



Université de Montréal

**‘Influence de l’agrégation érythrocytaire sur la migration axiale de microparticules  
simulant des plaquettes sanguines’**

par  
Cyrille Guilbert

Institut de génie biomédical  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l’obtention du grade de Maîtrise és sciences appliquées (M.Sc.A)  
en génie biomédical

Juin, 2009

© Cyrille Guilbert, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :  
Influence de l'agrégation érythrocytaire sur la migration axiale de microparticules  
simulant des plaquettes sanguines

présenté par :  
Cyrille Guilbert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvain Martel, Ph.D., M.Sc.A., Ing  
Président-rapporteur

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

Marianne Fenech, Ph.D., M.Sc.A., Ing  
Membre du jury

## Résumé

Lors du phénomène d'hémostase primaire ou de thrombose vasculaire, les plaquettes sanguines doivent adhérer aux parois afin de remplir leur fonction réparatrice ou pathologique. Pour ce faire, certains facteurs rhéologiques et hémodynamiques tels que l'hématocrite, le taux de cisaillement local et les contraintes de cisaillement pariétal, entrent en jeu afin d'exclure les plaquettes sanguines de l'écoulement principal et de les transporter vers le site endommagé ou enflammé.

Cette exclusion pourrait aussi être influencée par l'agrégation de globules rouges qui est un phénomène naturel présent dans tout le système cardiovasculaire selon les conditions d'écoulement. La dérive de ces agrégats de globules rouges vers le centre des vaisseaux provoque la formation de réseaux d'agrégats dont la taille et la complexité varient en fonction de l'hématocrite et des conditions de cisaillement présentes. Il en résulte un écoulement bi-phasique avec un écoulement central composé d'agrégats de globules rouges avoisinés par une région moins dense en particules où l'on peut trouver des globules rouges singuliers, des petits rouleaux de globules rouges et une importante concentration en plaquettes et globules blancs. De ce fait, il est raisonnable de penser que plus la taille des agrégats qui occupent le centre du vaisseau augmente, plus il y aura de plaquettes expulsées vers les parois vasculaires. L'objectif du projet est de quantifier, *in vitro*, la migration des plaquettes sanguines en fonction du niveau d'agrégation érythrocytaire présent, en faisant varier l'hématocrite, le taux de cisaillement et en promouvant l'agrégation par l'ajout d'agents tels que le dextran à poids moléculaire élevé. Cependant, le comportement non Newtonien du sang dans un écoulement tubulaire peut être vu comme un facteur confondant à cause de son impact sur l'organisation spatiale des agrégats de globules rouges. De ce fait, les études ont été réalisées dans un appareil permettant de moduler, de façon homogène, la taille et la structure de ces agrégats et de quantifier ainsi leur effet sur la migration axiale des plaquettes. Du sang de porc anti coagulé a été ajusté à différents taux d'hématocrite et insérer dans un appareil à écoulement de Couette, à température ambiante. Les plaquettes sanguines, difficilement isolables *in vitro* sans en activer certains ligands membranaires, ont été remplacées par des fantômes en polystyrène ayant un revêtement de biotine. La

quantification de la migration de ces fantômes de plaquettes a été réalisée grâce à l'utilisation de membranes biologiques fixées sur les parois internes de l'entrefer du rhéomètre de Couette. Ces membranes ont un revêtement de streptavidine assurant une très forte affinité d'adhésion avec les microparticules biotynilées.

À 40% d'hématocrite, à un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ ,  $566 \pm 53$  microparticules ont été comptées pour un protocole préétabli avec du sang non agrégeant, comparativement à  $1077 \pm 229$  pour du sang normal et  $1568 \pm 131$  pour du sang hyper agrégeant. Les résultats obtenus suggèrent une nette participation de l'agrégation érythrocytaire sur le transport des fantômes de plaquettes puisque l'adhésion de ces derniers à la paroi du rhéomètre de Couette augmente de façon quasi exponentielle selon le niveau d'agrégation présent.

**Mots-clés** : Hémostase primaire, thrombose vasculaire, plaquettes sanguines, agrégation érythrocytaire, taux de cisaillement, hématocrite, migration, écoulement Couette

## Abstract

During the primary hemostasis or thrombosis phenomenon, the human blood platelets must adhere to the vascular wall in order for them to perform their repairing or pathological function. To do so, certain rheological and hemodynamic factors such as the hematocrit, local shear rate and the wall shear stress, must come into play to exclude blood platelets from the main blood stream and transport them to the vicinity of the damaged or inflamed site.

This exclusion could also be influenced by red blood cell aggregation which is a natural process present throughout the entire cardiovascular system under certain flow conditions. The displacement of these rouleaux of red blood cells towards the centre of the vessel induces the formation of 3D networks of aggregates whose size and complexity vary as a function of the hematocrit and the shearing conditions present. It results in a two phase flow with an inner core composed of red blood cell aggregates surrounded by single red blood cells or small aggregates and large numbers of white blood cells and platelets. It is therefore reasonable to believe that the larger the inner core becomes, the more platelets will be expelled towards the vascular wall. The objective of the study was to quantify, *in vitro*, the lateral migration of blood platelets as a function of the level of red blood cell aggregation present, by changing the hematocrit, the shear rate and by promoting red blood cell aggregation with the use of agents such as high molecular weight dextran. However, the non Newtonian behavior of blood in tube flow can be seen as a confounding factor to the understanding of the spatial organization of the red blood cell aggregates. In this study, whole blood was circulated in a simple shear flow apparatus, which allowed to homogeneously modulate the red blood cell aggregate sizes and structure, and quantify their effect on the axial migration of blood platelets. Anticoagulated porcine bloods were adjusted to different hematocrits and inserted into a Couette flow apparatus, at room temperature. Blood platelets, difficult to isolate *in vitro* without activating in a non reproducible manner specific membrane ligands, were replaced with biotin coated fluorescent polystyrene beads. The quantification of the migration of these platelet ghosts was conducted with the use of biological membranes fixed on the interior walls of the Couette apparatus. These streptavidin coated membranes ensure a strong adhesive affinity with the biotinylated beads.

At 40% hematocrit and at a shear of  $2 \text{ s}^{-1}$ ,  $566 \pm 53$  micro particles were counted for non aggregated erythrocytes,  $1077 \pm 229$  for aggregating red blood cells and  $1568 \pm 131$  for hyper aggregating blood. The results obtained suggest a strong participation of the red blood cell aggregation on the transport of platelet ghosts since the number of ghost cells fixed on the wall of the Couette rheometer increases almost exponentially with the level of aggregation present.

**Keywords** : primary hemostatis, thrombosis, blood platelets, red blood cell aggregation, shear rate, hematocrit, migration, Couette flow

## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des symboles et des abréviations .....	xvii
Remerciements.....	xx
Introduction.....	1
<b>CHAPITRE 1 : RÔLES ET COMPOSITION DU SANG.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Rôles du sang .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Composition du sang.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Le plasma et éléments figurés .....	3
1.2.2. Les érythrocytes .....	4
1.2.3. Les leucocytes .....	5
1.2.4. Les plaquettes sanguines .....	5
<b>CHAPITRE 2 : HÉMOSTASE - UN MÉCANISME DE DÉFENSE.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Les différentes étapes de l'hémostase .....</b>	<b>7</b>
2.1.1. Contraction du vaisseau endommagé .....	8
2.1.2. Accolements des surfaces endothéliales.....	9
2.1.3. Formation d'un bouchon plaquettaire. ....	9
2.1.4. Coagulation du sang : formation d'un caillot sanguin.....	11
2.1.5. Facteur pro-coagulant - le fibrinogène .....	12
2.1.6. Qu'est ce qui déclenche la coagulation ? .....	12
2.1.7. Rétraction du caillot .....	15
2.1.8. Résumé.....	16
<b>2.2. Facteurs qui s'opposent à la formation de caillot.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. Facteur mécanique qui affecte l'hémostase.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4. La thrombose vasculaire.....</b>	<b>18</b>
2.4.1. Un mécanisme pathologique .....	18
2.4.2. Mécanisme de la thrombose .....	20



2.4.3.	Conséquences de la thrombose.....	21
<b>CHAPITRE 3 : LA RHÉOLOGIE DU SANG – QUELQUES RAPPELS.....</b>		<b>22</b>
<b>3.1. La viscosité.....</b>		<b>22</b>
3.1.1.	Expérience fondamentale de Couette .....	22
3.1.2.	La viscosité dynamique.....	23
3.1.3.	La viscosité cinématique .....	24
<b>3.2. Fluide Newtonien et non Newtonien .....</b>		<b>25</b>
3.2.1.	Fluide Newtonien .....	25
3.2.2.	Fluide non Newtonien .....	25
3.2.3.	Écoulement d'un fluide Newtonien dans un tube.....	26
3.2.4.	Écoulement d'un fluide non Newtonien dans un tube.....	28
<b>3.3. Agrégation érythrocytaire .....</b>		<b>29</b>
3.3.1.	Définition .....	29
3.3.2.	Propriétés viscosimétriques du sang.....	30
3.3.3.	Modification artificielle des propriétés viscosimétriques du sang.....	32
<b>3.4. Le transport de masse .....</b>		<b>33</b>
3.4.1.	Principe .....	33
<b>3.5. Influence des globules rouges dans la diffusion des microparticules en suspension.....</b>		<b>34</b>
3.5.1.	Caractéristiques d'un globule rouge singulier .....	35
3.5.2.	Les théories proposées .....	36
<b>CHAPITRE 4 : OBJECTIF DU PROJET .....</b>		<b>38</b>
<b>CHAPITRE 5 : MATÉRIEL ET MÉTHODE.....</b>		<b>41</b>
<b>5.1. Principes et matériel.....</b>		<b>43</b>
5.1.1.	Revêtement protéinique.....	44
5.1.1.1.	Rappel sur le principe d'anticorps-antigène.....	44
5.1.1.2.	La (strept)avidine et la biotine .....	44
5.1.2.	Principe de la fluorescence.....	47
5.1.2.1.	Introduction.....	47
5.1.2.2.	Excitation d'un électron.....	48
5.1.2.3.	Principe.....	49
5.1.2.4.	Couple de longueur d'onde excitation/émission .....	51
5.1.3.	Le rhéomètre de Couette .....	51
5.1.3.1.	Profil de vitesse présent dans l'entrefer du rhéomètre de Couette et relation entre la vitesse angulaire et le taux de cisaillement.....	53
5.1.3.2.	Le Nombre de Taylor.....	56
5.1.4.	Les microparticules .....	57
5.1.4.1.	Procédure de marquage par fluorescence.....	58
5.1.5.	Sélection des produits.....	59
5.1.6.	Les méthodes d'imagerie .....	62

