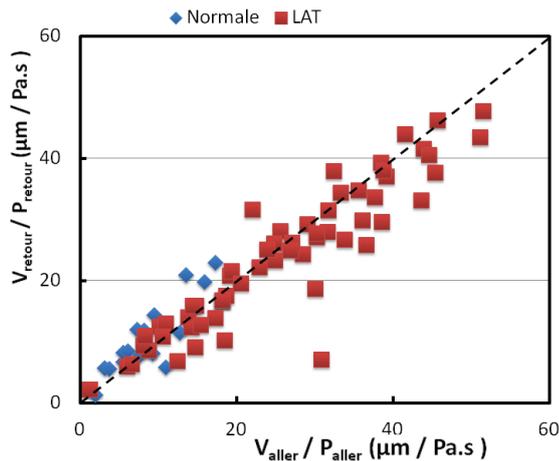


FIGURE 15.4 – $\frac{V_{\text{retour}}}{P_{\text{retour}}}$ en fonction de $\frac{V_{\text{aller}}}{P_{\text{aller}}}$ pour les cellules normales et les cellules traitées à la latrunculine, au début et à la fin du réseau. La ligne noire est la première bissectrice du repère.

Résultats La figure 15.4 représente l'un en fonction de l'autre les rapports des vitesses des cellules sur les pressions appliquées, à l'aller et au retour, pour les cellules normales et celles traitées à la latrunculine, au début et à la fin du réseau. Les points sont presque tous disposés autour de la première bissectrice, montrant qu'il n'y a pas de différence générale entre le mouvement dans un sens et dans l'autre. La stationnarité du mouvement est donc robuste face à ces perturbations en direction et en pression. Cela confirme l'adaptation interne de la cellule, qui conserve sa déformation, et donc son mouvement, malgré ces changements.

15.1.3 Déformation et vitesse des cellules

Nous observons, tout au long de l'étude du mouvement des cellules, qu'il existe un lien fort entre confinement géométrique des cellules, déformation et vitesse. Nous cherchons donc à étudier le lien plus général entre la vitesse moyenne dans le réseau et la taille des cellules.

Pour cela, nous calculons une vitesse sans dimension des cellules \tilde{V} , en divisant la vitesse moyenne de la cellule par la vitesse du fluide dans les canaux droits déterminés au chapitre 12 :

$$\tilde{V} = \frac{V_{cell}}{V_f} = \frac{h.l.n_{\Sigma}.R_h.V_{cell}}{\Delta P_{tot}} \quad (15.1)$$

avec n_{Σ} le nombre de canaux en parallèle dans la section concernée et R_h la résistance hydrodynamique du réseau. Concernant la taille de la cellule, nous pouvons calculer, à partir de l'aire apparente moyenne et du périmètre moyen, un volume réduit moyen pour chaque cellule selon la même formule que pour le volume réduit instantané.

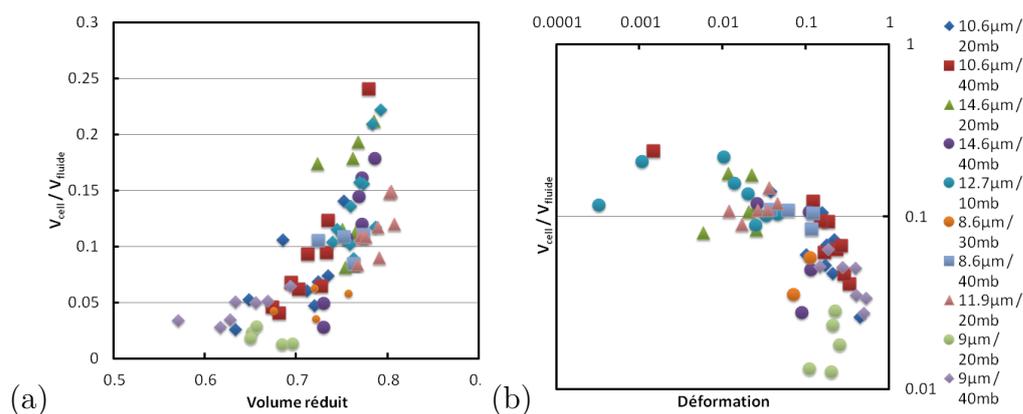


FIGURE 15.5 – Vitesse sans dimension des cellules normales (a) en fonction de leur volume réduit moyen. (b) en fonction de leur déformation mesurée pendant l'entrée ϵ_{tot} . La légende est identique pour (a) et (b).

La vitesse \tilde{V} des cellules est croissante en fonction volume réduit moyen, comme le montre la figure 15.5a : plus $\langle V_{red} \rangle$ est grand, moins la cellule est déformée, plus sa vitesse par rapport à celle du fluide est grande. Cette observation est identique si l'on compare \tilde{V} à la déformation initiale ϵ_{XP} qu'a subi la cellule lors de son entrée dans le réseau (Fig. 15.5b) : plus elle a eu à se déformer pour entrer, plus sa vitesse dans le reste du réseau est faible. Pour les 2 courbes, tous les points, réalisés dans différentes conditions expérimentales, retombent sur une courbe maîtresse.

Sur la figure 15.5b toutefois, nous observons deux zones. Pour les fortes déformations ($\epsilon > 0.1$), la vitesse chute rapidement avec la déformation. En revanche, pour les faibles déformations, cette variation est beaucoup plus faible. Ce seuil de 0.1 doit représenter une limite d'encombrement des cellules dans les canaux. Les cellules se déformant peu ont la vitesse d'un objet transporté par le fluide en mouvement. Les cellules devant se déformer beaucoup ont le mouvement d'objets obstruant le canal.

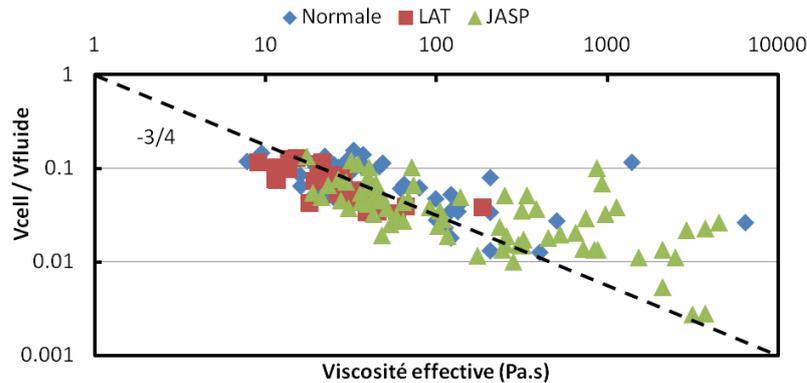


FIGURE 15.6 – Vitesse sans dimension des cellules en fonction de la viscosité effective à l'entrée $\frac{P \cdot T_e}{\epsilon_{tot}}$. (a) pour les cellules non-traitées. (b) pour toutes les cellules.

Une autre visualisation intéressante est obtenue en utilisant la viscosité effective mesurée à l'entrée. Nous nous souvenons que dans le cas particulier des cellules traitées à la latrunculine, cette valeur est presque égale à la viscosité η_2 du modèle rhéologique. Pour les cellules avec une tension corticale, les deux valeurs sont a priori différentes. Nous considérons toutefois cette viscosité effective comme un bon indicateur de la déformabilité au temps long des cellules, qui dépend donc de la valeur de η_2 . La figure 15.6 montre un lien en loi de puissance entre \tilde{V} et la viscosité effective, avec un exposant d'environ $-3/4$. La vitesse de la cellule dépend donc fortement de ses capacités à se déformer aux temps longs. La différence de rhéologie entre les cellules n'a toutefois pas d'effet qualitatif sur la forme de la courbe : tous les points retombent sur une même courbe maîtresse.

Nous voyons apparaître ici la limite de cette visualisation par la déformation.

Le traitement par une drogue fait changer les valeurs de paramètres rhéologiques des cellules, mais pas le type de rhéologie du fluide interne. Il n'y a donc pas de différence de comportement notable entre les séries de points.

15.2 Friction dans les canaux

Si la vitesse finale des cellules peut être interprétée en terme de déformation nécessaire au transport, nous obtenons aussi de nombreuses informations en l'étudiant du point de vue de la friction entre les cellules et le réseau. Après avoir analysé la physique du système, nous traitons les données extraites des trois populations de cellules pour lesquelles nous mesurons les coefficients de frottements solides et visqueux des cellules en mouvement. Pour finir, nous proposons une interprétation sur le rôle de la friction dans la trajectoire des cellules.

15.2.1 Modèle

Bilan des Forces Considérons une cellule allant à vitesse constante dans les canaux. Cette dernière est soumise à deux forces :

- une force de poussée due à la différence de pression appliquée

$$F_{pousse} = h.l.\Delta P_{cell} \quad (15.2)$$

- une force de frottement avec le dispositif

$$F_{frot} = -S_{frot}(k_{visc}\cdot v_{cell} + k_{sol}) \quad (15.3)$$

où S_{frot} est la quantité de surface de la cellule en contact avec le dispositif, k_{visc} est le coefficient surfacique de frottement visqueux, et k_{sol} est le coefficient surfacique de frottement solide.

La force de poussée est déterminée en multipliant la différence de pression aux bornes de la cellule par la section du canal sur laquelle s'applique la pression. La force de frottement est le résultat de l'interaction effective entre la cellule et les parois du canal. Elle est engendrée par une interaction élémentaire effective entre deux éléments de surface, qui comprend un frottement visqueux proportionnel à la vitesse de déplacement relative des surfaces et un frottement solide indépendant de la vitesse. La force totale à l'échelle de la cellule est le résultat de l'intégration de cette interaction élémentaire sur la zone de contact entre la cellule et les canaux. Pour finir, le signe "-" indique que la force s'oppose au mouvement.

Si la cellule a une vitesse constante, alors la somme des forces doit être nulle. Nous en déduisons donc la relation :

$$\frac{h.l.\Delta P}{S_{frot}} = k_{visc}\cdot v_{cell} + k_{sol} \quad (15.4)$$

Coefficient de frottement visqueux Le frottement visqueux est créé dans la couche de lubrification située entre la cellule et les parois du dispositif. Pour un liquide visqueux, nous avons $\sigma_{vis} = \eta_0 \cdot \dot{\gamma}$ où $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement dans le liquide et η_0 est la viscosité du liquide externe. Appliquée à notre système, cette relation devient :

$$\sigma_{vis} = \eta_0 \frac{v_{cell}}{d_{lub}} = \frac{\eta_0}{d_{lub}} v_{cell} \quad (15.5)$$

avec d_{lub} l'épaisseur moyenne de la couche de lubrification.

Nous identifions alors le coefficient de frottement visqueux :

$$k_{visc} = \frac{\eta_0}{d_{lub}} \quad (15.6)$$

Cette expression est valable en considérant une couche de lubrification approximativement constante. Elle fait cependant apparaître une propriété plus générale : pour un liquide externe newtonien, k_{vis} est proportionnel à la viscosité. Ainsi pour une même pression appliquée, et pour un milieu externe deux fois plus visqueux, la vitesse de la cellule sera deux fois plus faible.

Coefficient de frottement solide Nous exprimons la force de frottement solide comme $F_{sol} \propto S \cdot P$ où P est la pression qu'exerce l'objet sur la surface et S la quantité de surface en contact entre les deux objets. Pour un solide macroscopique, le produit $S \cdot P$ est constant ; F_{sol} l'est donc aussi. Pour le système microfluidique que nous étudions, les effets gravitationnels sont négligeables. La pression P est exercée par la contrainte normale à la surface de la cellule, qui appuie contre la paroi et joue le rôle de force allant de l'objet vers le substrat.

La contrainte normale, même si elle n'est pas connue, est au moins proportionnelle à la pression totale appliquée. Nous exprimons alors le coefficient de frottement surfacique comme $k_{sol} = \frac{F_{sol}}{S_{frot}} = \mu_s \cdot \Delta P_{cell} \cdot \tilde{\sigma}_n$, avec $\tilde{\sigma}_n$ la contrainte sans dimension normale à la surface de la cellule. Le coefficient de frottement solide est donc proportionnel à la pression appliquée au système. Nous définissons alors un coefficient de frottement solide intrinsèque par :

$$\kappa_{sol} = \frac{k_{sol}}{\Delta P} = \frac{F_{sol}}{S_{frot} \Delta P} \quad (15.7)$$

A partir des équations 15.4, 15.6 et 15.7, nous déduisons une équation plus appropriée pour représenter le système :

$$\frac{h \cdot l}{S_{frot}} = k_{visc} \cdot \frac{v_{cell}}{\Delta P_{cell}} + \kappa_{sol} \quad (15.8)$$

15.2.2 Frottement dans le canal

L'équation 15.8 est valable strictement lorsque la cellule traverse un canal droit. C'est à cet endroit en effet que l'on connaît précisément la pression qu'elle ressent et que l'on peut calculer la surface de contact avec le réseau.

Surface de frottement Celle-ci peut être calculée à partir de considérations géométriques. Elle est en effet approximativement égal à $S_{frot} = 2.L_{contact} \cdot (h + l)$, où $L_{contact}$ est la longueur de cellule en contact avec les parois. Si nous ne pouvons mesurer de façon automatique cette valeur sur les images, nous pouvons l'évaluer à partir d'une forme modèle.

La plupart des cellules ont une forme proche d'un pavé lorsqu'elles circulent dans le canal. Dans ce cas, il existe une relation entre la surface apparente de la cellule A_{canal} mesurée sur l'image et sa longueur dans le canal : $A_{canal} = L_{ccontact} \times l$. La surface de frottement devient alors :

$$S_{frot} = 2.A_{canal} \cdot (h/l + 1) \quad (15.9)$$

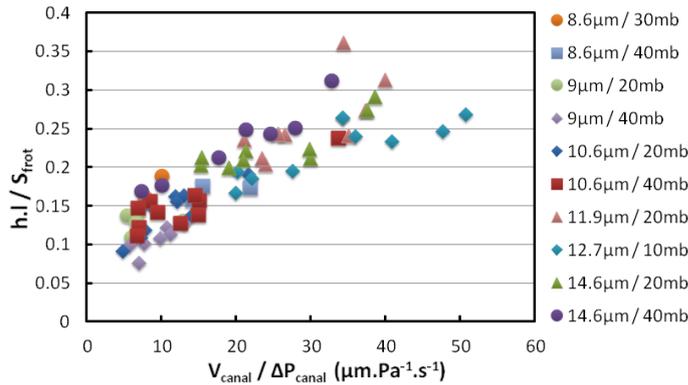


FIGURE 15.7 – $\frac{hl}{S_{frot}}$ en fonction $\frac{V_{canal}}{\Delta P_{canal}}$ pour des cellules non traitées.

Friction contre la paroi Nous pouvons alors observer les variations de $\frac{hl}{S_{frot}}$ en fonction de $\frac{V_{canal}}{\Delta P_{canal}}$ pour des cellules normales dans différentes conditions expérimentales (Fig. 15.7). Les points retombent tous sur une droite maîtresse, croissante avec une ordonnée à l'origine positive, compatible avec la formule 15.8. Nous déterminons un coefficient de frottement visqueux entre les cellules et la paroi de $k_{visc} = 4.52 \pm 0.61 mPa.s.m^{-1}$. En considérant que la viscosité du milieu de culture dans lequel baignent les cellules est identique à celle de l'eau ($\eta_0 \approx 1 mPa.s$), nous en déduisons une épaisseur moyenne de couche de lubrification de $d_{lub} = 0.22 \pm 0.03 \mu m$.

Les travaux sur les objets en mouvement dans des tubes [14, 107, 108, 16] permettent d'évaluer dimensionnellement l'épaisseur de cette couche de lubrification. Nous trouvons :

$$d_{lub} \propto w \cdot \left(\frac{\eta \cdot V}{\tau_0} \right)^{2/3} \quad (15.10)$$

w est la taille caractéristique de la conduite, soit $w \sim 10\mu m$ pour les canaux microfluidiques. η est la viscosité du fluide externe, environ $1mPa.s$ ici. V est la vitesse caractéristique de déplacement de l'objet, de l'ordre $1mm.s^{-1}$ pour les cellules. Enfin, τ_0 est la tension interfaciale entre les deux milieux, soit ici la tension corticale des cellules, qui est de l'ordre de $100 - 1000pN/\mu m$. En insérant ces données dans l'estimation dimensionnelle de l'épaisseur de la couche de lubrification, on trouve $d_{lub} \sim 0.1 - 0.5\mu m$. Il y a donc une très bonne cohérence entre le résultat du modèle de friction et l'estimation dimensionnelle.

Le coefficient de frottement solide extrapolé vaut $\kappa_{sol} = 0.099 \pm 0.014$. Pour ce coefficient, nous n'avons pas d'argument dimensionnel justifiant ou non une telle valeur. Nous remarquons simplement qu'il est positif; la force F_{sol} s'oppose donc bien au mouvement.

15.2.3 Frottement effectif

Extension au mouvement moyen L'analyse en termes de frottement développée ci-dessus n'est valable à proprement parler que lorsque la cellule est dans un canal droit. Nous savons cependant que les cellules acquièrent, une fois le régime stationnaire atteint, une vitesse moyenne constante dans le réseau. Nous cherchons donc à étendre l'analyse précédente au mouvement global.

Comme vitesse de la cellule, nous remplaçons la vitesse dans le canal par la vitesse moyenne des cellules V_{cell} . Ce mouvement est généré par une différence de pression appliquée aux bornes du réseau. La pression caractéristique perçue par la cellule est la pression s'appliquant sur une maille du réseau ΔP_{maille} . Enfin, nous utilisons la formule de calcul de la surface de frottement pour évaluer l'ordre de grandeur de la surface de frottement : pour une cellule ayant une aire apparente $\langle A \rangle$, la surface de frottement caractéristique avec le réseau sera $\langle S_{frot} \rangle = 2 \cdot \langle A \rangle \cdot (h/l + 1)$.

Friction effective En traçant $\frac{hl}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{\langle V_{cell} \rangle}{\Delta P_{maille}}$, nous retrouvons le comportement linéaire obtenu dans les canaux droits (Fig. 15.8). Étonnamment, nous mesurons aussi à l'erreur près, les mêmes valeurs des coefficients de frottement : $\langle k_{visc} \rangle = 4.55 \pm 0.7mPa.s.m^{-1}$ et $\langle \kappa_{sol} \rangle = 0.089 \pm 0.016$.

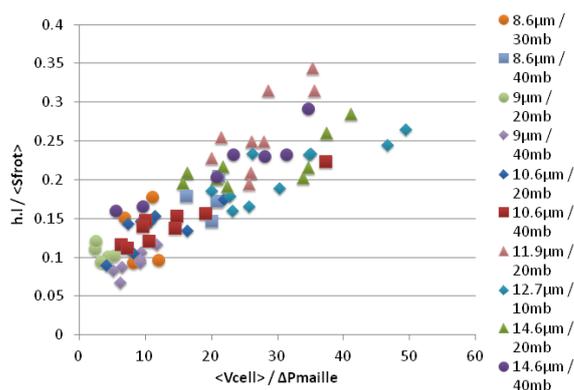


FIGURE 15.8 – $\frac{h.l}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{V_{cell}}{\Delta P_{maille}}$ pour des cellules non traitées.

L'interprétation en termes de frottement permet donc une bonne description de la vitesse des cellules en régime stationnaire, dans les canaux droits mais aussi en moyenne dans le réseau. Les coefficients de frottement, très semblables dans les deux cas, indiquent que le réseau possède des propriétés de friction effective globalement équivalentes à la friction dans un canal droit.

15.2.4 Friction et réseau d'actine

Nous étudions alors les variations des coefficients de friction en fonction des traitements appliqués aux cellules, donc de leur rhéologie interne.

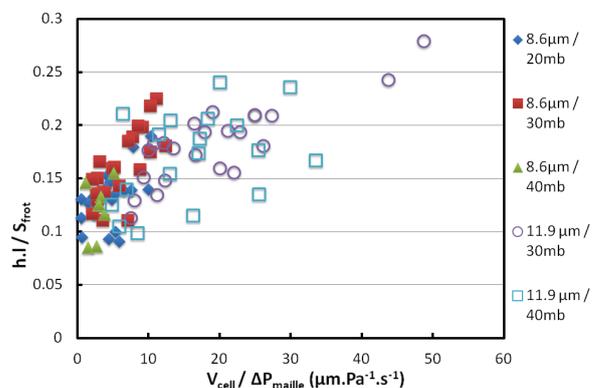


FIGURE 15.9 – $\frac{h.l}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{V_{cell}}{\Delta P_{maille}}$ pour des cellules traitées à la jasplakinolide. Les symboles pleins correspondent aux expériences dans les canaux de largeur inférieure à $11\mu m$, les vides dans les canaux de largeur supérieure à $11\mu m$.

Friction et déformation En étudiant la courbe de $\frac{h.l}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{V_{cell}}{\Delta P_{maille}}$ pour les cellules traitées à la jasplakinolide (Fig. 15.9), nous remarquons une diffé-

rence de comportement assez importante entre les cellules circulant dans les petits canaux de $8.6\mu m$ et les cellules circulant dans les grands canaux de $11.9\mu m$: chaque groupe de points décrit une droite dont les coefficients directeurs sont différents. La population passant dans les petits canaux a donc un coefficient de frottement visqueux plus important que les cellules circulant dans les grands canaux.

Pour expliquer cette différence de comportement, il faut revenir légèrement en arrière. Nous savons avec la figure 15.5b que les vitesses réduites \tilde{V} des cellules dépendent de leur déformation à l'entrée. D'une manière générale, il existe un effet du confinement géométrique sur la vitesse des cellules, et donc sur leurs propriétés de friction avec le réseau. Les cellules traitées à la jasplakinilode semblent y être très sensibles.

Pour comparer les coefficients de friction entre les différents types de cellules, nous nous basons donc sur les résultats obtenus pour les petits canaux d'une largeur inférieure à $11\mu m$. Cela nous permet d'étudier les situations où l'effet de la friction est le plus important.

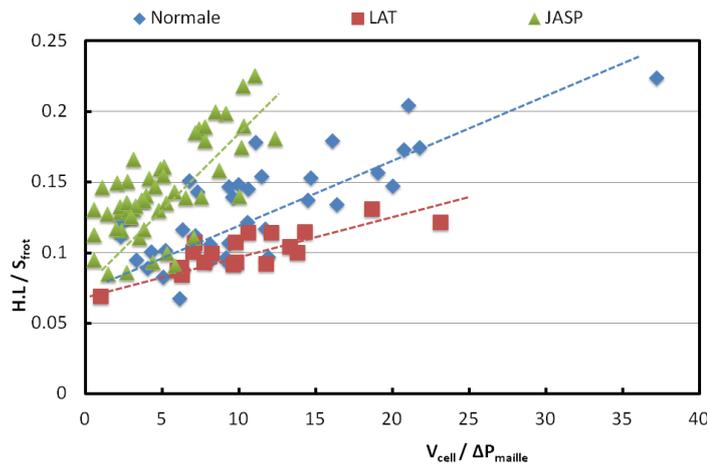


FIGURE 15.10 – $\frac{h.l}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{V_{cell}}{\Delta P_{maille}}$ pour des cellules dans des canaux de petite largeur.

Friction et rhéologie cellulaire La figure 15.10 montre les courbes de $\frac{h.l}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{V_{cell}}{\Delta P_{maille}}$ pour les trois types de traitements. Nous remarquons que chaque série forme une droite croissante avec une ordonnée à l'origine positive. Les valeurs des coefficients ainsi que l'épaisseur de la couche de lubrification correspondante sont données dans le tableau 15.1.

L'augmentation des valeurs des coefficients de friction met en avant une augmentation de la friction avec la rigidité cellulaire, et donc une diminution de la couche de lubrification. Grâce à la formule 15.10, nous interprétons cette diminution comme une modification de la tension des cellules. Plus la tension augmente,

	$k_{vis}(mPa.s.m^{-1})$	$d_{lub}(nm)$	κ
LAT	2.41 ± 0.94	415 ± 162	0.0761 ± 0.0107
Norm	$4,00 \pm 1.18$	250 ± 74	0.0856 ± 0.0154
JASP	7.59 ± 2.29	132 ± 40	0.107 ± 0.0132

TABLE 15.1 – Tableaux des valeurs des paramètres de la friction en fonction des traitements appliqués aux cellules.

plus le nombre capillaire diminue, ce qui se reporte sur l'épaisseur de la couche de lubrification. Pour les cellules traitées à la latrunculine, cette interprétation n'est toutefois pas suffisante. En effet, une diminution d'un facteur 100 aurait dû entraîner une augmentation d'un facteur $100^{2/3} \approx 20$ de la couche de lubrification, ce qui n'est pas le cas.

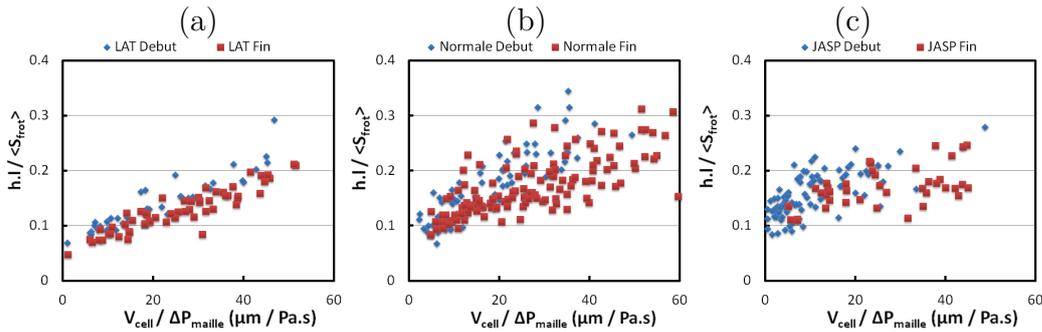
Dans le cas des cellules traitées à la latrunculine, le nombre capillaire ne s'exprime plus à partir de la tension de l'objet, mais à partir de son élasticité :

$$Ca = \frac{\eta_0 V_{cell}}{k_1 a} \quad (15.11)$$

où k_1 est le module élastique de la cellule, et a est la taille caractéristique de l'objet, soit $10\mu m$. Avec ces valeurs, nous trouvons $Ca \approx 10^{-3}$ du même ordre de grandeur que pour les cellules pourvues d'une tension corticale. Leurs couches de lubrification sont donc du même ordre de grandeur.

15.2.5 Évolution de la couche de lubrification

Le régime stationnaire est observable en début et en fin de réseau. Il possède les mêmes propriétés apparentes : trajectoires régulières, vitesses moyennes constantes. Les valeurs des vitesses ne sont toutefois pas exactement identiques.

FIGURE 15.11 – $\frac{h.l}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{V_{cell}}{\Delta P_{maille}}$ pour les cellules en début et fin de réseau, pour les trois types de cellules.