<b>5.2. Méthodologie.....</b>	<b>65</b>
5.2.2. Préparation des échantillons sanguins .....	65
5.2.3. Protocole de mesure .....	67
5.2.4. Contrôle du moteur pas-à-pas et du pousse-seringue .....	72
5.2.5. Lavage des membranes .....	72
5.2.6. Post-traitement des membranes.....	73
<b>5.3. Analyse statistique.....</b>	<b>74</b>
<b>CHAPITRE 6 : RÉSULTATS.....</b>	<b>77</b>
<b>6.1. Méthodes d'imagerie des membranes.....</b>	<b>77</b>
6.1.1. Contrôle des membranes et des microparticules .....	77
6.1.2. Contrôle qualité du Typhoon PhosphorImager .....	78
6.1.3. Comparaison entre les images obtenues du microscope Zeiss et du Typhoon PhosphorImager	80
<b>6.2. Résultats concernant la migration de particules.....</b>	<b>82</b>
6.2.1. Validation expérimentale .....	82
6.2.2. Résultats du protocole 1 – Quantification de la migration des microparticules en fonction de l'hématocrite et de l'agrégabilité érythrocytaire à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ .....	84
6.2.3. Résultats du protocole 2 – Quantification de la migration des microparticules en fonction de l'agrégabilité érythrocytaire à un cisaillement de $10 \text{ s}^{-1}$ .....	86
<b>CHAPITRE 7 : DISCUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>7.1. Récapitulatif des résultats.....</b>	<b>89</b>
<b>7.2. Problèmes rencontrés.....</b>	<b>90</b>
<b>7.3. Observation d'un facteur confondant lors du deuxième protocole.....</b>	<b>92</b>
<b>7.4. Quantification des microparticules pour du sang hyper agrégeant à 60% d'hématocrite .....</b>	<b>92</b>
<b>7.5. Qu'est ce qui a déjà été réalisé dans la littérature ? .....</b>	<b>94</b>
7.5.1. Taille des globules rouges .....	95
7.5.2. Déformabilité des globules rouges .....	96
7.5.3. Concentration des globules rouges.....	97
<b>7.6. Distribution des globules rouges dans un rhéomètre de Couette. ....</b>	<b>98</b>
7.6.1. Explication de la distribution des globules rouges dans un rhéomètre.....	100
<b>7.7. Explication des résultats obtenus dans cette étude et particulièrement ceux sur l'impact de l'agrégation érythrocytaire sur la migration de particules.....</b>	<b>101</b>
<b>7.8. Analogie entre un écoulement de Couette et un écoulement de Poiseuille .....</b>	<b>102</b>
<b>7.9. Effet potentiel de l'agrégation érythrocytaire sur la migration des plaquettes dans la circulation sanguine humaine .....</b>	<b>103</b>

<b>7.10. Effets physiologiques de l'agrégation érythrocytaire .....</b>	<b>105</b>
7.10.1. L'anémie .....	106
7.10.2. La polycythémie.....	108
<b>CHAPITRE 8 : CONCLUSIONS .....</b>	<b>110</b>
<b>Références.....</b>	<b>111</b>
<b>Annexes A.....</b>	<b>i</b>
<b>Annexes B .....</b>	<b>x</b>
<b>Annexes C.....</b>	<b>xxii</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1- Facteurs protéiques importants de la coagulation.....	13
Tableau 2 - Liste des couples excitation/émission pour les fluorophores disponibles commercialement (modifiée de [60]). .....	51
Tableau 3 - Propriétés importantes pour simuler l'aspect physique des plaquettes sanguines. .....	58
Tableau 4 - Spécifications des microparticules utilisées pour cette étude et comparaison avec les plaquettes sanguines.....	62
Tableau 5 – Récapitulatif des paramètres à régler sur le Typhoon PhosporImager .....	65
Tableau 6 - Récapitulatif des échantillons sanguins utilisés lors du premier protocole expérimental c'est-à-dire faire varier l'hématocrite ainsi que l'agrégabilité des érythrocytes à un taux de cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ .....	66
Tableau 7 – Récapitulatif des échantillons sanguins utilisés lors du deuxième protocole expérimental c'est-à-dire faire varier l'agrégabilité des érythrocytes fixés à un hématocrite de 40% et à un taux de cisaillement de $10 \text{ s}^{-1}$ .....	66
Tableau 8- Comparaison entre le nombre de microparticules comptées sur toute la membrane à l'œil en utilisant le microscope Zeiss et comptées automatiquement avec le Typhoon PhosphorImager.....	82
Tableau 9 – Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM <sup>2</sup> , fixes et mobiles, dans une solution saline et une solution saline + dextran, à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ et $10 \text{ s}^{-1}$ .....	xxii
Tableau 10 - Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM <sup>2</sup> , fixes et mobiles, dans du sang non agrégeant, à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ et à 20%, 40% et 60% d'hématocrite.....	xxii
Tableau 11 - Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM <sup>2</sup> , fixes et mobiles, dans du sang agrégeant, à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ et à 20%, 40% et 60% d'hématocrite.....	xxiii
Tableau 12 - Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM <sup>2</sup> , fixes et mobiles, dans du sang hyper agrégeant, à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ et à 20%, 40% et 60% d'hématocrite.....	xxiii



## Liste des figures

Figure 1.1 - Schéma de la structure extérieure d'un globule rouge.....	4
Figure 1.2 - Schéma d'une plaquette sanguine.....	6
Figure 2.1 - Accolements des surfaces endothéliales après une lésion vasculaire (modifiée de [15]). .....	9
Figure 2.2 - Récepteurs plaquettaires intervenant dans la liaison des plaquettes au sous-endothélium de la paroi vasculaire.....	10
Figure 2.3 - Résumé des mécanismes de l'hémostase ne dépendant pas de la coagulation sanguine. La ligne en pointillé indique l'effet de retour positif de l'ADP sur l'adhésion et l'agglutination plaquettaires.....	11
Figure 2.4 - Cascade complète de la coagulation sanguine (modifiée de [20]).....	14
Figure 2.5 - Résumé des fonctions exercées par les plaquettes durant l'hémostase primaire. 16	
Figure 3.1 - Rhéomètre de Couette; (ea) représente l'entrefer, ( $\Omega$ ) la vitesse angulaire, (h) la hauteur du Couette et (r) le rayon interne du Couette. ....	23
Figure 3.2 - Profil plan du rhéomètre de Couette; (dS) représente un élément de surface du fluide d'épaisseur (dy), (dF) la force de frottement tangentielle entre les couches de (dS), et (U) et (U+dU) sont deux vitesses relatives.....	23
Figure 3.3 - Profil établi d'un fluide Newtonien (--) et non Newtonien (•) dans un tube cylindrique (modifiée de [2]). (A) Vitesse maximale d'un écoulement bouchon partiel reproduit avec 52% de fantômes de globules rouges, (B) vitesse maximale d'un écoulement de Poiseuille .....	28
Figure 3.4 - Courbe de rhéofluidification. GR = globules rouges, Ringer-alb = solution Ringer-albumine, C = hématocrite (modifiée de [35]). .....	31
Figure 3.5 - A. Rouleaux de globules rouges. B. Réseaux complexes 3D de globules rouges. ....	32
Figure 3.6 - Disque rigide dans un écoulement de Poiseuille. Le gradient de vitesse présent dans ce type d'écoulement provoque la rotation du disque (modifiée de [2]). .....	36
Figure 5.1 - Migration axiale et adhésion des plaquettes sanguines simulées en fonction du niveau d'agrégation érythrocytaire.....	41
Figure 5.2 - Utilisation de fantômes de plaquettes et de membranes biologiques pour simuler l'adhésion plaquettaire aux parois du rhéomètre de Couette.....	42
Figure 5.3 - Représentation schématique de la streptavidine avec ses quatre sites de liaison sur lesquels la biotine vient se lier (modifiée de <i>www.arrayit.com</i> ). .....	46
Figure 5.4 - Streptavidine (Y) fixée à une surface sur laquelle une microparticule fluorescente, biotinylée, vient se fixer par liaison non covalente.....	46
Figure 5.5 - A. Organisation des électrons en orbite autour du noyau atomique B. Niveau d'énergie orbitale. L'absorption d'énergie de l'électron ( $\Delta E$ ) provoque un saut à un niveau d'énergie supérieure ( $Nn+m$ ) ( <i>www.science.howstuffworks.com</i> ).....	48

Figure 5.6 - Excitation par fluorescence. Le fluorophore est excité par une énergie de longueur d'onde $\lambda_1$ et doit émettre un photon d'énergie (de longueur d'onde $\lambda_2$ ) pour retomber à son niveau d'énergie fondamentale. ....	50
Figure 5.7 - Rhéomètre de Couette .....	52
Figure 5.8 - Rhéomètre de Couette – Profil de la vitesse angulaire d'un fluide non Newtonien.....	53
Figure 5.9 - Variation maximale du taux de cisaillement dans un rhéomètre de Couette pour différents rapports (e) entre les diamètres des cylindres de l'appareil. ....	55
Figure 5.10 - A. Marquage interne et B. Marquage externe d'une microparticule. ....	59
Figure 5.11 - Membrane prédécoupée SAM <sup>2</sup> utilisée pour capturer les molécules biotinylées ( <a href="http://www.promega.com">www.promega.com</a> ).....	60
Figure 5.12 - Réponse linéaire entre l'adhésion de particules radioactives (ou fluorescentes) biotinylées à la membrane SAM <sup>2</sup> et l'intensité lumineuse quantifiée par scintillation [71]. ....	61
Figure 5.13 - Microscope Axiotech Vario et PhosphorImager Typhoon 8600 ( <a href="http://www.techtrader.com.au">www.techtrader.com.au</a> , <a href="http://www.core.uaf.edu">www.core.uaf.edu</a> ).....	63
Figure 5.14 - Interface de l'outil <i>compteur de colonies</i> permettant de quantifier le nombre de microparticules présentes sur la membrane. Les paramètres importants à régler sont : la sensibilité, la taille de l'opérateur et la région d'intérêt. Le résultat affiche toutes les colonies repérées accompagnées de paramètres tels que la position de la colonie sur la membrane, l'intensité moyenne, la taille,...etc. Chaque point rose représente une microparticule comptée. ....	64
Figure 5.15 - Montage expérimental constitué du rhéomètre de Couette, d'une seringue et d'un pousse-seringue. La rotation du rhéomètre se fait dans le sens des aiguilles d'une montre. L'aiguille de la seringue est insérée au centre de l'entrefer du rhéomètre au travers de la fente via un adaptateur. ....	68
Figure 5.16 - A. Mauvaise et B. bonne synchronisation de l'injection du mélange de microparticules par rapport aux positions des membranes fixe et mobile. ....	71
Figure 6.1 - Visualisation de microparticules fluorescentes fixées sur la membrane SAM <sup>2</sup> au travers d'une caméra numérique branchée sur le microscope Zeiss. ....	78
Figure 6.2 - Membrane de référence scannée avec le Typhoon PhosphorImager. Aucune microparticule n'est détectée sur cette membrane.....	79
Figure 6.3 - Membrane scannée par le Typhoon PhosphorImager. La membrane a été utilisée pour du sang hyper agrégant à 40% d'hématocrite et à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ . ....	79
Figure 6.4 - Membrane quantifiée automatiquement par le logiciel ImageQuant 2005. 1391 microparticules ont été détectées sur cette membrane.....	80
Figure 6.5 - Comparaisons entre les images obtenues du microscope Zeiss et du Typhoon PhosphorImager. A- Quantification faible de microparticules (0-200 particules sur toute la membrane) B- Quantification moyenne de microparticules (200-1000 particules sur toute la membrane) C- Quantification élevée de microparticules (> 1000 particules) D-	

Quantification très élevée de microparticules (> 2000 particules sur toute la membrane). Le nombre exact de microparticules comptées sur chaque membrane est disponible au tableau 8.....	81
Figure 6.6 - Résultats obtenus avec une solution saline et une solution saline + dextran à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ et de $10 \text{ s}^{-1}$ sur les membranes mobiles et fixe.....	83
Figure 6.7 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes mobiles en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et de l'hématocrite. Le cisaillement est fixé à $2 \text{ s}^{-1}$ .....	84
Figure 6.8 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes fixes en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et de l'hématocrite. Le cisaillement est fixé à $2 \text{ s}^{-1}$ .....	85
Figure 6.9 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes mobiles en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et du cisaillement. L'hématocrite est fixé à 40%. Une solution contrôle sans globule rouge (saline) est incluse sur ce graphique.....	87
Figure 6.10 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes fixes en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et du cisaillement. L'hématocrite est fixé à 40%. Une solution contrôle sans globule rouge (saline) est incluse sur ce graphique.....	87
Figure 7.1 - Visualisation de microparticules A, agrégées et B, désagrégées déposées sur une membrane SAM <sup>2</sup> .....	90
Figure 7.2 - Effet du positionnement de la pipette dans le contenant où les microparticules ont sédimenté et se sont agrégées. A. La pipette est insérée à moitié dans une région du contenant où la concentration en microparticules est très faible. B. La pipette est insérée jusqu'au fond du contenant où la concentration en microparticules est importante. Les deux situations A et B sont problématiques.....	91
Figure 7.3 - Quantification automatique faite avec le Typhoon PhosphorImager des membranes mobiles (11 et 36) et fixes (12 et 37) utilisées avec du sang hyper agrégeant à 60% d'hématocrite et à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$ . 2979 microparticules ont été comptées sur la membrane 11, 2851 sur la membrane 12, 2864 sur la membrane 36 et 2894 sur la membrane 37.....	93
Figure 7.4 - Distribution radiale de la concentration en l'absence de globules rouges à un taux de cisaillement pariétal de $1200 \text{ s}^{-1}$ (●), $760 \text{ s}^{-1}$ (○) et $240 \text{ s}^{-1}$ (△). A. de plaquettes. B. de particules rigides (modifiée de [8]).....	95
Figure 7.5 - Distribution de la concentration de plaquettes (- -) en présence de globules rouges (—) à 20% d'hématocrite (A), 40% (B) et 60% (C), et à un taux de cisaillement pariétal de $1200 \text{ s}^{-1}$ (●), $760 \text{ s}^{-1}$ (○) et $240 \text{ s}^{-1}$ (△) (modifiée de [8]).....	95
Figure 7.6 - Variation du taux de cisaillement ( $\gamma$ ) dans un rhéomètre de Couette à entrefer large, en fonction de la position radiale (r) normalisée pour trois types de sang utilisés;	



- non agrégeant (■), agrégeant ( $\Delta$ ) et hyper agrégeant ( $\blacklozenge$ ). Le cylindre en rotation est à  $(r-r_i)/(r_0-r_i) = 0$  tandis que le cylindre fixe est à 1 (modifiée de [87])..... 99
- Figure 7.7 - Distribution de l'hématocrite dans un rhéomètre de Couette à entrefer large, en fonction de la position radiale (r) normalisée pour trois types de sang utilisés; non agrégeant (■), agrégeant ( $\Delta$ ) et hyper agrégeant ( $\blacklozenge$ ). Le cylindre en rotation est à  $(r-r_i)/(r_0-r_i) = 0$  tandis que le cylindre fixe est à 1 (modifiée de [87])..... 99
- Figure 7.8 - Fréquence de collisions inter-globules rouges. Les flèches indiquent la direction pour laquelle un globule rouge aura le plus de probabilités d'entrer en collision avec un autre globule rouge. .... 101
- Figure 7.9 - Distribution des différents éléments du sang en l'absence (A) et en présence (B) d'un noyau central d'agrégats de globules rouges..... 104
- Figure 7.10 - A. Relation entre le temps de saignement et l'hématocrite avant, pendant et après transfusion sanguine chez cinq patients anémiques (modifiée de [102])..... 107

## Liste des symboles et des abréviations

ADP :	Adénosine diphosphate
ANOVA :	Analyse de variance (i.e. Analysis of variance)
$C_{\text{initial}}$ :	Concentration initiale
$C_{\text{final}}$ :	Concentration finale
D :	Diamètre d'un agrégat de globule rouge
dF :	Force de frottement tangentielle
ds :	Élément de surface d'un fluide
dy :	Épaisseur d'une couche d'un fluide
e :	Rapport des cylindres du rhéomètre de Couette
ea :	Espace annulaire du rhéomètre de Couette
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra acétique
Ff :	Rendement quantique de la fluorescence
h :	Hauteur des cylindres du rhéomètre de Couette
$H_3PO_4$ :	Acide phosphorique
I(t) :	Intensité de fluorescence au temps t
$I_0$ :	Intensité de fluorescence au temps 0
Kf :	Constante de fluorescence
M :	Masse molaire
n :	Constante de la loi de puissance
NaCl :	Chlorure de sodium
Q :	Débit
r :	Position d'une couche de fluide dans l'entrefer du rhéomètre de Couette

rpm :	Révolution par minute
$R_1$ :	Rayon externe du rhéomètre de Couette
$R_2$ :	Rayon interne du rhéomètre de Couette
Ta :	Nombre de Taylor
Tf :	Temps quand la fluorescence a atteint $I_0/e$ avec $Tf = Ff/kf$
U :	Vitesse
$V_{\text{initial}}$ :	Volume initial
$V_{\text{final}}$ :	Volume final
vWF :	Facteur von Willebrand
W :	Facteur d'entassement
$\tau$ :	Contrainte tangentielle ou contrainte de cisaillement
$\rho$ :	Densité du fluide
$\frac{\Delta P}{\Delta z}$ :	Gradient de pression selon z
$\lambda$ :	Longueur d'onde
$\dot{\gamma}$ :	Taux de cisaillement
$\Omega$ :	Vitesse angulaire
$\mu$ :	Viscosité
$\nu$ :	Viscosité cinématique
$\eta$ :	Viscosité dynamique

*« Soyons réalistes, exigeons l'impossible »*

***Che Guevara***

## Remerciements

Je remercie tout d'abord le Dr Guy Cloutier sans qui je n'aurais jamais réalisé un tel projet dans des conditions aussi agréables. Merci pour son soutien, sa confiance ainsi que la liberté qu'il m'a accordée tout au long de ma maîtrise.

Je remercie aussi François Yu pour son soutien, ses conseils judicieux et sa grande disponibilité.

J'exprime toute ma reconnaissance aux diverses personnes ayant participé, de près ou de loin, à l'avancement de mon projet :

- Anis hadj henni
- Boris Chayer
- Cédric Schmitt
- Damien Garcia
- Linh-chi Nguyen
- Louise Allard

Finalement je remercie tous les membres du LBUM pour leur accueil chaleureux, leur bonne humeur et leur joie de vivre.

## Introduction

L'hémostase est définie comme l'ensemble des phénomènes survenant à la suite d'une lésion vasculaire et permet la formation d'un caillot plaquettaire stable ayant pour but de faire cesser une hémorragie. Les déterminants importants de cette régulation sont notamment les plaquettes sanguines, les hématies et certains facteurs hémodynamiques tels que le taux de cisaillement et les contraintes de cisaillement pariétal. L'agrégation plaquettaire, principal acteur de l'hémostase, permet de constituer un *bouchon provisoire* (caillot) contribuant à colmater la brèche de la paroi vasculaire au site de l'hémorragie. Cependant, l'hémostase n'est pas un phénomène parfait et joue aussi un rôle décisif dans la physiopathologie des hémorragies incontrôlées et des thromboses vasculaires. Cette étude s'intéresse autant au temps de saignement incontrôlé qu'à la formation de thrombose dont les conséquences, telles qu'un infarctus du myocarde, un arrêt cardiaque ou une occlusion vasculaire, sont, selon l'organisation mondiale de la santé ([www.who.int/fr](http://www.who.int/fr)), les causes principales de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux.

L'inflammation d'une paroi vasculaire intacte est considérée comme un facteur de risque pour la formation de thrombose car elle initie, au travers certains facteurs tissulaires, le départ de la cascade de coagulation. Il en résulte une adhésion plaquettaire aux parois vasculaires qui est donc l'un des premiers mécanismes de la formation de caillot hémostatique ou de thrombus et, est dépendante du transport des plaquettes aux parois. De nombreuses études (Goldsmith [1-3], Turitto [4, 5], Aarts [6-8], Eckstein [9, 10]) ont démontré que les globules rouges, de par leur grande taille, leur aptitude à se déformer ainsi que leur concentration (hématocrite), facilitaient et encourageaient le transport des plaquettes sanguines vers les parois vasculaires dans des conditions hémodynamiques physiologiques et pathologiques (ceci explique en partie pourquoi les patients anémiques ont des temps de saignement prolongés). Cependant, très peu d'études ont été faites sur l'influence de l'agrégation érythrocytaire sur le transport des plaquettes [1, 11].