Sur la figure 15.11 sont tracées les valeurs de $\frac{h.l}{\langle S_{frot} \rangle}$ en fonction de $\frac{V_{cell}}{\Delta P_{maille}}$ au début et à la fin du réseau, pour les trois types de cellules. Chaque série de points

décrit bien une droite. Nous observons cependant que la pente des points mesurés à la fin du réseau est toujours plus faible que pour les points en début de réseau, pour une ordonnée à l'origine qui reste identique. Le frottement visqueux diminue donc au fur et à mesure que la cellule avance dans le réseau.

Il existe plusieurs explications possibles à cette diminution du frottement. Il peut, d'une part, être causé par une augmentation de la couche de lubrification sous l'effet des contraintes hydrodynamiques qui y règnent ; la membrane se serait alors éloignée de la paroi pour tenter de minimiser ces contraintes. D'autre part, la membrane a pu changer qualitativement. En effet, le microécoulement autour de la cellule applique une contrainte extensionnelle sur la membrane de la cellule. Il est possible que celle-ci soit étirée, lissée, et qu'ainsi le frottement qu'elle exerce sur la paroi soit moins fort. Ces hypothèses demandent à être confirmées par des méthodes de visualisation de la couche limite ou par d'autres expériences étudiant spécifiquement cet aspect.

15.3 Friction différentielle

Ainsi, le mouvement d'une cellule dans le réseau peut être interprété par un coefficient de frottement effectif entre la cellule et le réseau. Mais cette friction peut aussi servir à interpréter la trajectoire. En effet, lorsqu'un THP-1 est stabilisé, il montre toujours une trajectoire rectiligne en moyenne, faite d'une succession de virages à gauche et de virages à droite. Nous proposons ici une interprétation de la trajectoire de la cellule par une différence de friction entre les deux côtés de la cellule.

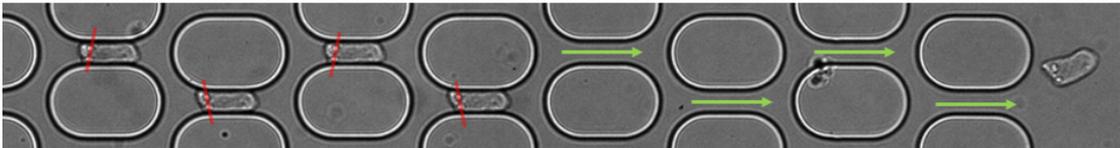


FIGURE 15.12 – Montage photo illustrant le cisaillement agissant sur une cellule. Les lignes rouges sont des guides pour les yeux. Ces lignes passent à chaque fois dans les deux mêmes zones brillantes de la cellule.

15.3.1 Virage final

Sur la figure 15.12, nous montrons un montage superposant cinq images d'une même cellule en mouvement dans le réseau : quatre sont choisies au moment où la cellule est au centre d'un canal, la dernière est choisie juste après le sortie du réseau. Les quatre premières photos indiquent la trajectoire et l'ordre de l'enchaînement des virages.

La cellule est en régime stationnaire : elle effectue alternativement un virage à gauche et un virage à droite. A la fin de son trajet, lorsqu'elle sort du réseau, la cellule tourne à gauche d'elle même : il n'y a pas de pilier pour l'obliger à s'orienter. Le plus intéressant est encore de remarquer que, si le réseau avait contenu une colonne de plus, la cellule aurait continué sa trajectoire en tournant à gauche. Cela montre qu'une force agit sur la cellule et que sa trajectoire n'est pas dirigée simplement par le confinement géométrique. Le futur virage semble inscrit dans la cellule avant qu'elle ne l'effectue.

15.3.2 Cisaillement

Pour comprendre le fonctionnement de ce phénomène, il faut observer la cellule plus en détail. Sur la figure 15.12, nous représentons des lignes rouges reliant deux irrégularités lumineuses de la cellule. Ces points sont choisis en fonction de leurs propriétés optiques, et absolument pas en fonction de leurs propriétés biologiques.

Nous observons que ces lignes changent d'orientation alternativement en fonction du virage qui a été fait. Nous remarquons de plus que ces inclinaisons, prises deux à deux, sont identiques. La cellule subit donc un cisaillement alternatif lors de son mouvement en régime stationnaire. Cette force est assez importante pour déformer visiblement la cellule, et la faire tourner d'un côté particulier à sa sortie du réseau. Ce cisaillement exerce donc un couple sur la cellule qui la fait tourner d'un côté particulier à sa sortie d'un canal droit. Ce cisaillement étant alternatif, le mouvement résultant est une alternance de virages d'un côté puis de l'autre.

15.3.3 Couple et frottement

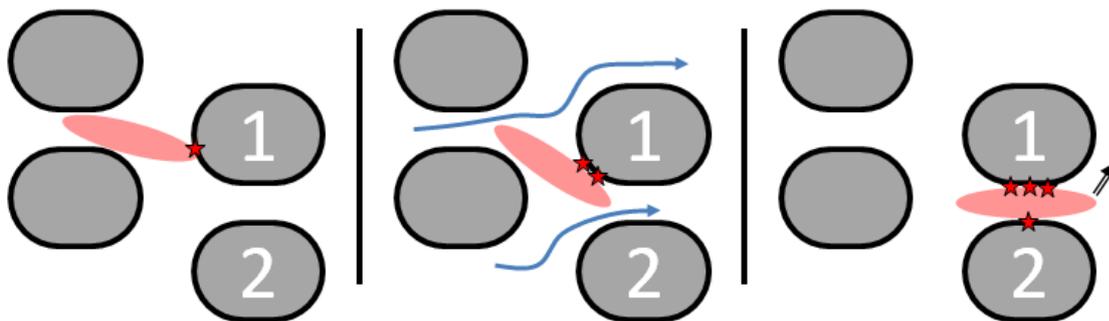


FIGURE 15.13 – Série d'illustration montrant comment la différence de friction apparaît. Les étoiles rouges schématisent les zones de friction.

Nous proposons alors une explication à l'existence de ce couple, basée sur une analyse détaillée d'un virage de la cellule, schématisé sur la figure 15.13.

Considérons une cellule sortant d'un canal et entamant un virage à droite (Fig. 15.13Gauche). Elle touche alors le plot numéro 1 en premier. Au fur et à mesure de son avancée vers le canal diagonal, la surface de contact avec le plot 1 s'accroît et le frottement avec ce plot augmente. Pendant ce temps, le frottement avec le plot 2 est nul puisque la cellule ne le touche pas.

En s'avançant un peu plus (Fig. 15.13Milieu), la cellule ressent les effets de l'écoulement. Celui-ci, représenté par les flèches bleues, plaque la cellule contre le plot 1. Cela se traduit par une contrainte en direction du plot qui draine la couche de lubrification et augmente encore plus le frottement avec le plot 1.

Ainsi, lorsque la cellule entre en contact avec le plot 2 (Fig. 15.13Droite), les épaisseurs des couches de lubrification, et donc les frottements associés, sont différents d'un côté et de l'autre. Vers le plot 1, l'écoulement a appuyé sur la cellule et la couche de lubrification a été partiellement drainée. Du côté du plot 2, on a une couche épaisse sur laquelle aucune contrainte ne s'est exercée. Cette différence d'épaisseur de lubrification crée une force de frottement plus grande du côté 1 que du côté 2, que nous visualisons sur les photos par le cisaillement que subit la cellule au passage des canaux en régime stationnaire (Fig. 15.12). Cette différence entre les frottements engendre alors un léger couple sur la cellule qui, en sortant du canal, tourne vers la gauche et amorce ainsi son virage. Ce phénomène se répète ensuite pour les canaux suivants.

15.4 Discussion

15.4.1 Transition vers le régime stationnaire

Si le scénario d'un mouvement dirigé par le frottement semble vraisemblable, il ne renseigne pas sur la cause de la transition entre le régime transitoire et le régime stationnaire. En effet, les arguments développés dans cette partie sont a priori valables à chaque instant du mouvement, notamment lors du régime transitoire. Selon cette vision, la trajectoire du mouvement ne devrait être faite que d'une alternance de virages à gauche et virages à droite. Nous pensons cependant que le couple dû au frottement est un phénomène du deuxième ordre pour le système qui ne devient dominant que lorsque d'autres effets ont disparu, notamment les effets dus aux déformations cellulaires.

D'une part, il est possible que, lorsque la cellule est encore en période de forte déformation, les couches de lubrification aient le temps de s'équilibrer, annulant alors le couple qui s'exerce sur la cellule. La trajectoire n'est alors pas stabilisée et l'enchaînement des virages est irrégulier. D'autre part, nous avons discuté, avec la figure 15.13Milieu, de l'importance de l'écoulement lorsqu'il plaque la cellule contre le plot 1. Ce mouvement nécessite une cellule déjà fortement allongée pour

que la surface de contact avec le plot soit suffisamment importante, ce qui n'est pas le cas lors du régime transitoire. Ainsi, tant que la cellule n'est pas assez déformée, le couple du frottement pourrait ne pas avoir assez d'importance pour orienter efficacement la cellule dans un canal.

De façon plus générale, tant que la cellule est dans un régime de déformation, la compétition entre les forces de frottement et les forces déformant la cellule sont toujours à l'avantage de ces dernières. Ce n'est qu'avec une vitesse suffisante et une forme suffisamment stabilisée que l'égalité des forces de pression et de frottement sera possible, et donc que le couple aura un rôle assez important.

Il ne s'agit bien entendu que d'hypothèses, qui appellent à une poursuite des recherches dans ce sens.

15.4.2 Stabilisation du mouvement

Une autre question légitime concerne la stabilisation de la forme. L'étude du régime transitoire fournit une explication purement rhéologique à la forme d'équilibre, qui résulte d'une impossibilité de la cellule à relaxer sa forme entre deux mailles du réseau. D'autres phénomènes pourraient cependant jouer un rôle dans ce processus.

Nous observons tout d'abord que la cellule adoptent une forme de parachute en fin de mouvement (Fig. 15.12, dernière image), signe que sa tension corticale est maximale à l'avant et proche de zéro à l'arrière [16]. Cette forme pourrait limiter la relaxation de l'arrière de la cellule et ainsi augmenter la stabiliser du mouvement dans le réseau.

Ensuite, les cellules sont des objets composés de multiples organites, et, principalement pour les THP-1, d'un noyau de taille très importante. Certains travaux [53, 54] étudient spécifiquement le rôle du noyau dans la relaxation des cellules. Il est possible que la circulation des cellules dans le réseau impose une position particulière au noyau lors du régime stationnaire. De manière générale, l'étude du positionnement des gros organites des cellules lors de leur mouvement fournirait certainement des informations importantes sur le régime stationnaire.

Enfin, il est possible que des réarrangements internes à la cellule se mettent en place au cours du mouvement. En effet, les cellules mettent une dizaine de secondes, parfois beaucoup plus, pour atteindre la fin du réseau. Dans ce laps de temps, il n'est pas impossible que la cellule présente un remodelage ou une rupture partielle de son réseau d'actine, ou une dépolymérisation des microtubules dans les zones fortement contraintes. La forme finale, bien qu'imposée par la géométrie en début de parcours, pourrait ensuite être adoptée par la cellule grâce à des remodelages de son cytosquelette sous l'effet de la contrainte. Des visualisations spécifiques des différents éléments du cytosquelette seraient alors nécessaires pour connaître son état après un passage à travers le réseau.

Chapitre 16

Pince MicroFluidique

Lors de leur transport dans les réseaux microfluidiques des chapitres précédents, les cellules subissent de fortes déformations, à partir desquelles nous arrivons à extraire des informations sur leur rhéologie. La contrainte et la déformation ne sont toutefois pas bien définies (voir chapitre 13), et ne permettent pas une approche réellement rhéométrique.

Pour soumettre les cellules à un écoulement bien défini, nous explorons l'application d'un écoulement élongationnel à la déformation cellulaire. Nous cherchons alors à mesurer la contrainte appliquée par l'écoulement ainsi que la déformation de l'objet placé à l'intérieur. Une difficulté majeure réside toutefois dans l'instabilité intrinsèque de l'écoulement élongationnel. Ainsi, afin de garder la cellule au centre du dispositif, nous devons mettre au point un système d'asservissement de la position de la cellule en couplant la caméra et le contrôleur de pression. Une fois relevé ce défi technique, nous effectuons quelques expériences préliminaires afin de tester les capacités du système à déformer des cellules.

Nous étudions tout d'abord le dispositif utilisé pour ensuite analyser, à l'aide de simulations numériques, l'écoulement créé sous différentes conditions de pression et de débit. Pour finir, nous présentons les résultats préliminaires réalisés sur deux types de cellules.

16.1 Croix Microfluidique

Un écoulement élongationnel est représenté sur la figure 16.1a. Il est caractérisé par deux directions principales, pour lesquelles le mouvement du fluide est symétrique et opposé par rapport au centre, qui se nomme point de stagnation de l'écoulement. Sur le schéma 16.1a, la direction verticale est rentrante, la direction horizontale est sortante. Au point de stagnation, l'écoulement est ainsi stable verticalement et instable horizontalement. Le système d'asservissement doit donc

stabiliser la cellule selon la direction horizontale.

Pour créer cet écoulement, nous fabriquons un dispositif en forme de croix, inspiré de plusieurs travaux [78, 49, 55], en empruntant notamment la géométrie utilisée par Kanstler et al. Les canaux réalisés sont reproduits sur la figure 16.1. La largeur des grands canaux ainsi que les rayons de courbure des quatre coins mesurent $500\mu\text{m}$. Les dispositifs réalisés ont une hauteur de $h = 120\mu\text{m}$. Pour donner plus de stabilité à l'écoulement et pour obtenir une plus grande sensibilité sur le contrôle des pressions, nous ajoutons une résistance hydrodynamique à chaque sortie du dispositif. Ces résistances sont constituées de serpents de $50\mu\text{m}$ de largeur, pour une longueur totale d'environ 10cm .