Cette question est importante puisque l'agrégation érythrocytaire a tendance à augmenter lors de désordres rhéologiques (thromboses et inflammations). Les fonctions physiologiques de l'agrégation érythrocytaire sont encore incertaines. De ce fait, l'interaction entre les

agrégats de globules rouges et les plaquettes est un aspect pertinent permettant une meilleure compréhension des réponses physiologiques ou pathologiques. Déterminer le rôle décisif que l'agrégation érythrocytaire a sur la migration radiale des plaquettes sanguines aura un impact certain sur la compréhension de ces pathologies qui reste encore parfois inexplicables.

Ce travail se divise en 8 chapitres. Les deux premiers chapitres ont été dédiés à une revue de la littérature nécessaire pour comprendre l'importance et les objectifs de cette étude. La composition du sang, les principes de l'hémostase primaire et de la formation de thrombose vasculaire seront décrits en accentuant sur l'importance des plaquettes sanguines. Les notions générales de la rhéologie du sang nécessaires pour comprendre les différentes forces qui entrent en jeu dans le transport des macromoléculaires dans la circulation sanguine seront ensuite expliquées dans le chapitre trois avec une partie importante consacrée à la description de l'influence des globules rouges sur la migration axiale des plaquettes sanguines. Ceci sera fait par un bilan des différentes théories proposées dans la littérature. Le chapitre quatre complétera cette section en établissant les objectifs du projet.

Le chapitre cinq sera consacré à la description de la méthodologie et du matériel sélectionné pour la mise en place du montage *in vitro*. Les différents principes et éléments du montage seront décrits en détails. Les notions de fluorescence, de biologie moléculaire, d'imagerie ainsi que la sélection des microparticules utilisées pour remplacer les plaquettes sanguines seront également expliqués. Les différentes étapes du protocole expérimental et le post traitement des données compléteront ce chapitre.

Les résultats du travail de recherche accompli seront présentés dans le chapitre six, suivis d'une discussion générale au chapitre sept. Le chapitre huit clôturera ce mémoire avec une conclusion qui comprendra les problèmes rencontrés ainsi que les perspectives de futures recherches.

## CHAPITRE 1 : RÔLES ET COMPOSITION DU SANG

### 1.1. Rôles du sang

Le sang, constitué de 5 millions de globules rouges/ $\mu\text{L}$ , de 5-10 mille globules blancs/ $\mu\text{L}$ , de 150-400 mille plaquettes/ $\mu\text{L}$  et de plasma [12], est un véritable tissu liquide qui occupe un volume de 4 à 5 litres chez l'adulte. Il se répartit à 40% dans le système artériel et 60% dans le système veineux. Le sang est tout aussi vital pour l'organisme que sont le cœur ou le cerveau. C'est un fluide non homogène constitué d'éléments figurés en suspension dans du plasma. Sur le plan métabolique, le principal rôle du sang est d'assurer tous les échanges nutritifs, gazeux et hormonaux entre les organes. Cependant, le sang contribue aussi à d'autres rôles importants comme l'évacuation du dioxyde de carbone par les poumons, le maintien de la température corporelle et la défense de l'organisme en protégeant le corps contre les infections et les agressions étrangères grâce aux anticorps et aux globules blancs. Finalement, sa composition et ses caractéristiques mécaniques non linéaires influencent beaucoup les écoulements et sont aussi à la base de nombreux problèmes cardio-vasculaires.

### 1.2. Composition du sang

#### 1.2.1. Le plasma et éléments figurés

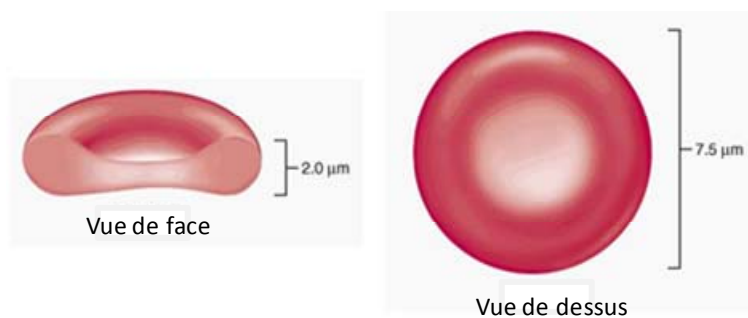
Le plasma est la phase liquide du sang et est considéré comme un fluide Newtonien. C'est un liquide jaunâtre composé de 91% d'eau et de constituants fonctionnels comprenant des ions, des sucres, des lipides et des protéines telles que l'albumine, les globulines et le fibrinogène, un facteur important de la coagulation sanguine. Ces protéines constituent la plupart des solutés du plasma et leur rôle général est de maintenir une pression osmotique permettant de favoriser l'absorption de fluides extracellulaires dans les capillaires. En plus des protéines, les solutés organiques incluent aussi nutriments, déchets métaboliques et



hormones. Le plasma contient aussi une variété de minéraux électrolytes (sodium, potassium, magnésium, etc.) ainsi que les globules blancs, les plaquettes sanguines et les globules rouges.

### 1.2.2. Les érythrocytes

Les globules rouges, également appelés érythrocytes ou hématies, se présentent sous forme de petits disques biconcaves d'un diamètre moyen de 7.5 microns (Figure 1.1) et d'une épaisseur de 2 microns dont les membranes sont chargées négativement. Leur fonction majeure est de transporter l'oxygène fixé dans les poumons vers les différents organes du corps humain et d'évacuer le dioxyde de carbone produit par les cellules. Les globules rouges contiennent une grande quantité d'hémoglobine, une protéine avec laquelle se combinent l'oxygène et le dioxyde de carbone. Ils sont produits dans la moelle osseuse et, contrairement à la plupart des cellules, le globule rouge expulse son noyau lors des premières semaines de son existence. Il est donc dans l'incapacité de se reproduire ou de maintenir sa structure pour une longue période (la vie d'un globule rouge est de 120 jours approximativement). De plus, sa structure anucléée lui donne l'aptitude à se déformer lors de son passage dans les petits capillaires sanguins dont le diamètre peut être inférieur à celui du globule rouge lui-même (plasticité globulaire). Leur déformation se fait sans contrainte significative de la membrane [13].



**Figure 1.1 - Schéma de la structure extérieure d'un globule rouge.**

La fraction volumique des globules rouges dans le sang, communément appelée hématoците, est de 46% chez l'homme et de 41% chez la femme en moyenne [12].

Cependant, en présence de certaines conditions pathologiques telles que l'anémie ou la polycythémie, l'hématocrite peut changer.

### 1.2.3. Les leucocytes

Les globules blancs, également appelés leucocytes, sont des cellules nucléées, capables de mouvements actifs. Ils constituent une vaste famille composée d'au moins six types de cellules. Leur morphologie ainsi que leur rôle varient considérablement. Selon leur catégorie, leur diamètre peut varier entre 8  $\mu\text{m}$  et 15  $\mu\text{m}$ . Ils sont donc de plus grande taille que les érythrocytes et contiennent un large noyau occupant la presque totalité de la cellule, les rendant très rigides. Les leucocytes contribuent à la défense de l'organisme, que ce soit contre une bactérie, un virus, un parasite ou une cellule anormale.

### 1.2.4. Les plaquettes sanguines

Les plaquettes, également appelées thrombocytes, sont de petites unités granuleuses (Figure 1.2) discoïdales provenant de la fragmentation du cytoplasme de grandes cellules de la moelle osseuse, les mégacaryocytes. La fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes aboutit à la formation de cellules qui sont les plus petits éléments cellulaires du sang. Il est difficile de dire sous quelle forme les plaquettes se présentent dans le sang. Aussitôt qu'un échantillon sanguin est prélevé pour être étudié, les plaquettes s'agglutinent entre elles et se collent à la plupart des surfaces. Leur fonction majeure est leur implication dans l'hémostase dite primaire où elles sont les premiers éléments à intervenir dans l'arrêt du saignement : elles subissent localement diverses modifications en rapport avec leur activité hémostatique. Elles ont en réalité un rôle majeur dans les mécanismes de l'hémostase, de la coagulation et de la formation de thrombose. Leur structure s'apparente à celle d'une cellule musculaire, et leur contenu conditionne leur efficacité. Elles ont un diamètre moyen de 2 microns, une épaisseur de 1 micron et sont anucléées. La membrane plaquettaire comporte sur sa face externe de nombreuses glycoprotéines membranaires : ce sont des récepteurs qui jouent un rôle dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Il s'agit entre autres de la GPIb (récepteur du facteur Willebrand) et de la GPIIb-IIIa (récepteur du fibrinogène). Les plaquettes

possèdent de nombreuses granulations telles que les granules denses et les granules  $\alpha$  (Figure 1.2). Lorsque la plaquette est activée, le contenu de ces granulations se déverse dans le milieu extérieur de la plaquette. Les plaquettes doivent faire migrer leurs granules afin de les concentrer et de leur faire excréter leur contenu lors de l'hémostase primaire. Les granules  $\alpha$  ont un contenu très riche composé de molécules propres à la plaquette. Ils contiennent en particulier des éléments intervenant dans l'hémostase primaire comme le facteur 4 plaquettaire ainsi que des facteurs de coagulations comme le facteur II. Les granules denses possèdent principalement de l'adénosine diphosphate (ADP) et de l'adénosine triphosphate (ATP).

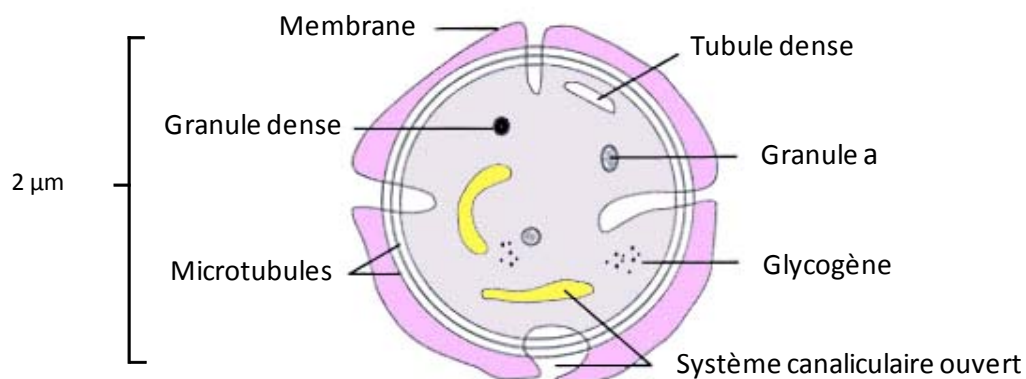


Figure 1.2 - Schéma d'une plaquette sanguine.