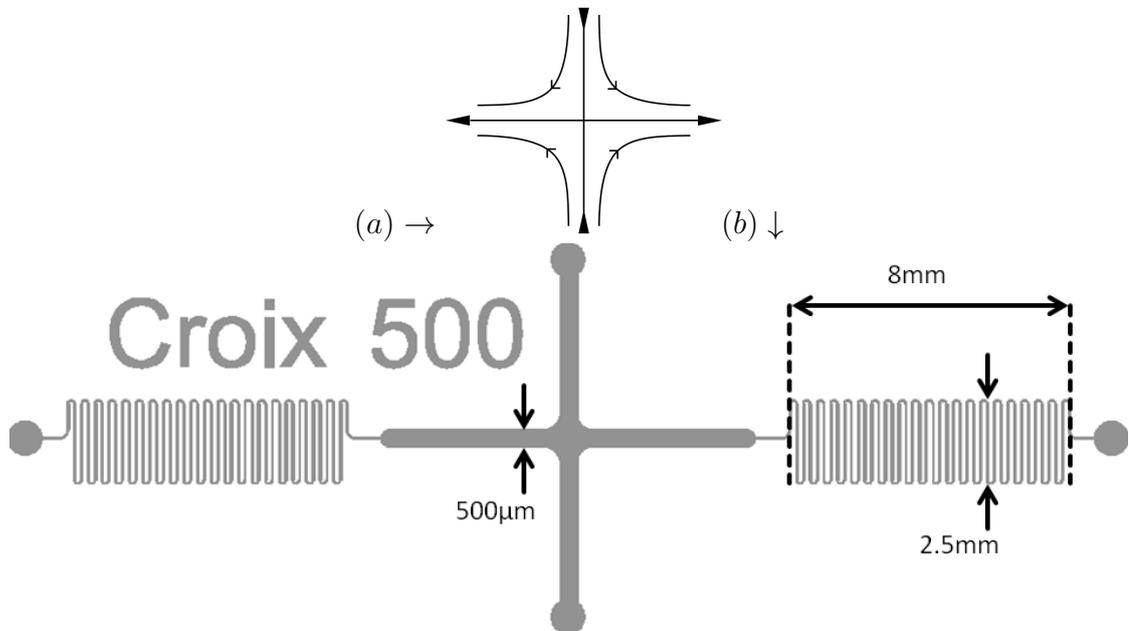


FIGURE 16.1 – (a) Schéma d'un écoulement élongationnel. (b) Schéma de la croix réalisée pour les expériences.

Expérimentalement, l'écoulement est assuré par un pousse-seringue qui assure un débit constant et stable face à des perturbations. Il se branche sur les deux orifices verticaux, en haut et en bas sur la figure 16.1. Les deux orifices restants sont branchés au distributeur de pression. Celui-ci n'est pas en mesure de modifier le débit total de l'écoulement du pousse-seringue. En revanche, il peut modifier les répartitions des flux entre les deux sorties. C'est par cet intermédiaire que nous pourrions agir sur la position de la cellule placée au centre.

16.2 Modélisation de l'écoulement dans le dispositif

Nous simulons l'écoulement dans le dispositif grâce au logiciel Comsol. Les circuits créés possédant des dimensions $h/l = 120/500 < 1$, nous faisons le choix de la simplicité et nous réalisons les calculs sur une géométrie en deux dimensions. Nous imposons une vitesse entrante de 1mm.s^{-1} en haut et en bas (voir Fig.16.1) pour simuler un pousse-seringue. La condition limite de sortie à gauche comme à droite est une pression constante, simulant le contrôleur Fluigent.

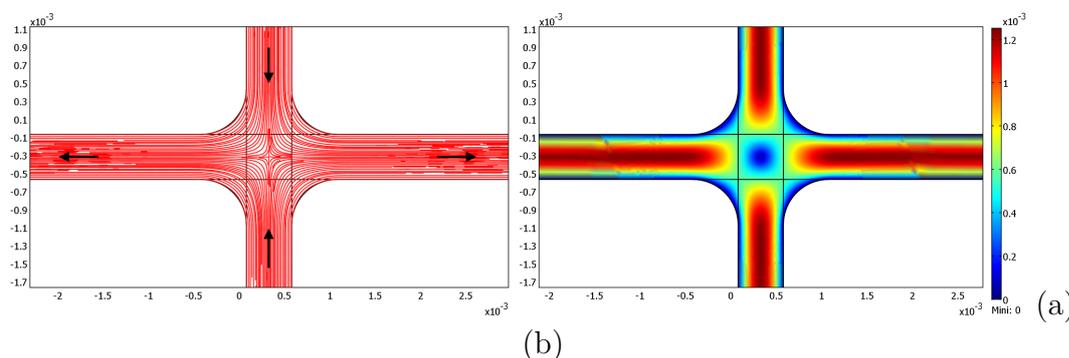


FIGURE 16.2 – Graphique de l'écoulement simulé pour des débits entrants de 1mm.s^{-1} et des pressions de sortie de 500Pa . A : Ligne de courant de l'écoulement. Le liquide rentre en haut et en bas ; il sort à gauche et à droite. B : Module de la vitesse de l'écoulement de l'écoulement.

Les résultats de la simulation pour des pressions de sorties égales à 500Pa sont présentés sur la figure 16.2. Les lignes de courant de la figure 16.2a montrent que l'écoulement est bien élongationnel : il est anti-symétrique par une rotation de $\pi/2$, présente une compression selon l'axe vertical et une extension selon l'axe horizontal. La figure 16.2a montre de plus que le module de la vitesse dans chaque bras de la croix est identique.

La figure 16.3 représente le module de la vitesse selon une ligne horizontale au centre de l'écoulement. Comme l'indiquent les deux lignes rouges, la variation de la vitesse de l'écoulement au centre du dispositif est linéaire. Dans une zone proche du centre de la croix, le champ de vitesse a donc la forme d'un écoulement purement élongationnel :

$$\vec{V} = \begin{pmatrix} +\dot{\epsilon} \cdot (x - x_0) \\ -\dot{\epsilon} \cdot (y - y_0) \end{pmatrix} \quad (16.1)$$

où $(x_0; y_0)$ est la position du centre de l'écoulement.

Lorsque les pressions de sortie sont déséquilibrées, le point de stagnation est déplacé du côté de la plus forte pression. Sur la figure 16.4, nous appliquons une

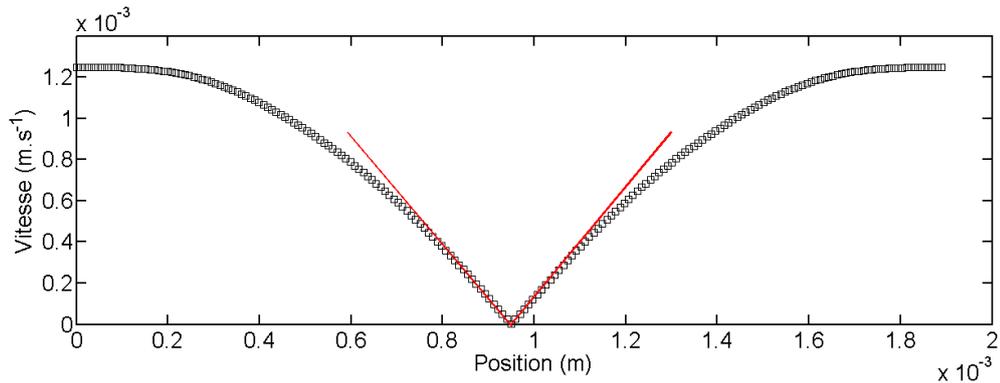


FIGURE 16.3 – Profil de vitesse de l'écoulement selon une ligne horizontale située au centre de l'écoulement. Ligne rouge : tangente de la variation de la vitesse au centre de l'écoulement.

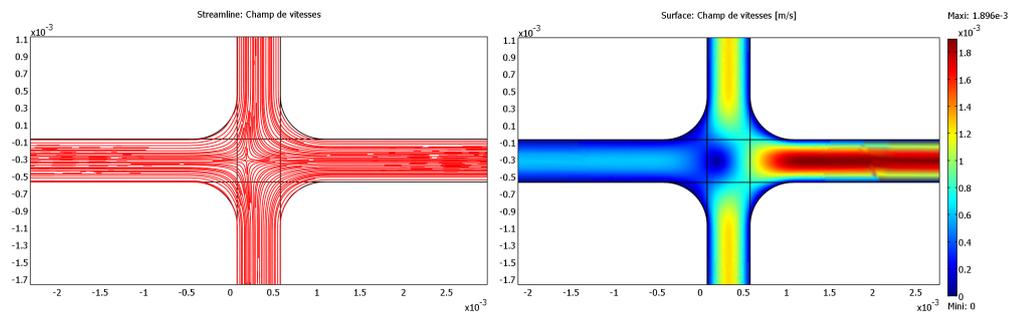


FIGURE 16.4 – Graphique de l'écoulement simulé pour des débits entrants de 1mm.s^{-1} et des pressions de sortie de 600Pa à gauche et 400Pa à droite. A : Ligne de courant de l'écoulement. Le liquide entre en haut et en bas ; il sort à gauche et à droite. B : Vitesse absolue de l'écoulement.

différence de pression de 200mbar entre la sortie de gauche et la sortie de droite. Le point de stagnation se trouve à gauche du centre et l'écoulement en $(x_0; y_0)$ se fait alors vers la droite. Dans cette situation, un objet situé au centre de la croix serait entraîné par le fluide et déplacé vers la droite.

La figure 16.5 reproduit le profil de vitesse sur une ligne horizontale au centre de la croix. Bien que le point de stagnation de l'écoulement ne soit plus au centre du dispositif, nous notons que les variations de vitesse restent linéaires, comme l'indiquent les lignes rouges tangentes. L'approximation de l'écoulement élongationnel pur reste donc valide dans cette situation.

Pour asservir la position d'une cellule au centre du dispositif, nous devons donc modifier en temps réel les pressions de sortie pour modifier la position du point de stagnation de l'écoulement et imposer un mouvement à la cellule, afin de s'opposer à ses variations de position. Cependant, à chaque instant de l'asservissement et pour des différences de pressions modérées, l'écoulement appliqué à la cellule est toujours un écoulement élongationnel bien défini. La contrainte hydrodynamique

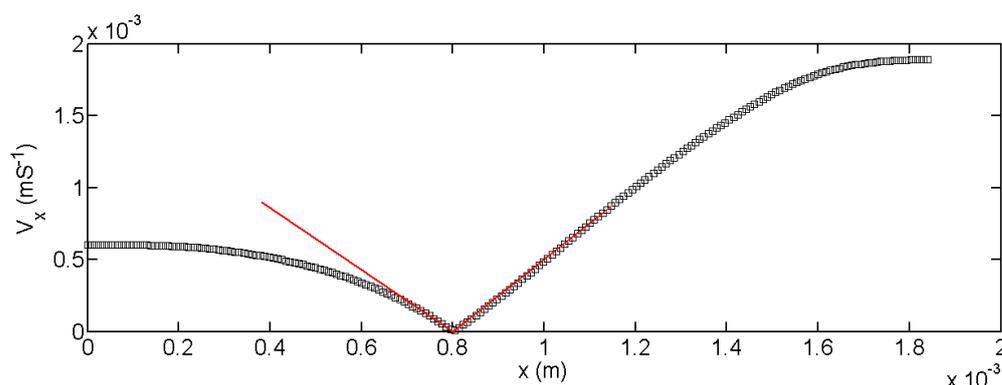


FIGURE 16.5 – Profil de vitesse de l'écoulement selon une ligne horizontale située au centre de l'écoulement. Ligne rouge : tangente de la variation de la vitesse au centre de l'écoulement.

existant au centre de l'écoulement s'exprime alors simplement :

$$\sigma_{croix} = \eta_0 \dot{\epsilon}(Q) \quad (16.2)$$

où η_0 est la viscosité du fluide externe. Le taux de cisaillement au centre $\dot{\epsilon}$ dépend du débit Q imposé par le pousse-seringue.

16.3 Asservissement de la position

L'écoulement que nous cherchons à appliquer est bien un écoulement purement élongationnel, quelques soient les conditions de pression nécessaires au maintien de la cellule. Nous pouvons donc maintenant nous intéresser à l'établissement du dispositif.

Nous étudions d'abord la formule choisie pour l'asservissement qui relie entre la position et la vitesse de la cellule mesurée et la pression appliquée. Nous effectuons alors une étude théorique du système en établissant l'équation différentielle du système et en cherchant à en retirer toutes les informations disponibles sur la dynamique du système.

16.3.1 Choix de la formule

Nous appliquons une différence de pression entre la gauche et la droite du dispositif, autour d'une pression constante P_0 . P_1 est branché à gauche vers les X négatifs, P_2 est branché à droite vers les X positifs (Fig. 16.6). Les pressions valent $P_1 = P_0 + dP/2$ et $P_2 = P_0 - dP/2$.

Pour le calcul de la différence de pression à appliquer, on choisit une formule de la forme suivante :

$$dP = -A\dot{X} - B(X - X_0) \quad (16.3)$$

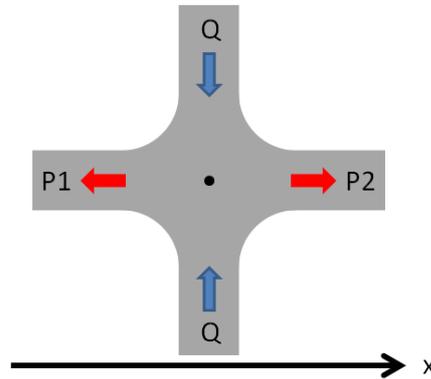


FIGURE 16.6 – Schéma des branchements du dispositif. Q désigne le débit constant du pousse-seringue, P_1 et P_2 sont les pressions délivrées par le contrôleur Fluigent. Le point noir central représente une cellule à l'échelle dans le dispositif.

où X est la position de la cellule, \dot{X} sa vitesse, et X_0 la position du centre du dispositif. Elle traduit les deux conditions nécessaires pour maintenir la cellule au centre :

- Sa vitesse doit être nulle. Le premier terme a donc pour rôle de créer une valeur de dépression s'opposant à la vitesse de la cellule : si, par exemple, elle se déplace vers la droite, \dot{X} est positif et génère alors un terme de pression négatif.
- Sa position doit coïncider avec le centre du dispositif. Le deuxième terme pénalise alors tout écart entre la position de la cellule X et le centre de la croix en X_0 . Si la cellule est à droite du centre par exemple, $X - X_0$ est positif et engendre une dépression négative.

Dans cette configuration de pression (P_1 à gauche, P_2 à droite), les deux coefficients sont positifs. Par souci de simplicité et pour la suite du raisonnement, nous plaçons l'origine des axes au centre de la croix. Nous avons alors $X_0 = 0$.

16.3.2 Équation Différentielle Associée

Nous cherchons ici à savoir comment l'écoulement créé par l'asservissement agit sur la cellule. Nous écrivons la force de traînée sur la cellule selon l'horizontale :

$$F_{drag} = \zeta(V_x^{fluide} - \dot{X}) \quad (16.4)$$

où ζ est le coefficient de traînée de la cellule. Dans le cas d'une cellule parfaitement sphérique par exemple, nous aurions $\zeta = 6\pi\eta R_{cellule}$. Comme l'ont montré les figures 16.3 et 16.5, l'écoulement à proximité du point de stagnation est linéaire et s'écrit $V_x^{fluide} = \dot{\epsilon}(X - X_c(dP))$. La position du point de stagnation X_c dépend de la différence de pression appliquée entre les deux sorties du dispositif, et donc de la dynamique du système d'asservissement.

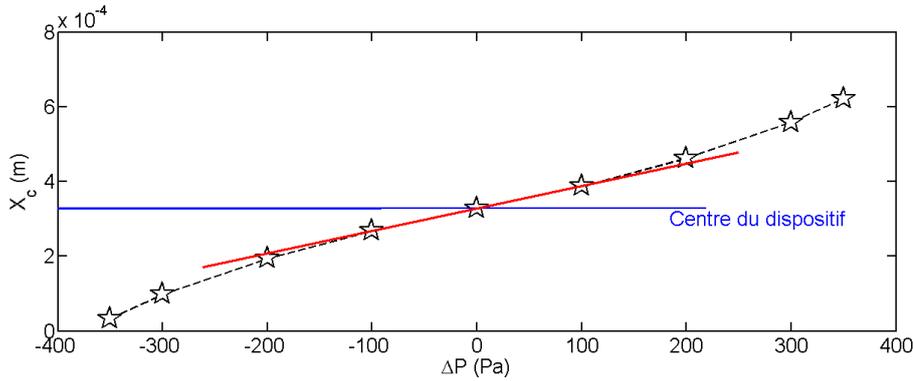


FIGURE 16.7 – Position du point de stagnation de l'écoulement simulé avec Comsol en fonction de la différence de pression appliquée. Ligne bleue : position du centre de la croix. Ligne rouge : variation linéaire pour des différences de pression faibles.

La position du point de stagnation de l'écoulement en fonction de la différence de pression appliquée est indiquée sur la figure 16.7. Pour des différences de pression $|dP|$ supérieures à $400Pa$, le point de stagnation est renvoyé à l'infini. L'écoulement dans la branche horizontale est alors unidirectionnel : le fluide des deux branches se déplace vers la gauche ou vers la droite. Pour des $|dP|$ inférieures à $200Pa$, la variation de X_c avec dP est linéaire. Considérant que l'asservissement fonctionne en régime linéaire, proche de $dP = 0$, nous choisissons de prendre $X_c = -k.dP$.

A partir du principe fondamental de la dynamique $m_{cell}\ddot{X} = F_{drag}$ et en intégrant les formules de la force de traînée et de position de centre de l'écoulement, nous obtenons l'équation différentielle du second ordre suivante :

$$\ddot{X} + \frac{\zeta}{m_{cell}}(1 + k\dot{A})\dot{X} + \frac{\zeta}{m_{cell}}\dot{\epsilon}(kB - 1)X = 0 \quad (16.5)$$

La détermination de l'équation semble violer le principe d'écoulement à bas nombre de Reynolds, normalement important dans des systèmes microfluidiques. Nous devons cependant prendre en compte l'accélération de la cellule dans l'équilibre des forces pour faire apparaître un terme du deuxième ordre \ddot{X} , nécessaire pour obtenir un système oscillant compatible avec les observations.

16.3.3 Comportement du système

Nous identifions ainsi le premier terme de l'asservissement $A\dot{X}$ comme le terme d'amortissement du système, et le deuxième $B(X - X_0)$ comme le terme élastique, c'est-à-dire le ressort du système qui est à l'origine des oscillations. Pour ce genre d'équation différentielle, les oscillations apparaissent lorsque le terme de ressort est trop important par rapport à l'amortissement.

L'équation 16.5, de la forme $\ddot{X} + \alpha\dot{X} + \beta X = 0$, a des solutions différentes en fonction du déterminant $\Delta = \alpha^2 - 4\beta$.

Pour $\Delta > 0$, la solution est de la forme $X(t) = Pe^{\lambda_1 t} + Qe^{\lambda_2 t}$ avec $\lambda_{1,2} = \frac{-\alpha \pm \sqrt{\Delta}}{2}$, P et Q deux réels quelconques. Si les deux valeurs propres $\lambda_{1,2}$ sont négatives, alors la solution converge ($X(t) \rightarrow 0$). Si une des valeurs propres est positive, la solution diverge ($X(t) \rightarrow \infty$) : l'asservissement est alors instable.

Pour $\Delta = 0$, la solution prend la forme $X(t) = (Rt + S)e^{\lambda t}$ où la racine double vaut $\lambda = \frac{-\alpha}{2}$ et R et S sont deux réels quelconques. Le raisonnement précédent sur le signe des valeurs propres s'applique aussi à λ : le système diverge si $\lambda > 0$.

Pour $\Delta < 0$, la solution est $X(t) = U^*e^{\lambda_1 t} + V^*e^{\lambda_2 t}$. Les racines sont alors complexes conjuguées et valent $\lambda_{1,2} = \frac{-\alpha \pm i\sqrt{|\Delta|}}{2}$. Les coefficients U^* et V^* sont complexes également. Nous pouvons réécrire les solutions sous la forme $X(t) = e^{\frac{-\alpha t}{2}} \left(U^*e^{+\frac{i\sqrt{\Delta}t}{2}} + V^*e^{-\frac{i\sqrt{\Delta}t}{2}} \right)$, qui sont alors des fonctions oscillantes, convergentes pour $\alpha > 0$ et divergentes pour $\alpha < 0$.

Ainsi, pour maintenir un régime stable, nous devons conserver $\Delta > 0$. Cela est possible en augmentant α ou en baissant β . Or, β dépend de B qui est la constante de rappel élastique du système. Plus nous augmentons le débit, plus il faut augmenter B afin de garder une force de rappel comparable à la force répulsive de l'écoulement. Ainsi, au cours d'une expérience, une augmentation de débit nécessite une augmentation de B pour garder un maintien assez fort sur la cellule, et donc une augmentation de A afin de conserver une dynamique stable.

Cette analyse n'est valide que pour les domaines linéaires de comportement de l'asservissement, pour lesquels l'hypothèse $X_c = -k.dP$ est valable. En effet, certaines caractéristiques de la dynamique du système ne peuvent pas être décrites de cette façon. C'est le cas par exemple pour la déstabilisation oscillante qui peut être générée par le terme $A\dot{X}$ dans le cas de A très grand : une vitesse à gauche ou à droite de la cellule entraîne l'application d'une pression dP très grande qui envoie la cellule du côté opposé très rapidement ; ceci a pour effet de générer une pression opposée encore plus grande, et ainsi de suite. Prendre en compte cette résonance nécessiterait l'inclusion dans les équations du temps de réponse global du système, c'est-à-dire le laps de temps existant entre la détection d'un défaut de position et l'application de la dépression associée.

16.4 Résultats Préliminaires et Pistes

Quelques expériences préliminaires sont effectuées afin de vérifier la fonctionnalité du système d'asservissement. Nous présentons ici les résultats principaux en terme de maintien et de déformation de cellules.

16.4.1 Maintien de la cellule

Dans un premier temps, nous maintenons une cellule en l'absence d'écoulement au centre de l'image. Cette expérience permet de définir une méthode de manipulation des cellules à l'aide de l'asservissement. Pour amener une cellule au centre de la croix, nous n'avons ainsi qu'à trouver une cellule dans le dispositif et verrouiller l'asservissement afin de fixer la position de la cellule au centre de l'image. Le déplacement de la platine du microscope permet alors de déplacer la cellule dans le dispositif et de la positionner à l'endroit désiré. Le système mérite à ce titre son nom de "pince microfluidique".

Le maintien des cellules sous écoulement est actuellement possible pour des valeurs de débits entrants jusqu'à $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. L'application d'un débit se fait toujours de façon graduelle car les coefficients A et B de l'asservissement doivent être ajustés au fur et à mesure de la montée en débit. Un équilibre doit en effet être conservé entre un maintien trop léger de la cellule qui fait apparaître des dérives par rapport à la consigne et un maintien trop ferme qui engendre des oscillations instables de la cellule.

16.4.2 Déformation de cellules

Des essais de déformation sont effectués sur deux types de cellules différentes afin d'évaluer les capacités du système.

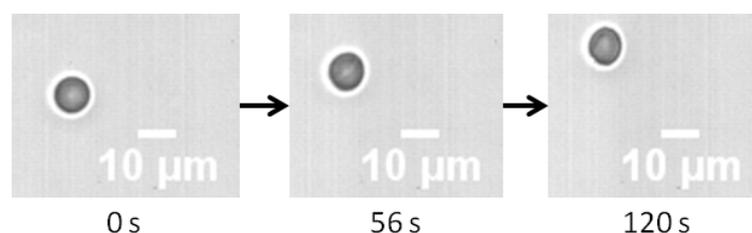


FIGURE 16.8 – Photo d'un globule rouge suspendu dans une solution de PBS-Dextran $2.10^6\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ à $9\%w/w$ et placé dans un écoulement élongationnel. Débit appliqué : $1.2\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$.

Globules rouges et Dextran Des globules rouges suspendus dans une solution de PBS-Dextran $2.10^6\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ à $9\%w/w$ sont maintenus au centre de l'écoulement pendant une durée de 2 à 3 minutes. La figure 16.8 montre une de ces cellules à trois instants différents, avec un débit de pousse-seringue de $1.2\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$. L'écoulement comprime la cellule selon l'axe horizontal et l'étire selon l'axe vertical. Il apparaît au cours du temps une faible déformation, atteignant un maximum de 6.5% à $t = 120\text{s}$.

Avec des globules rouges, les observations sont principalement limitées par l'orientation de la cellule par rapport à l'écoulement. Les images de la figure 16.8

montrent une cellule à plat dans le plan du dispositif microfluidique. Après 150s, la cellule effectue une rotation de 90° autour de l'axe vertical de l'image, de la même manière que les cellules faisant du Rolling étudiées au chapitre 7. Une fois sur la tranche, le programme d'analyse d'image ne peut plus détecter la cellule et celle-ci s'échappe par une des conduites de sortie.

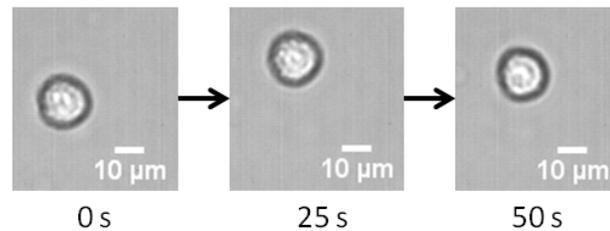


FIGURE 16.9 – Photo d'un globule blanc traité à la latrunculine, suspendu dans du milieu de culture et placé dans un écoulement élongationnel. Débit appliqué : $2mL.h^{-1}$.

THP-1 traités à la latrunculine Des cellules THP-1 traitées à la latrunculine sont introduites dans le dispositif. La figure 16.9 montre trois images d'une cellule placée au centre de l'écoulement, pour un débit de $2mL.h^{-1}$. Nous n'observons aucune déformation sur une échelle de 50s. Seule l'orientation de la cellule change : au cours d'une expérience, elle tourne sur elle-même et se ré-orienté pour placer son axe le plus petit dans la direction de compression.