## CHAPITRE 2 : HÉMOSTASE - UN MÉCANISME DE DÉFENSE

Chez les êtres vivants, les cellules du corps (tissus et organes) remplissent des rôles spécifiques et primordiaux pour le maintien de la vie. Nous avons vu au chapitre précédent que le sang est l'acteur qui transporte les éléments nécessaires à la survie de ces cellules. Son rôle est indispensable et c'est au travers de l'appareil cardio-vasculaire qu'il circule et alimente toutes les cellules. Tous les animaux qui possèdent un système vasculaire doivent donc être capables de minimiser la perte de sang consécutive à la lésion de vaisseaux car un organe sans vascularisation meurt. Chez l'homme, la coagulation est l'un des phénomènes assurant l'hémostase (i.e. l'ensemble des mécanismes physiologiques aboutissant à l'arrêt d'un saignement par colmatage d'une brèche apparue dans la paroi vasculaire). Ce sont les petits vaisseaux sanguins (artérioles, capillaires, veinules) qui sont la cause quotidienne la plus fréquente de perte de sang et c'est quand ils portent sur de telles lésions que les mécanismes de l'hémostase sont les plus efficaces. La perte de sang provenant d'une artère de gros ou moyen calibre est très peu contrôlable et, de telles circonstances exigent une intervention médicale extérieure. La perte de sang à partir d'une veine est moins dangereuse car la pression dynamique présente dans les veines est basse. Le présent chapitre est consacré à la description détaillée des étapes de l'hémostase et aux différents mécanismes précurseurs de la thrombose vasculaire.

### 2.1. Les différentes étapes de l'hémostase

Pour que le processus d'hémostase se déclenche, la perte de sang au travers d'une paroi vasculaire endommagée est nécessaire. Il y a perte de sang si les deux conditions suivantes sont réunies :

- Rupture du vaisseau
- Une pression interne supérieure à la pression extérieure au corps

En conséquence, un saignement cessera lorsque l'une de ces deux conditions sera réalisée :

- Obstruction de la portion endommagée du vaisseau
- Élimination de la différence de pression qui favorise l'écoulement du sang

Comme nous allons le voir, tous les processus hémostatiques, comme la coagulation, doivent remplir l'une de ces deux conditions.

Plusieurs étapes faisant intervenir différents éléments de la structure de la plaquette ainsi que des facteurs plasmatiques constituent l'hémostase primaire. Tout ce qui suit dans cette section est basé sur la théorie classique de la formation de caillot établi par P. Morawitz [14]. Le processus d'hémostase peut se diviser en six grande étapes; 1) contraction du muscle lisse de la paroi du vaisseau lésé, 2) accolement des faces endothéliales endommagées, 3) agrégation des plaquettes et formation d'un bouchon, 4) facilitation de la vasoconstriction initiale, 5) coagulation du sang (hémostase secondaire) et 6) la rétraction du caillot.

#### 2.1.1. Contraction du vaisseau endommagé

Les mécanismes de l'hémostase se déclenchent lorsqu'un vaisseau se rompt ou se retrouve lésé. Sa réponse immédiate est alors de se contracter. La durée de cette contraction varie selon la grosseur du vaisseau endommagé. Elle dure plus longtemps dans les artères et les grosses veines puisque le débit sanguin important qui y règne peut rendre la fermeture complète de l'extrémité sectionnée très difficile. Ce phénomène de contraction n'est pas dû aux plaquettes, ni au processus général de la coagulation, mais plutôt à un mécanisme spastique provoqué par la liaison elle-même (la rupture de la paroi vasculaire va stimuler le muscle lisse et les nerfs qui vont se contracter).

### 2.1.2. Accolements des surfaces endothéliales

La contraction du vaisseau initiale va mettre en contact l'endothélium des faces opposées du vaisseau endommagé (Figure 2.1). Ce contact est d'une telle adhésivité que les deux faces restent accolées même lorsqu'elles sont soumises aux pressions élevées qui règnent lorsque la vasoconstriction diminue. La lésion modifie les propriétés de surface du vaisseau et rend les membranes endommagées plus facilement adhérentes l'une à l'autre. Ce processus se produit indépendamment des plaquettes.

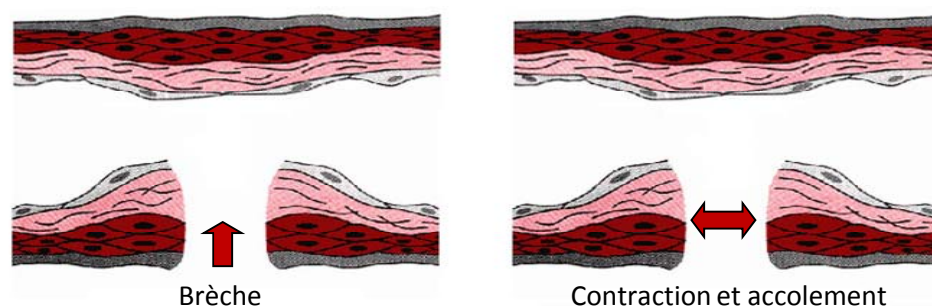
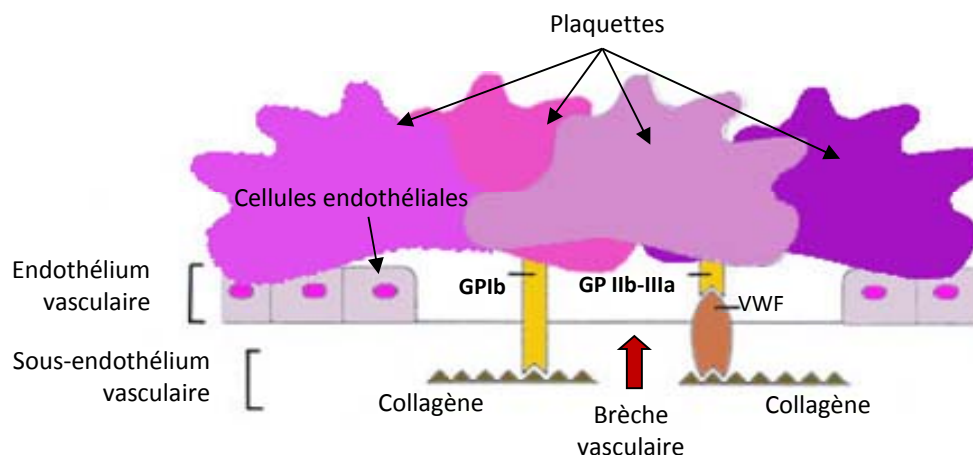


Figure 2.1 - Accolements des surfaces endothéliales après une lésion vasculaire (modifiée de [15]).

### 2.1.3. Formation d'un bouchon plaquettaire.

La participation des plaquettes dans l'hémostase nécessite leur adhésion au niveau de la surface lésée. Pour ce faire, l'activation plaquettaire est une étape primordiale car plusieurs réactions doivent se réaliser à la surface de ces dernières. Une fois activée, les plaquettes sanguines pourront s'adhérer à une surface. L'adhésion des plaquettes au sous-endothélium d'un vaisseau endommagé est un événement fondamental dans la formation de caillots hémostatiques. Ce processus a été étudié en détails grâce à la technique du laser Doppler [16] ou dans une chambre de perfusion *in vitro* développée par Baumgartner et Haudenschild [17]. Avant de s'adhérer, les plaquettes doivent d'abord être transportées jusqu'aux parois vasculaires. Ce processus est régi par des facteurs rhéologiques et hémodynamiques. L'adhésion des plaquettes est fortement dépendante du taux de cisaillement pariétal [18] et de l'hématocrite [19]. Néanmoins, il est important de préciser que, bien que les plaquettes

adhèrent à beaucoup de surfaces étrangères ou rugueuses, elles n'adhèrent pas au revêtement endothélial normal des vaisseaux sanguins. Cependant, lorsqu'une lésion vasculaire rompt l'endothélium, le tissu conjonctif sous-jacent (le sous-endothélium) est mis à découvert avec ses molécules de collagène (protéine fibreuse). Lorsqu'activées, les plaquettes adhèrent fortement au collagène au travers d'un intermédiaire qui est le facteur von Willebrand (vWF) (Figure 2.2). Le vWF sert donc de pont de liaison lors de l'agrégation plaquettaire en liant le collagène du sous-endothélium aux sites GP Ib et GP IIb-IIIa des plaquettes. Cette fixation stimule la libération par les plaquettes de granules de substances chimiques diverses très actives tels que l'adénosine diphosphate (ADP). Plusieurs de ces agents agissent localement pour induire de multiples changements dans le métabolisme, la forme et les surfaces protéiniques des plaquettes.



**Figure 2.2 - Récepteurs plaquettaire intervenant dans la liaison des plaquettes au sous-endothélium de la paroi vasculaire.**

Ainsi, la présence d'ADP modifie la surface lésée, constituée par les premières plaquettes agglutinées, favorisant alors l'adhésion de nouvelles plaquettes aux précédentes (Figure 2.2). Cette suite d'évènements conduit progressivement à la formation d'un agrégat de plaquettes, aussi appelé bouchon plaquettaire ou clou hémostatique, qui s'édifie rapidement par un processus d'auto-entretien. On notera que ce clou suffira à obstruer les lésions et arrêter le saignement lorsque la taille du vaisseau est petite. Cependant, ce bouchon est relativement instable et, comme il a été mentionné précédemment, ne peut résister longtemps aux fortes pressions qui règnent dans les vaisseaux de grande taille. En plus de son rôle mécanique

d'obstruction de la lésion, l'agrégation s'accompagne également de la libération, par les plaquettes, de substances (sérotonine, adrénaline) provoquant la vasoconstriction des parois et la coagulation du sang.

#### 2.1.4. Coagulation du sang : formation d'un caillot sanguin

Comme nous l'avons vu, le spasme vasculaire initial consécutif à la blessure d'un vaisseau est une réponse directe de son muscle lisse ou de ses nerfs. Le maintien de la vasoconstriction des petits vaisseaux est par contre dû à la libération locale par les plaquettes agglutinées de sérotonine et d'adrénaline (épinéphrine) qui sont toutes deux de puissants vasoconstricteurs. Cependant, il est important de noter que cette vasoconstriction secondaire ne peut se produire s'il n'y a pas eu au préalable agrégation plaquettaire et libération de granules. Les quatre premières étapes de l'hémostase sont résumées à la figure 2.3. Les quatre mécanismes qui viennent d'être décrits contribuent à la formation du caillot sanguin. Cependant, c'est la coagulation sanguine également appelée hémostase secondaire qui assure, chez l'homme, le principal rôle de défense dans le processus général de l'hémostase.