16.5 Perspectives

Le dispositif mis en place permet, à la manière d'une pince optique, de maintenir une cellule à une position donnée, avec ou sans écoulement extérieur. Il permet de plus d'appliquer une contrainte variable, plus ou moins forte suivant le débit appliqué par le pousse-seringue. Nous pouvons pour l'instant imposer un débit maximal de $2mL.h^{-1}$ et maintenir la cellule dans cette situation pendant quelques minutes. Dans ses conditions, nous ne parvenons pas à déformer suffisamment une cellule pour envisager une expérience de rhéométrie exploitable.

Ce système ouvre les portes de deux types d'expériences : déformation de cellules sous contrainte hydrodynamique et visualisation d'événement biologique de cellules sous contrainte. Des améliorations spécifiques sont cependant nécessaires pour le rendre complètement exploitable.

Il faut dans un premier temps établir le lien entre le débit imposé Q et le taux de cisaillement au centre $\dot{\gamma}$ afin de connaître précisément l'amplitude de la contrainte ressentie par une cellule au point de stagnation. Cette relation peut être établie expérimentalement en observant le mouvement de microbilles dans l'écoulement

à plusieurs débits, à partir duquel nous pourrions déterminer les paramètres de l'écoulement. Il est aussi envisageable de faire cette étude numériquement avec le logiciel Comsol. Il sera alors très important de connaître précisément les paramètres du système (taille des canaux, viscosité du milieu à la température de travail) pour en tirer des résultats pertinents.

Le dispositif d'asservissement doit, dans un deuxième temps, être étudié plus en détail afin de connaître précisément sa dynamique. Les équations déterminées plus haut ne sont en effet valables que dans un certain régime où $X_c = -k.dP$ et où le temps de réponse de l'asservissement peut être négligé. Pour pouvoir exploiter le dispositif complètement, il faut étudier et déterminer les plages de stabilité de l'asservissement et en tirer des tables de $A(Q)$ et $B(Q)$ permettant de maintenir une cellule fixe avec certitude.

Enfin, des améliorations sont nécessaires en fonction de l'expérience que l'on désire mener. Si l'on cherche à déformer un objet, on doit augmenter la contrainte appliquée au centre, ce qui est possible de deux manières : augmenter la viscosité du fluide environnant et/ou augmenter le débit maximal. Une forte viscosité peut être atteinte par ajout de Dextran, par exemple. L'augmentation du débit nécessitera, en plus des points abordés dans les deux précédents paragraphes, d'augmenter les volumes de travail du système (en augmentant la taille des seringues par exemple).

Un deuxième type d'expérience concerne l'observation d'évolutions biologiques des cellules engendrées par la contrainte hydrodynamique. On cherche dans ce cas à appliquer une contrainte sur une cellule pendant un temps long et à regarder, directement ou par fluorescence, les modifications de la cellule (changement de forme, apparition d'un flux calcique, différenciation spécifique de la cellule, etc). On doit pour cela adapter le programme d'asservissement à une visualisation par fluorescence. Il faut là aussi augmenter les volumes de travail disponibles pour augmenter le temps maximal d'observation. On pourrait alors envisager des expériences de plusieurs heures, permettant l'observation de phénomènes lents.

Chapitre 17

Conclusion

Dans cette partie, le mouvement de monocytes THP-1 dans des réseaux de microcanaux biomimétiques est étudié et décomposé en trois régimes principaux. A partir de la première déformation des cellules lors de leur entrée dans un canal, nous obtenons des informations sur leur rhéologie. Nous proposons alors un modèle rhéologique cellulaire composé d'un solide de Kelvin-Voigt en série avec un amortisseur visqueux, encapsulés par une membrane soumise à une tension constante. Nous étudions ensuite la première phase du mouvement, qui décrit un mouvement irrégulier des cellules, que nous interprétons comme le régime d'adaptation de la forme de la cellule au mouvement. Les cellules adoptent finalement un régime de mouvement stationnaire, au cours duquel la trajectoire est régulière et périodique, et la vitesse de transport est constante. Nous interprétons la dynamique de cette dernière phase comme un équilibre entre la force de poussée de la pression appliquée et les forces de friction entre les cellules et les parois du dispositif. A la suite de ce travail, des nombreuses questions restent sans réponse. Nous fournissons ici quelques pistes pour la suite des recherches.

Nous montrons que le taux de stabilisation de la trajectoire des cellules diminue lorsque leur rigidité globale augmente (Tableau 14.1). Pour mieux comprendre ce phénomène, il serait intéressant d'étudier les temps de stabilisation de la cellule, pour la trajectoire, la forme et la vitesse. L'interprétation en lien avec la rhéologie de la cellule permettrait de mieux comprendre comment s'opère le transfert entre le mouvement dominé par les déformations et le mouvement dominé par la friction. Il est, de plus, possible qu'une relation étroite existe entre le temps de stabilisation et les valeurs de η_2 et τ_0 , ce qui permettrait alors une évaluation de leur valeur.

L'interprétation finale par la friction de la cellule avec le dispositif permet de bien décrire les courbes observées. L'interprétation physique des coefficients de friction reste toutefois mal connue. Le coefficient de friction est relié à une couche de lubrification dans le canal droit. Comment se fait-il alors qu'il conserve la même

valeur pour la friction effective avec le réseau complet ?

De même, si l'existence d'un coefficient de frottement solide est fortement appuyé par les courbes 15.11, son origine physique reste inconnue. Est-il simplement dû à l'interaction des cellules avec les parois, ou à la structure particulière du réseau ? Existe-t-il lorsque les cellules circulent dans un canal simple ?

Enfin, nous avons interprété ici tous les résultats avec des arguments purement mécaniques et rhéologiques. Or, les cellules sont des objets vivants, capables de réorganiser activement leur structure interne en réponse à des stimulations extérieures. Dès lors, une visualisation en fluorescence des différents éléments internes apporterait très certainement de nombreuses informations sur la réaction biologique des cellules à la déformation. Le mouvement des cellules étant toutefois très rapide pour les pressions physiologiques appliquées, il n'est pour l'instant pas possible de visualiser ces éléments lors du mouvement des cellules. Seules sont visibles les cellules à vitesse réduite, avant ou après le réseau.

L'étude réalisée ici est un travail exploratoire, pour lequel nous avons cherché à utiliser le système le plus simple possible. Les réseaux de capillaires pulmonaires sont en réalité plus complexes, et nous pourrions tenter de réaliser des systèmes plus proches des réseaux physiologiques. Ainsi, il serait intéressant de fabriquer des réseaux de canaux de largeur, longueur et connectivité variables afin d'observer si la cellule se stabilise, et si c'est le cas, comment. Nous pourrions également étudier le rôle de la friction dans ces nouvelles géométries.

Conclusion Générale

Le travail présenté ici aborde plusieurs sujets concernant la dynamique de cellules sanguines dans des microécoulements. Dans la première partie, nous avons présenté un sujet mûr, débuté il y a dix ans, pour lequel nous avons étudié et caractérisé les régimes de mouvement de globules rouges dans différents écoulements de cisaillement. La deuxième partie concerne l'étude exploratoire commencée avec cette thèse sur le transport de globules blancs dans des réseaux de microcanaux biomimétiques pour lesquels nous avons étudié le lien entre la rhéologie des cellules et leur mouvement. Pour terminer, nous avons exposé les prémices d'un dispositif expérimental permettant d'appliquer une contrainte connue et continue sur des cellules, dont la finalisation et l'exploitation restent à faire.

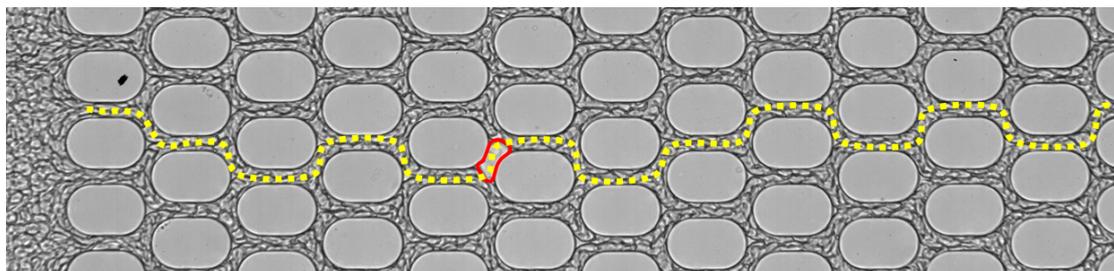


FIGURE 17.1 – Image d'un monocyte dans un réseau rempli de globules rouges. La ligne rouge entoure le THP-1. La ligne jaune représente sa trajectoire.

Ce travail n'aborde pas un aspect important des écoulements sanguins : les interactions entre cellules, particulièrement entre les globules rouges et les globules blancs. En effet, les globules blancs dans les poumons sont en contact permanent avec des globules rouges, dont l'écoulement influence beaucoup leur mouvement (ségrégation, margination). Avec notre dispositif, il serait intéressant d'étudier le mouvement de THP-1 dans une solution contenant des globules rouges, comme le montre la figure 17.1. Il serait alors possible d'observer comment le transport des THP-1 est influencé par les globules rouges.

Annexes

Détails explicites des constantes géométriques

Les différents constantes utilisées dans les équations sont définies à partir du travail de Keller et Skalak [56] pour un ellipsoïde oblate de petit axe a_2 et de grands axes a_1 et a_3 :

$$\begin{aligned}a_0 &= (a_1 a_2 a_3)^{1/3} \\g_3' &= \int_0^\infty \frac{ds}{\left(\frac{a_1^2}{a_0^2} + s\right)\left(\frac{a_2^2}{a_0^2} + s\right)\sqrt{\left(\frac{a_1^2}{a_0^2} + s\right)\left(\frac{a_2^2}{a_0^2} + s\right)\left(\frac{a_3^2}{a_0^2} + s\right)}} \\z_1 &= \frac{1}{2} \cdot \left(\frac{a_1^2}{a_2} - \frac{a_2^2}{a_1}\right) \\z_2 &= g_3' \cdot \left(\frac{a_1^2}{a_0} + \frac{a_2^2}{a_0}\right) \\f_1 &= 4 \cdot z_1^2 \\f_2 &= 4 \cdot z_1^2 \cdot \left(1 - \frac{2}{z_2}\right) \\f_3 &= -4 \cdot \frac{z_1}{z_2} \\ \text{excentricité : } e &= \sqrt{1 - \left(\frac{a_2}{a_1}\right)^2} \\ \text{rapport des volumes : } \frac{\Omega}{V} &= \frac{3}{2} \cdot \frac{h}{a_2} \cdot \left(1 + \left(\frac{a_2}{a_1}\right)^2 \cdot \frac{1}{e} \cdot \ln \frac{1+e}{1-e}\right)\end{aligned}$$

Section de Poincaré et diagramme de premier retour

Considérons une solution $(\omega(t), \theta(t), \phi(t))$ du système d'équation 6.1. Une section de Poincaré du système est une coupe du diagramme de phase par un plan, choisi par l'utilisateur (Fig. 17.2a) .

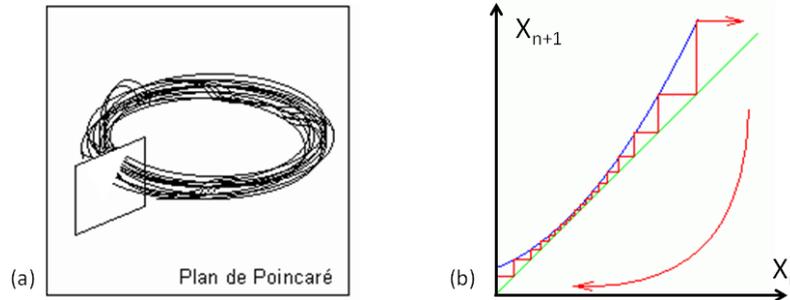


FIGURE 17.2 – (a) Schéma illustrant la construction d'une section de Poincaré. (b) Bleu : Diagramme de premier retour d'un système. Vert : bissectrice. Rouge : cheminement du système par rebond sur la bissectrice.

Dans le cas des globules rouges, les sections de Poincaré sont réalisées en $\phi = 0$ lorsque ϕ est croissant. L'ensemble des points sélectionnés est alors $(\omega(\phi(t) = 0), \theta(\phi(t) = 0))$: on sélectionne les points de la solution qui appartiennent au plan $\phi = 0$. Alors, le diagramme ω_n^* en fonction de θ_n^* définit le diagramme de Poincaré du système en $\phi = 0$. Si la solution est stable et périodique, alors le diagramme représente un point. Toutes les variables étant périodiques, elle possède toutes une valeur identique lorsqu'elles sont évaluées au même moment. Si le système est instable, les variables ne sont pas périodiques et les valeurs ne se répètent pas entre chaque cycle. Le diagramme de Poincaré a alors une forme plus complexe.

A partir de des valeurs ω_n^* et θ_n^* , nous pouvons construire un diagramme de premier retour. Il s'agit alors de tracer les X_{n+1}^* en fonction des X_n^* , pour toutes les valeurs de n . Ce diagramme permet de représenter schématiquement l'évolution d'un système complexe sur une surface en 2 dimensions. En effet, pour passer de la valeur n à la valeur $n + 1$, on procède par rebond sur la première bissectrice du graphique (Fig. 17.2). Là encore, si un système est stable, alors $X_n^* = X_{n+1}^*$ et le diagramme de premier retour est un point de la première bissectrice. Si le système est instable, alors $X_n^* \neq X_{n+1}^*$ et le diagramme représente une courbe.