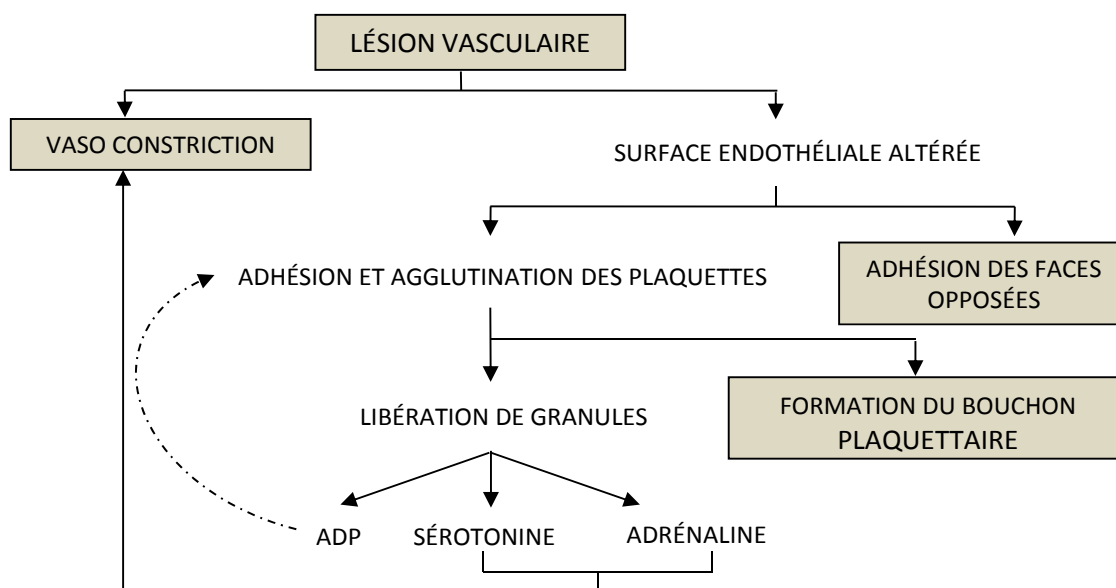


Figure 2.3 - Résumé des mécanismes de l'hémostase ne dépendant pas de la coagulation sanguine. La ligne en pointillé indique l'effet de retour positif de l'ADP sur l'adhésion et l'agglutination plaquettaires.



### 2.1.5. Facteur pro-coagulant - le fibrinogène

Le fibrinogène est une grosse protéine produite par le foie. Soluble, elle est toujours présente dans le sang d'un sujet normal. La thrombine, quant à elle, est une enzyme qui n'apparaît qu'en cas de lésion vasculaire. Elle joue un rôle essentiel car, lors d'une lésion, elle va catalyser la conversion du fibrinogène en fibrine (réaction 1), une réaction qui a pour effet de favoriser la coagulation du sang.



Au cours de cette réaction, le fibrinogène passe par l'état de grosses molécules chargées positivement et donne naissance à plusieurs petits polypeptides chargés négativement. Ces dérivés se joignent les uns aux autres par leurs extrémités pour former un maillage de fibrine. Dans le processus de la formation du caillot, de nombreux érythrocytes et autres cellules sont emprisonnés dans les mailles du réseau de fibrine. Grâce à ce phénomène de polymérisation, suivi d'une consolidation, la partie liquide du sang est alors transformée en gel. Il est important de remarquer que, comme le fibrinogène est toujours présent dans le sang, la thrombine doit en être normalement absente et sa formation ne doit être déclenchée qu'à l'occasion d'une lésion vasculaire.

### 2.1.6. Qu'est ce qui déclenche la coagulation ?

La coagulation met en jeu deux voies, l'une intrinsèque, l'autre extrinsèque, aboutissant à une voie finale commune.

On appelle coagulation extrinsèque une coagulation qui nécessite des cellules qui ne se trouvent pas dans le sang. Les tissus contiennent de la thromboplastine tissulaire qui peut se substituer à la fois aux phospholipides plaquettaires et à plusieurs facteurs plasmatiques de sorte qu'une surface anormale n'est plus nécessaire au déclenchement de la coagulation.

On appelle coagulation intrinsèque une coagulation où tous les éléments nécessaires à cette coagulation sont présents dans le sang. La première protéine plasmatique qui entre en jeu dans la coagulation intrinsèque est le facteur XII. Il se transforme en facteur XIIa lorsqu'il entre en contact avec certaines surfaces, incluant les fibres de collagène situées à la surface de l'endothélium endommagé. Le facteur XIIa catalyse ensuite le facteur XI en facteur XIa qui, à son tour, active le facteur IX qui se transforme en facteur IXa. En fait, la coagulation n'est rien d'autre qu'une cascade de réactions enzymatiques [20] impliquant des facteurs protéiques de la coagulation, dont plusieurs ont un site actif et sont soumis à des activations et à des inhibitions. Le tableau 1 énumère les facteurs de coagulation les plus importants. La figure 2.4 est une représentation schématique des différentes étapes de la cascade de coagulation.

**Tableau 1- Facteurs protéiques importants de la coagulation.**

Numéro	Facteur
I	Fibrinogène
II	Prothrombine (IIa = thrombine)
III	Thromboplastine tissulaire ou facteur tissulaire
IV	Calcium
XII	Facteur Hageman Facteur von Willebrand

Chaque protéine demeure inactive à l'état normal, jusqu'à ce que cet état soit activé par celui qui le précède dans la séquence. Enfin, lorsque le facteur en fin de série est activé, il catalyse à son tour l'activation de la prothrombine, c'est-à-dire sa conversion en thrombine. C'est le facteur tissulaire, ou encore appelé thromboplastine, qui joue le rôle de catalyseur pour cette dernière. La thromboplastine est l'une des protéines les plus importantes dans la cascade de coagulation, mais aussi dans la formation de thromboses vasculaires [21]. L'étape finale est la transformation du fibrinogène (réaction 1).

Les facteurs de la coagulation sont désignés par des numéros allant de I à XIII. À l'exception du facteur XIII qui intervient dans la dernière étape de la coagulation, les autres

facteurs interviennent dans l'ordre inverse de leur numérotation; ainsi le facteur XII initie la coagulation et le facteur I la termine. Chaque facteur existe sous forme de précurseur inactif et sous forme activée, indiquée par la lettre a.

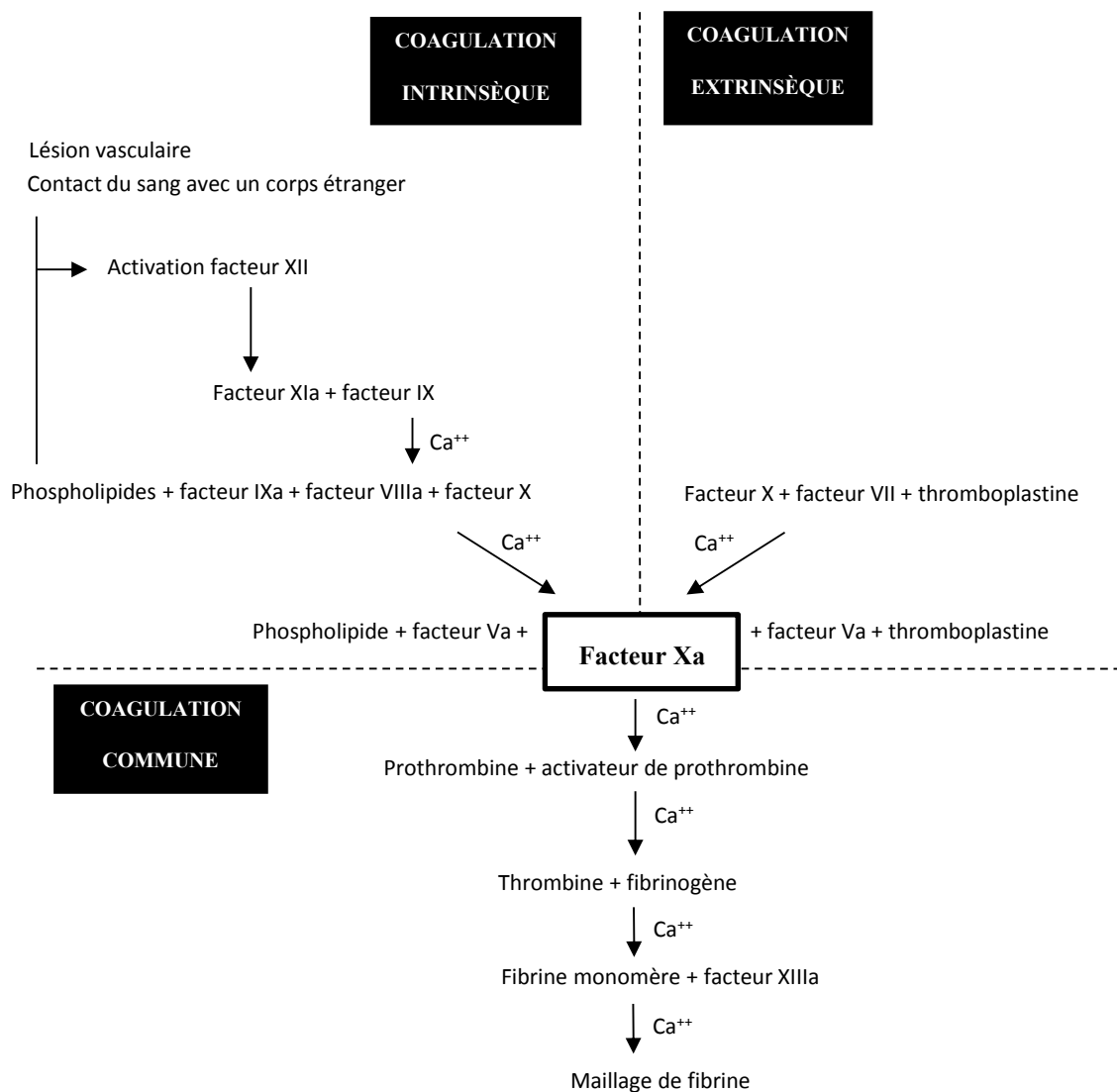


Figure 2.4 - Cascade complète de la coagulation sanguine (modifiée de [20]).