Calcul complet des exposants de Lyapunov

Considérons une système d'équation différentielle de la forme suivante :

$$\frac{d\vec{X}}{dt} = \mathbf{F}(\vec{X}) \quad (17.1)$$

L'équation linéaire d'évolution d'un écart à sa solution $\vec{X}_s(t)$ s'écrit :

$$\frac{d(\delta\vec{X})}{dt} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \vec{X}}(\vec{X}_s(t)) \cdot \delta\vec{X} = \mathbf{J}(\vec{X}(t)) \delta\vec{X} \quad (17.2)$$

où \mathbf{J} est la matrice Jacobienne du système, défini par :

$$\mathbf{J}_{i,j} = \frac{\partial F_i}{\partial x_j} \quad (17.3)$$

L'équation 17.2 est une équation du premier ordre, dont la solution formelle est :

$$\delta\vec{X}(t) = e^{\int_{\vec{X}_s(t)} \mathbf{J}(u) du} \cdot \delta\vec{X}(0) = \mathbf{L}(t) \cdot \delta\vec{X}(0) \quad (17.4)$$

Pour un système à 3 dimensions, $\mathbf{L}(t)$ est une matrice 3×3 . Ses 3 valeurs propres sont $\Lambda_i(t) = e^{\lambda_i t}$. L'exponentielle étant une opération linéaire, nous pouvons écrire directement que les valeurs propres de $\int_{\vec{X}(t)} \mathbf{J}(s) ds$ sont $\lambda_i t$. Les exposants de Lyapunov sont les 3 coefficients λ_i .

Ainsi pour calculer les exposants de Lyapunov d'une trajectoire, nous suivons la méthode suivante :

- Calculer une solution $(\omega(t), \theta(t))$ du système.
- Calculer la matrice $\mathbf{J}(t)$ pour chaque point de cette solution.
- Intégrer : $\mathbf{M}(t) = \int_{\vec{X}_s(t)} \mathbf{J}(s) ds$
- Calculer les valeurs propres de \mathbf{M} en différents instants.
- Si elles tendent asymptotiquement vers une droite, réaliser un ajustement des données par une droite dont la pente est l'exposant de Lyapunov correspondant.

Un système dynamique chaotique possède au moins un de ses exposants de Lyapunov positif, indiquant que $|\delta\vec{X}(t \rightarrow \infty)| \rightarrow \infty$.

Bibliographie

- [1] M. Abkarian, M. Faivre, and A. Viallat. Swinging of Red Blood Cells under Shear Flow. *Physical Review Letters*, 98(18) :2–5, Apr. 2007.
- [2] M. Abkarian, M. Faivre, A. Viallat, and L. Collo. Supplementary Information on the paper entitled : Swinging of Red Blood Cells under Shear Flow. *Physical Review Letters*, 98(18), 2007.
- [3] M. Abkarian, C. Lartigue, and A. Viallat. Tank Treading and Unbinding of Deformable Vesicles in Shear Flow : Determination of the Lift Force. *Physical Review Letters*, 88(6) :1–4, Jan. 2002.
- [4] J. L. Arlett, E. B. Myers, and M. L. Roukes. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature nanotechnology*, 6(4) :203–15, Apr. 2011.
- [5] P. Bagchi and R. M. Kalluri. Rheology of a dilute suspension of liquid-filled elastic capsules. *Physical Review E*, 81(5) :1–11, May 2010.
- [6] M. Balland, N. Desprat, D. Icard, S. Féréol, A. Asnacios, J. Browaeys, S. Hénon, and F. Gallet. Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Physical Review E*, 74(2) :1–17, Aug. 2006.
- [7] K. Barclay, G. Klassen, and C. Young. A method for detecting chaos in canine myocardial microcirculatory red cell flux. *Microcirculation*, 7 :335–346, 2000.
- [8] G. Barshtein, D. Wajnblum, and S. Yedgar. Kinetics of linear rouleaux formation studied by visual monitoring of red cell dynamic organization. *Biophysical journal*, 78(5) :2470–4, May 2000.
- [9] O. K. Baskurt and H. J. Meiselman. Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 29(5) :435–50, Oct. 2003.
- [10] M. Bathe, A. Shirai, C. M. Doerschuk, and R. D. Kamm. Neutrophil transit times through pulmonary capillaries : the effects of capillary geometry and fMLP-stimulation. *Biophysical journal*, 83(4) :1917–33, Oct. 2002.
- [11] J. P. Beech and J. O. Tegenfeldt. Tuneable separation in elastomeric microfluidics devices. *Lab on a chip*, 8(5) :657–9, May 2008.

- [12] V. Bennett and D. Gilligan. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annual review of cell biology*, 9 :27–66, 1993.
- [13] M. Bitbol. Red blood cell orientation in orbit $C=0$. *Biophysical journal*, 49(5) :1055–1068, 1986.
- [14] F. Bretherton. The motion of long bubbles in tubes. *Journal of Fluid Mechanics*, 10(02) :166–188, 1961.
- [15] K. a. Brown, S. D. Brain, J. D. Pearson, J. D. Edgeworth, S. M. Lewis, and D. F. Treacher. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, 368(9530) :157–69, July 2006.
- [16] R. Bruinsma. Rheology and shape transitions of vesicles under capillary flow. *Physica A : Statistical Mechanics and its Applications*, 234(1) :249–270, 1996.
- [17] M. Bubb, A. Senderowicz, E. Sausville, K. Duncan, and E. Korn. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *Journal of Biological Chemistry*, 269(21) :14869, 1994.
- [18] M. Bubb, I. Spector, B. Beyer, and K. Fosen. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization AN EXPLANATION FOR CERTAIN IN VIVO OBSERVATIONS. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7) :5163–5170, Feb. 2000.
- [19] C. Campillo, B. Pépin-Donat, and A. Viallat. Responsive viscoelastic giant lipid vesicles filled with a poly(N-isopropylacrylamide) artificial cytoskeleton. *Soft Matter*, 3(11) :1421, 2007.
- [20] K. N. Dahl, A. J. Engler, J. D. Pajerowski, and D. E. Discher. Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophysical journal*, 89(4) :2855–64, Oct. 2005.
- [21] J. Deschamps, V. Kantsler, E. Segre, and V. Steinberg. Dynamics of a vesicle in general flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28) :11444–7, July 2009.
- [22] J. Deschamps, V. Kantsler, and V. Steinberg. Phase Diagram of Single Vesicle Dynamical States in Shear Flow. *Physical Review Letters*, 102(11) :3–6, Mar. 2009.
- [23] L. Dintenfass. Internal viscosity of the red cell and a blood viscosity equation. *Nature*, 219, 1968.
- [24] W. R. Dodson and P. Dimitrakopoulos. Tank-treading of erythrocytes in strong shear flows via a nonstiff cytoskeleton-based continuum computational modeling. *Biophysical journal*, 99(9) :2906–16, Nov. 2010.

- [25] C. Doerschuk. Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 8(2) :71–88, Apr. 2001.
- [26] J. Dupire, M. Abkarian, and A. Viallat. Chaotic Dynamics of Red Blood Cells in a Sinusoidal Flow. *Physical Review Letters*, 104(16) :1–4, Apr. 2010.
- [27] C. Ethier and C. Simmons. *Introductory Biomechanics*. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
- [28] E. Evans, A. Leung, V. Heinrich, and C. Zhu. Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a P-selectin adhesion bond. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31) :11281–11286, 2004.
- [29] E. Evans and D. Needham. Physical properties of surfactant bilayer membranes : thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *Journal of Physical Chemistry*, 91 :4219–4228, 1987.
- [30] E. Evans and A. Yeung. Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration. *Biophysical journal*, 56(1) :151–60, July 1989.
- [31] D. A. Fedosov, J. Fornleitner, and G. Gompper. Margination of white blood cells in microcapillary flow. *Soft Matter*, 2011.
- [32] T. Fischer, M. Stohr-Lissen, and G. W. Schmid-Schönbein. The red cell as a fluid droplet : tank tread-like motion of the human erythrocyte membrane in shear flow. *Science*, 202(November) :894–896, 1978.
- [33] T. M. Fischer. Shape memory of human red blood cells. *Biophysical journal*, 86(5) :3304–13, May 2004.
- [34] R. S. Frank and M. a. Tsai. The behavior of human neutrophils during flow through capillary pores. *Journal of biomechanical engineering*, 112(3) :277–82, Aug. 1990.
- [35] Y. Fung. *Biomechanics*. Springer, New York, 1993.
- [36] S. Gabriele, A.-M. Benoliel, P. Bongrand, and O. Théodoly. Microfluidic investigation reveals distinct roles for actin cytoskeleton and myosin II activity in capillary leukocyte trafficking. *Biophysical journal*, 96(10) :4308–18, May 2009.
- [37] H. L. Goldsmith and J. Marlow. Flow Behaviour of Erythrocytes. I. Rotation and Deformation in Dilute Suspensions. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 182(1068) :351–384, Oct. 1972.
- [38] T. Griffith. Temporal chaos in the microcirculation. *Cardiovascular research*, 31(95) :342–358, 1996.
- [39] K. Guevorkian, M.-J. Colbert, M. Durth, S. Dufour, and F. Brochard-Wyart. Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Physical Review Letters*, 104(21) :1–4, May 2010.

- [40] F. Guilak, J. R. Tedrow, and R. Burgkart. Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochemical and biophysical research communications*, 269(3) :781–6, Mar. 2000.
- [41] Q. Guo, S. Park, and H. Ma. Microfluidic micropipette aspiration for measuring the deformability of single cells. *Lab on a chip*, 12(15) :2687–95, Aug. 2012.
- [42] E. Guyon, J.-P. Hulin, and L. Petit. *Hydrodynamique physique*. EDP Sciences, Paris, cnrs edition, 2001.
- [43] S. Hénon, G. Lenormand, a. Richert, and F. Gallet. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophysical journal*, 76(2) :1145–51, Feb. 1999.
- [44] R. M. Hochmuth, H. P. Ting-Beall, B. B. Beaty, D. Needham, and R. Tran-Son-Tay. Viscosity of passive human neutrophils undergoing small deformations. *Biophysical journal*, 64(5) :1596–601, May 1993.
- [45] J. C. Hogg, H. O. Coxson, M. L. Brumwell, N. Beyers, C. M. Doerschuk, W. MacNee, and B. R. Wiggs. Erythrocyte and polymorphonuclear cell transit time and concentration in human pulmonary capillaries. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 77(4) :1795–800, Oct. 1994.
- [46] S. H. Holm, J. P. Beech, M. P. Barrett, and J. O. Tegenfeldt. Separation of parasites from human blood using deterministic lateral displacement. *Lab on a chip*, 11(7) :1326–32, Apr. 2011.
- [47] L. R. Huang, E. C. Cox, R. H. Austin, and J. C. Sturm. Continuous particle separation through deterministic lateral displacement. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5673) :987–90, May 2004.
- [48] Y. Huang, C. M. Doerschuk, and R. D. Kamm. Computational modeling of RBC and neutrophil transit through the pulmonary capillaries. *Journal of Applied Physiology*, 90(2) :545–64, Feb. 2001.
- [49] J. Hur, E. Shaqfeh, H. Babcock, and S. Chu. Dynamics and configurational fluctuations of single DNA molecules in linear mixed flows. *Physical Review E*, 66(1) :3–6, July 2002.
- [50] G. B. Jeffery. The Motion of Ellipsoidal Particles Immersed in a Viscous Fluid. *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 102(715) :161–179, Nov. 1922.
- [51] W. Jones, H. Ping Ting-Beall, G. Lee, S. Kelley, R. Hochmuth, and F. Guilak. Alterations in the Young’s modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *Journal of biomechanics*, 32(2) :119–127, 1999.

- [52] M.-C. Jullien, M.-J. Tsang Mui Ching, C. Cohen, L. Menetrier, and P. Tabeling. Droplet breakup in microfluidic T-junctions at small capillary numbers. *Physics of Fluids*, 21(7) :072001, 2009.
- [53] H. Kan, H. Udaykumar, W. Shyy, and R. Tran-Son-Tay. Hydrodynamics of a compound drop with application to leukocyte modeling. *Physics of fluids*, 10(4) :760–774, 1998.
- [54] H. C. Kan, W. Shyy, H. S. Udaykumar, P. Vigneron, and R. Tran-Son-Tay. Effects of nucleus on leukocyte recovery. *Annals of biomedical engineering*, 27(5) :648–55, 1999.
- [55] V. Kantsler, E. Segre, and V. Steinberg. Critical Dynamics of Vesicle Stretching Transition in Elongational Flow. *Physical Review Letters*, 101(4) :1–4, July 2008.
- [56] S. R. Keller and R. Skalak. Motion of a tank-treading ellipsoidal particle in a shear flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 120 :27–47, Apr. 1982.
- [57] S. Kessler, R. Finken, and U. Seifert. Swinging and tumbling of elastic capsules in shear flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 605(May 2008), May 2008.
- [58] D. Khismatullin. The cytoskeleton and deformability of white blood cells. *Current Topics in Membranes*, 64(09) :47–111, 2009.
- [59] T. G. Kuznetsova, M. N. Starodubtseva, N. I. Yegorenkov, S. a. Chizhik, and R. I. Zhdanov. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 38(8) :824–33, Jan. 2007.
- [60] D. Le. Effect of bending stiffness on the deformation of liquid capsules enclosed by thin shells in shear flow. *Physical Review E*, 82(1) :1–8, July 2010.
- [61] G. Lenormand, S. Hénon, a. Richert, J. Siméon, and F. Gallet. Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton. *Biophysical journal*, 81(1) :43–56, July 2001.
- [62] G. Lenormand, S. Hénon, a. Richert, J. Siméon, and F. Gallet. Elasticity of the human red blood cell skeleton. *Biorheology*, 40(1-3) :247–51, Jan. 2003.
- [63] J. F. Lesesve, L. Garçon, and T. Lecompte. Finding knizocytes in a peripheral blood smear. *American journal of hematology*, 87(1) :105–6, Jan. 2012.
- [64] G. Lim H W, M. Wortis, and R. Mukhopadhyay. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell : evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26) :16766–9, Dec. 2002.

- [65] B. Long, M. Heller, J. Beech, H. Linke, H. Bruus, and J. Tegenfeldt. Multi-directional sorting modes in deterministic lateral displacement devices. *Physical Review E*, 78(4) :1–9, Oct. 2008.
- [66] Y. Luan, O. Lieleg, B. Wagner, and A. R. Bausch. Micro- and macrorheological properties of isotropically cross-linked actin networks. *Biophysical journal*, 94(2) :688–93, Jan. 2008.
- [67] J. Mitchison and M. Swann. The mechanical properties of the cell surface I. The cell elastimeter. *Journal of Experimental Biology*, 31(3) :443–460, 1954.
- [68] N. Mohandas and E. Evans. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *biophysics and biomolecular structure*, pages 787–818, 1994.
- [69] R. Mukhopadhyay, H. Gerald Lim, and M. Wortis. Echinocyte shapes : bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing. *Biophysical journal*, 82(4) :1756–1772, 2002.
- [70] D. Needham and R. M. Hochmuth. Rapid flow of passive neutrophils into a 4 microns pipet and measurement of cytoplasmic viscosity. *Journal of biomechanical engineering*, 112(3) :269–76, Aug. 1990.
- [71] D. Needham and R. M. Hochmuth. A sensitive measure of surface stress in the resting neutrophil. *Biophysical journal*, 61(6) :1664–70, June 1992.
- [72] B. Neu, R. Wenby, and H. J. Meiselman. Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation. *Biophysical journal*, 95(6) :3059–65, Sept. 2008.
- [73] M. Nishino, H. Tanaka, H. Ogura, Y. Inoue, T. Koh, K. Fujita, and H. Sugimoto. Serial Changes in Leukocyte Deformability and Whole Blood Rheology in Patients With Sepsis or Trauma. *The Journal of Trauma : Injury, Infection, and Critical Care*, 59(6) :1425–1431, Dec. 2005.
- [74] H. Noguchi. Swinging and synchronized rotations of red blood cells in simple shear flow. *Physical Review E*, 80(2) :021902, Aug. 2009.
- [75] F. Nuchsongsin, K. Chotivanich, P. Charunwatthana, F. Omodeo-Salè, O.-S. Fausta, D. Taramelli, N. P. Day, N. J. White, and A. M. Dondorp. Effects of malaria heme products on red blood cell deformability. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(4) :617–22, Oct. 2007.
- [76] A. Pai, P. Sundd, and D. F. J. Tees. In situ Microrheological Determination of Neutrophil Stiffening Following Adhesion in a Model Capillary. *Annals of biomedical engineering*, 36(4) :596–603, Apr. 2008.
- [77] A. Palmer, B. Cha, and D. Wirtz. Structure and dynamics of actin filament solutions in the presence of latrunculin A. *Journal of Polymer Science Part B : Polymer Physics*, 36(17) :3007–3015, Dec. 1998.

- [78] T. T. Perkins, D. E. Smith, and S. Chu. Single polymer dynamics in an elongational flow. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5321) :2016–21, June 1997.
- [79] D. N. Pinder. Shape of human red cells. *Journal of theoretical biology*, 34(3) :407–10, Mar. 1972.
- [80] D. Raucher and M. P. Sheetz. Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophysical journal*, 77(4) :1992–2002, Oct. 1999.
- [81] C. Revenu, R. Athman, S. Robine, and D. Louvard. The co-workers of actin filaments : from cell structures to signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(8) :635–46, Aug. 2004.
- [82] M. J. Rosenbluth, W. a. Lam, and D. a. Fletcher. Force microscopy of nonadherent cells : a comparison of leukemia cell deformability. *Biophysical journal*, 90(8) :2994–3003, Apr. 2006.
- [83] P. Ruef and O. Linderkamp. Deformability and geometry of neonatal erythrocytes with irregular shapes. *Pediatric research*, 45(1) :114–9, Jan. 1999.
- [84] G. W. Schmid-Schönbein, K. L. Sung, H. Tözeren, R. Skalak, and S. Chien. Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophysical journal*, 36(1) :243–56, Oct. 1981.
- [85] H. Schmid-Schönbein and R. Wells. Fluid drop-like transition of erythrocytes under shear. *Science (New York, N.Y.)*, 165(3890) :288–91, July 1969.
- [86] T. Secomb and R. Skalak. Surface flow of viscoelastic membranes in viscous fluids. *The Quarterly Journal of Mechanics*, 35 :233, 1982.
- [87] C. Semmrich, T. Storz, J. Glaser, R. Merkel, A. R. Bausch, and K. Kroy. Glass transition and rheological redundancy in F-actin solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51) :20199–203, Dec. 2007.
- [88] J. M. Skotheim and T. W. Secomb. Red Blood Cells and Other Nonspherical Capsules in Shear Flow : Oscillatory Dynamics and the Tank-Treading-to-Tumbling Transition. *Physical Review Letters*, 98(7) :3–6, Feb. 2007.
- [89] S. a. Soper, K. Brown, A. Ellington, B. Frazier, G. Garcia-Manero, V. Gau, S. I. Gutman, D. F. Hayes, B. Korte, J. L. Landers, D. Larson, F. Ligler, A. Majumdar, M. Mascini, D. Nolte, Z. Rosenzweig, J. Wang, and D. Wilson. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosensors & bioelectronics*, 21(10) :1932–42, Apr. 2006.
- [90] I. Spector, N. Shochet, Y. Kashman, and A. Groweiss. Latrunculins : novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science*, 219(4584) :493, 1983.
- [91] I. Spector, N. R. Shochet, D. Blasberger, and Y. Kashman. Latrunculins—novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect

- cell growth : I. Comparison with cytochalasin D. *Cell motility and the cytoskeleton*, 13(3) :127–44, Jan. 1989.
- [92] Y. Sui, Y. T. Chew, P. Roy, Y. P. Cheng, and H. T. Low. Dynamic motion of red blood cells in simple shear flow. *Physics of Fluids*, 20(11) :112106, 2008.
- [93] K. L. Sung, C. Dong, G. W. Schmid-Schönbein, S. Chien, and R. Skalak. Leukocyte relaxation properties. *Biophysical journal*, 54(2) :331–6, Aug. 1988.
- [94] G. I. Taylor. The Motion of Ellipsoidal Particles in a Viscous Fluid. *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 103(720) :58–61, Apr. 1923.
- [95] D. P. Theret, M. J. Levesque, M. Sato, R. M. Nerem, and L. T. Wheeler. The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements. *Journal of biomechanical engineering*, 110(3) :190–9, Aug. 1988.
- [96] R. Tran-Son-Tay, D. Needham, a. Yeung, and R. M. Hochmuth. Time-dependent recovery of passive neutrophils after large deformation. *Biophysical journal*, 60(4) :856–66, Oct. 1991.
- [97] R. Tran-Son-Tay, S. Suter, and P. Rao. Determination of red blood cell membrane viscosity from rheoscopic observations of tank-treading motion. *Biophysical journal*, 46(July) :65–72, 1984.
- [98] R. Tran-Son-Tay, S. P. Suter, G. I. Zahalak, and P. R. Rao. Membrane stress and internal pressure in a red blood cell freely suspended in a shear flow. *Biophysical journal*, 51(6) :915–24, June 1987.
- [99] X. Trepas, F. Puig, N. Gavara, J. J. Fredberg, R. Farre, and D. Navajas. Effect of stretch on structural integrity and micromechanics of human alveolar epithelial cell monolayers exposed to thrombin. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 290(6) :L1104–10, June 2006.
- [100] W. R. Trickey, F. P. T. Baaijens, T. a. Laursen, L. G. Alexopoulos, and F. Guilak. Determination of the Poisson's ratio of the cell : recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration. *Journal of biomechanics*, 39(1) :78–87, Jan. 2006.
- [101] J. Trzeciakowski and W. M. Chilian. Chaotic behavior of the coronary circulation. *Medical & biological engineering & computing*, 46(5) :433–42, May 2008.
- [102] M. a. Tsai, R. S. Frank, and R. E. Waugh. Passive mechanical behavior of human neutrophils : power-law fluid. *Biophysical journal*, 65(5) :2078–88, Nov. 1993.

- [103] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, 26(2) :171–6, Aug. 1980.
- [104] C. Verdier, J. Etienne, A. Duperray, and L. Preziosi. Review : Rheological properties of biological materials. *Comptes Rendus Physique*, 10(8) :790–811, Nov. 2009.
- [105] N. Walter, A. Micoulet, T. Seufferlein, and J. P. Spatz. Direct assessment of living cell mechanical responses during deformation inside microchannel restrictions. *Biointerphases*, 6(3) :117, Sept. 2011.
- [106] N. Watanabe, H. Kataoka, T. Yasuda, and S. Takatani. Dynamic deformation and recovery response of red blood cells to a cyclically reversing shear flow : Effects of frequency of cyclically reversing shear flow and shear stress level. *Biophysical journal*, 91(5) :1984–98, Sept. 2006.
- [107] H. Wong, C. Radke, and S. Morris. The motion of long bubbles in polygonal capillaries. Part 1. Thin films. *Journal of Fluid Mechanics*, 292 :71–94, 1995.
- [108] H. Wong, C. Radke, and S. Morris. The motion of long bubbles in polygonal capillaries. Part 2. Drag, fluid pressure and fluid flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 292 :95–110, 1995.
- [109] P. K. Wong, W. Tan, and C.-M. Ho. Cell relaxation after electrodeformation : effect of latrunculin A on cytoskeletal actin. *Journal of biomechanics*, 38(3) :529–35, Mar. 2005.
- [110] C. Woods and E. Lazarides. The erythroid membrane skeleton : expression and assembly during erythropoiesis. *Annual review of medicine*, 1988.
- [111] B. Yap and R. D. Kamm. Mechanical deformation of neutrophils into narrow channels induces pseudopod projection and changes in biomechanical properties. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(5) :1930–9, May 2005.
- [112] A. Yeung and E. Evans. Cortical shell-liquid core model for passive flow of liquid-like spherical cells into micropipets. *Biophysical journal*, 56(1) :139–49, July 1989.

Dynamique de Cellules Sanguines dans des Microécoulements

Cette thèse traite de la dynamique de cellules sanguines dans la microcirculation. Cette appellation regroupe les deux thématiques de mon travail.

La première est l'étude du mouvement de globules rouges soumis à un écoulement de cisaillement. Prenant la suite des travaux réalisés par Manouk Abkarian, Magalie Faivre et Annie Viallat, nous avons étudié le mouvement de cellules dans un flux oscillant et mis en évidence l'apparition de chaos (Dupire J. et al, PRL 104,168101 (2010)). Nous avons ensuite repris l'étude sous écoulement constant pour comprendre les régimes de mouvement encore non étudiés (article accepté à PNAS). Tous ces travaux se basent sur un modèle à forme ellipsoïdale constante (type Keller & Skalak) auquel a été rajouté un terme tenant compte de l'élasticité de la membrane. Pour mieux modéliser la mémoire de forme, nous avons recalculé les équations du modèle en tenant compte d'une nouvelle forme non contrainte du cytosquelette élastique. Elle nous permet entre autres d'ajuster le modèle aux données expérimentales en utilisant des valeurs de viscosité et de module élastique de cisaillement compatibles avec la littérature.

Le deuxième partie traite de l'étude du mouvement de globules blancs dans un réseau de canaux microfluidiques. Ce réseau est régulier et possède des dimensions biomimétiques. Nous étudions comment la rhéologie des cellules influe sur leur mouvement à travers le dispositif. Nous montrons que l'entrée des cellules, et donc leur première déformation, peut être utilisée pour obtenir des informations sur leur rhéologie (viscosité, élasticité, tension). Le mouvement est ensuite décomposé en deux grandes phases : un régime "transitoire" juste après l'entrée et un régime "stationnaire" final. Nous étudions ces régimes en terme de déformation cellulaire et de friction.

Dynamics of Blood Cells in Microflows

This thesis deals with dynamics of blood cells in microflow. This title regroups two aspects of my work.

The first one studies the movement of red blood cells (RBC) under flow. Continuing the work done by M. Abkarian, M. Faivre and A. Viallat, we looked at RBCs in an oscillating shear flow and showed the presence of chaos in the motion (Dupire J. et al, PRL 104,168101 (2010)). Then we continued the study of RBC under constant flow to understand the regime of motion that were still to elucidate (PNAS, accepted for publication). These works use a ellipsoidal fixed shape model (based on Keller and Skalak's) to which we add an elastic membrane term. To take into account the shape memory, we calculated again the equations of motion considering a new stress-free shape of the elastic cytoskeleton. It allows us to fit the model on the experimental data using viscosity and elasticity coefficient compatible with the litterature.

The second part deals with the motion of white blood cell (WBC) in a microfluidic channel network. The device has a regular geometry and has biomimetic shape characteristics matching the human lung mean values. We aim to study how the cell's rheology is related to their motion through the device. We show how the entry of the cell, and thus their first deformation, can be used to obtain information about a single cell rheology (viscosity, elasticity, tension). The motion is then decomposed in 2 phases : a transient regime right after the entrance and a final stationary regime. We study these regimes in terms of cellular deformation and wall friction.