En plus de ces facteurs protéiques, plusieurs étapes exigent le calcium comme cofacteur (facteur IV) car celui-ci est un élément qui joue un rôle important à plusieurs niveaux de la cascade de coagulation.

Ce qui active la première protéine de la cascade de la coagulation est le contact de cette protéine avec la surface endommagée du vaisseau, très vraisemblablement avec les fibres de collagène sous-jacentes à l'endothélium abîmé. Cependant, même l'activation par contact de ce premier facteur ne peut pas induire la coagulation en l'absence de plaquettes. Plusieurs étapes de la série des catalyseurs exigent comme cofacteur un phospholipide qui est mis à découvert à la surface des plaquettes au cours de leur adhésion et de leur agglutination.

Ainsi l'étape décisive dans le déclenchement de la formation du caillot est le contact du sang avec une surface vasculaire lésée et ceci pour deux raisons :

- 1) Ce contact active le premier facteur de la cascade de la coagulation;
- 2) Il provoque l'adhésion des plaquettes et la mise à découvert du cofacteur phospholipidique.

Ce processus dans sa totalité ne se produit que localement, au niveau du vaisseau endommagé. Chaque composant actif fonctionne sans se répandre dans le reste de la circulation, puis est rapidement inactivé. Il est donc important que la migration des plaquettes sanguines vers le site lésé soit rapide et en nombre suffisant.

#### 2.1.7. Rétraction du caillot

Au bout d'un certain temps, le caillot se rétracte complètement. On obtient finalement un petit caillot dur car le réseau de fibrine avec les cellules qu'il enserre est devenu plus dense et plus résistant. Ce mécanisme a pour résultat de consolider le caillot mais aussi de rapprocher les parois vasculaires auxquelles il adhère. Ce sont les plaquettes qui sont responsables de la rétraction du caillot.

### 2.1.8. Résumé

L'évènement déclenchant est la présence d'une surface vasculaire lésée qui induit ensuite l'adhésion plaquettaire et l'activation du premier facteur plasmatique dans la séquence des catalyseurs qui aboutit à la formation de thrombine. Le calcium et les phospholipides plaquettaires sont nécessaires à l'ensemble des réactions. À l'étape finale, la thrombine détache par action enzymatique plusieurs petits polypeptides du fibrinogène; des filaments de fibrine se forment alors par polymérisation et le caillot apparaît. Au bout d'un certain temps, le caillot se rétracte pour laisser place à un caillot de plus petite taille et plus solide qui a pour rôle de rapprocher d'autant plus les parois vasculaires lésées. La figure 2.5 résume les différentes fonctions exercées par les plaquettes. Il est facile de voir qu'elles interviennent dans toutes les étapes importantes du processus d'hémostase.

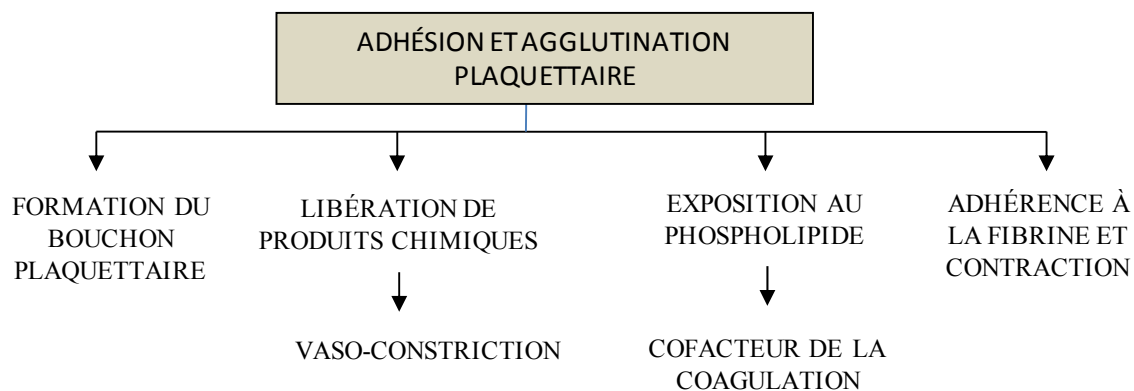


Figure 2.5 - Résumé des fonctions exercées par les plaquettes durant l'hémostase primaire.

## 2.2. Facteurs qui s'opposent à la formation de caillot

Il y a au moins deux mécanismes anticoagulants qui peuvent venir s'opposer à la formation d'un caillot sanguin. Le but de ces mécanismes est de limiter le processus de coagulation et de l'empêcher de proliférer au delà du site endommagé. Une imperfection de ces mécanismes entraîne des risques d'hyper coagulation [22].

Le premier mécanisme anticoagulant agit durant la phase d'initiation de la formation du caillot et utilise des protéines plasmatiques. Celles-ci vont se lier au facteur tissulaire VIIa et inhiber son habilité à générer le facteur tissulaire Xa. Ce mécanisme anticoagulant est la raison pour laquelle la coagulation extrinsèque ne peut générer que de petites quantités de thrombine.

Un deuxième mécanisme anticoagulant est déclenché par une protéine appelée antithrombine III. Celle-ci va inactiver la thrombine ainsi que d'autres facteurs de la coagulation. Pour ce faire, l'antithrombine III doit d'abord être activée. L'activation de cette protéine se fait lorsqu'elle se lie à l'héparine (une substance présente à la surface des cellules endothéliales). L'antithrombine III va empêcher le caillot de proliférer en désactivant rapidement les facteurs de coagulation qui s'éloignent du site où le caillot se forme.

### **2.3. Facteur mécanique qui affecte l'hémostase**

L'écoulement sanguin peut influencer les cellules du sang qui interagissent avec les parois vasculaires en altérant les différents moyens de transport. Les particules en suspension présentes dans le sang voyagent vers les parois vasculaires grâce aux processus de diffusion et de convection (Section 3.4). Dans la réaction initiale de la coagulation, les différents facteurs de coagulation doivent être transportés localement vers la région endommagée. C'est par convection que le sang, qui circule normalement au vaisseau, transporte les différents composants; mais c'est le mouvement Brownien, ou la diffusion, qui est le média du déplacement radial vers la paroi endommagée. Des études [13] ont démontré que le dépôt de plaquettes sur une surface lésée de l'endothélium par convection-diffusion pouvait être grandement régulé par les conditions d'écoulement local. En effet, les conditions d'écoulement pariétal peuvent favoriser ou ralentir le transport de particules vers une surface réactive. Ces conditions sont caractérisées par le taux de cisaillement pariétal. La vitesse de cisaillement pariétal va donc caractériser la rapidité avec laquelle les plaquettes et facteurs de coagulation migreront et, de ce fait la rapidité de la formation du caillot. La vitesse de formation des produits est donc fonction de la rapidité avec laquelle les différents éléments

rejoignent la paroi lésée. Un taux de cisaillement pariétal élevé apportera davantage de particules en suspension en contact avec la surface lésée, ce qui augmentera le taux initial d'adhésion des plaquettes ou le taux d'activation des protéines nécessaires à la coagulation<sup>1</sup>. Cependant, il a aussi été observé que la formation de fibrine diminuait avec l'augmentation du taux de cisaillement pariétal [5] mais ce phénomène n'est pas encore très bien compris. Alternativement, les forces de cisaillement pourraient produire un effet inhibiteur sur l'activation des protéines de coagulation intermédiaire telle que la thrombine, résultant ainsi à un niveau réduit de fibrine à des taux de cisaillement élevé. Les contraintes de cisaillement, couplées au taux de cisaillement par la viscosité du fluide, peuvent aussi inhiber ou promouvoir l'activité des cellules sanguines ainsi que des parois vasculaires. L'évidence d'une telle influence de la part de ces forces a été observée à l'aide d'un rhéomètre. Il a été démontré que les contraintes de cisaillement pouvaient à elles seules induire l'agrégation plaquettaire d'une façon identique à ce qu'on observe lors du processus d'hémostase, même en l'absence de facteurs chimiques [22]. De ce fait, un comportement thrombotique peut être induit simplement en initiant des contraintes de cisaillement supérieures à 50-100 dynes/cm<sup>2</sup>, un niveau qui est facilement atteint dans les vaisseaux sténosés.

## **2.4. La thrombose vasculaire**

### **2.4.1. Un mécanisme pathologique**

Dans des conditions physiologiques, même si les plaquettes présentes dans le sang circulent à proximité des parois vasculaires, elles ne s'y adhèrent pas. La formation d'un caillot dans un vaisseau lésé est évidemment une réponse physiologique, mais la formation de caillot à l'intérieur de vaisseaux intacts est pathologique. Elle peut se faire dans les veines, la microcirculation ou les artères.

---

<sup>1</sup> Contrairement à l'état de stase qui favorise la formation de thrombose (Section 2.4.2).

L'endothélium joue un rôle important dans le processus d'hémostase. Par exemple, les cellules endothéliales produisent de l'endothéline, un vasoconstricteur actif qui entre en jeu lors de la contraction du vaisseau endommagé ou encore, le facteur von Willebrand (vWF) qui contribue à la formation du caillot hémostatique (Section 2.1.3). Les cellules endothéliales jouent aussi un rôle de défense important contre les thromboses et les formations de plaques d'athéromes.

On pourrait penser que l'endommagement d'une liaison vasculaire est déclencheur de formation de thrombus. Cependant des études pathologiques ont démontré qu'il n'était pas nécessaire d'avoir une blessure vasculaire pour provoquer une thrombose [23]. De ce fait, on peut se poser la question suivante : s'il n'y a pas d'évidence d'une blessure vasculaire, comment la coagulation peut-elle être initiée dans une veine ou une artère intacte ?

Lors d'une blessure vasculaire, les cellules de l'endothélium remplissent facilement leur rôle protecteur contre les formations de thrombose. Cependant, lorsque les dommages sont chroniques et sévères, l'endothélium est constamment endommagé et ses fonctions réparatrices s'affaiblissent. La perte des fonctions protectrices de l'endothélium couplée aux molécules pro thrombotiques et pro-coagulantes situées dans la matrice du sous-endothélium ou de l'endothélium endommagé entraînent alors l'hémostase vers la thrombose.

L'inflammation des parois vasculaires est l'un des acteurs principaux qui montrent que l'hémostase n'est pas un mécanisme parfait. Ce phénomène a été considéré comme un mécanisme au travers duquel différents facteurs de risque pouvaient déclencher la formation de thrombose dans les veines. En effet, une inflammation va endommager l'endothélium et permettre ainsi aux plaquettes de s'adhérer aux surfaces du sous-endothélium. Celles-ci vont s'activer et, de ce fait, relâcher de l'ADP. Cette ADP va recruter d'autres plaquettes qui vont amplifier l'activation et l'agrégation plaquettaire. Lors d'une inflammation vasculaire, la balance hémostatique est donc dérégulée, résultant en une augmentation de la production de facteurs pro-coagulants. De plus, non seulement l'inflammation entraîne l'activation de la cascade de coagulation, mais la coagulation affecte aussi l'activité inflammatoire.



#### 2.4.2. Mécanisme de la thrombose

Selon une des théories qui prédominent aujourd'hui, c'est le mécanisme de coagulation qui est hyperactif chez les sujets prédisposés à la thrombose [24]. Plusieurs études ont observé, chez des patients atteints de thrombose veineuse, que la prothrombine, précurseur de la thrombine, était l'un des facteurs plasmatiques présents en quantité excessive dans le sang [25], [26]. Cette théorie met l'accent sur le fait que c'est le sang lui-même qui est la cause d'une coagulation exagérée.

Selon d'autres théories, ce sont les vaisseaux sanguins qui sont responsables du processus thrombotique. Comme le déclenchement de la coagulation sanguine dépend en premier lieu de l'état du revêtement interne du vaisseau, il est possible que des modifications, même transitoires et mineures, des surfaces endothéliales stimulent le déclenchement d'un processus capable de s'auto-entretenir, aboutissant à la formation du caillot [21]. Dans le réseau artériel, la thrombose débute généralement avec une rupture de plaque d'athérosclérose, ou un endommagement du vaisseau, ou encore un dysfonctionnement de l'endothélium. La conséquence est l'exposition du facteur tissulaire actif sur la surface du vaisseau sanguin.

Ces théories peuvent expliquer que la thrombose vasculaire soit associée à de nombreuses situations telles que :

1/ La stase, c'est-à-dire le ralentissement de la vitesse du sang dans les veines, comme c'est le cas dans la position debout immobile, dans un mauvais fonctionnement valvulaire ou dans une insuffisance cardiaque.

2/ L'inflammation des veines et d'autres vaisseaux par bactéries. Des réactions allergiques ou des substances toxiques peuvent aussi occasionner des lésions vasculaires.

3/ Le dépôt de lipides et de tissu conjonctif sur les parois artérielles (artériosclérose) provoque également un amincissement sensible et une irrégularité de la tunique artérielle.

Parallèlement, des facteurs physiques autant que chimiques, peuvent influencer le rôle des plaquettes ainsi que les facteurs de coagulation responsables de la formation de thrombine et de masse hémostatique au voisinage d'une paroi endommagée.

#### 2.4.3. Conséquences de la thrombose

Il est certain qu'un caillot, quelle que soit sa taille, constitue une surface tout à fait favorable à la formation d'un caillot encore plus gros. Ainsi le thrombus grossit, et il peut arriver qu'il obstrue toute la lumière du vaisseau, lésant ainsi le tissu que ce vaisseau irriguait et alimentait. Un des facteurs qui jouent un rôle important dans la croissance du caillot et concourent à l'obstruction du vaisseau est, sans aucun doute, la libération de substances vasoconstrictrices par les plaquettes qui viennent se coller à sa surface. Enfin, plus le caillot est gros, plus les chances augmentent que des fragments du caillot se détachent et soient entraînés vers les poumons, le cœur ou d'autres organes. Ces embolies obstruent non seulement la microcirculation, mais ils peuvent, dans les poumons, donner naissance à des réflexes cardio-vasculaires tout à fait inappropriés, se terminant par de l'hypotension, des perturbations du rythme cardiaque et la mort. Il en est de même pour les embolies se situant au niveau du cerveau et qui sont à l'origine des AVC (accidents vasculaires cérébraux)

## LA RHÉOLOGIE DU SANG – QUELQUES RAPPELS

La rhéologie se définit comme l'étude de l'écoulement et de la déformation des corps. La rhéologie du sang permet d'étudier le comportement des constituants du sang, en fonction de la viscosité et en tenant compte des déformations et des contraintes de cisaillement. Elle relie les forces physiques présentes dans les différents écoulements de la circulation sanguine aux éléments qui composent le sang. Les propriétés rhéologiques du sang (viscosité, rhéofluidification, contrainte) dépendent elles-mêmes de la composition sanguine et des conditions d'écoulement. La capacité du sang à assurer son rôle dans l'organisme dépend, quant à elle, de ses propriétés rhéologiques. En effet, l'altération de ces caractéristiques rhéologiques peut être liée à certaines situations pathologiques. Ce chapitre a pour objectif d'expliquer et de décrire ces différentes propriétés rhéologiques du sang.

### 3.1. La viscosité

#### 3.1.1. Expérience fondamentale de Couette

Un rhéomètre de Couette, que l'on peut voir à la figure 3.1, est constitué de deux cylindres coaxiaux séparés par un mince espace annulaire ( $ea$ ), nommé entrefer, rempli du fluide à étudier (le sang, en ce qui nous concerne). Il n'y a pas de liaison mécanique entre eux et le cylindre intérieur est libre autour de son axe. L'expérience consiste à mettre le cylindre extérieur en rotation, à une vitesse angulaire  $\Omega$ . On observe alors que le cylindre intérieur, initialement fixe, se met à tourner dans le même sens que le cylindre extérieur. La mise en mouvement du cylindre intérieur ne peut se faire que par l'intermédiaire du fluide situé dans l'entrefer. Ceci prouve l'existence, au sein du fluide, de forces tangentielles de frottement interne, appelées forces de viscosité dynamique ( $\mu$ ). Cette force de viscosité ne se manifeste évidemment que s'il y a mouvement du fluide.

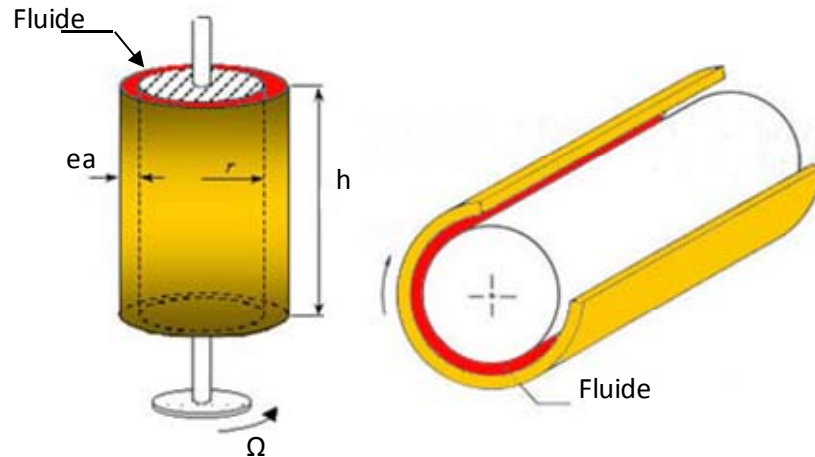


Figure 2.6 - Rhéomètre de Couette; (ea) représente l'entrefer, ( $\Omega$ ) la vitesse angulaire, (h) la hauteur du Couette et (r) le rayon interne du Couette.

### 3.1.2. La viscosité dynamique

Raisonnons maintenant comme si l'espace situé entre les deux cylindres était plan (Figure 3.2). L'une des parois se déplace parallèlement à l'autre avec une vitesse relative  $U$  (le mouvement du fluide peut être considéré comme résultant du glissement des couches de fluide les unes sur les autres). On visualise, à l'ordonnée  $y$ , deux couches fluides en contact, parallèles aux parois, d'épaisseur  $dy$ . Leurs vitesses sont donc  $U$  et  $U+dU$  successivement. En raison de l'écart des vitesses, il se produit un frottement entre les deux couches. Un élément  $dS$  de la surface de contact est donc soumis à une force de frottement tangentielle  $dF$ .

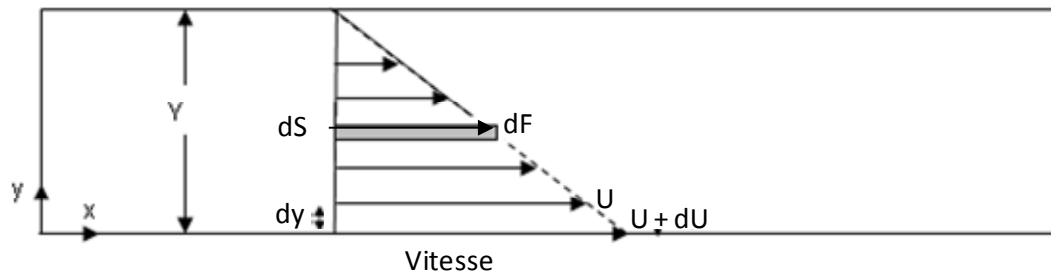


Figure 2.7 - Profil plan du rhéomètre de Couette; ( $dS$ ) représente un élément de surface du fluide d'épaisseur ( $dy$ ), ( $dF$ ) la force de frottement tangentielle entre les couches de ( $dS$ ), et ( $U$ ) et ( $U+dU$ ) sont deux vitesses relatives.

Nous pouvons dire que  $dF$  est proportionnelle à la différence de vitesse entre les couches fluides (ou au gradient transversal de vitesse) avec comme constante de proportionnalité la viscosité dynamique  $\mu$ ; ces vitesses sont les vitesses de cisaillement ou gradients de cisaillement.

$$\text{Vitesse de cisaillement} = \frac{\partial U}{\partial y} = \frac{m \cdot s^{-1}}{m} = s^{-1} \quad (1)$$

$$\text{On peut alors écrire que : } dF = \mu \cdot dS \cdot \frac{\partial U}{\partial y} \quad (2)$$

À partir de cette équation, on introduit la contrainte tangentielle  $\tau$  à l'ordonnée  $y$  :

$$\tau = \frac{dF}{dS} = \mu \cdot \frac{\partial U}{\partial y} \text{ (N / m}^2 \text{ ou Pa)} \quad (3)$$

Cette contrainte tangentielle, aussi appelée contrainte de cisaillement, représente le rapport entre la vitesse de cisaillement  $\gamma$  et la viscosité dynamique  $\mu$ .

### 3.1.3. La viscosité cinématique

$$\text{La viscosité cinématique d'un fluide se définit par : } \nu = \frac{\mu}{\rho} \quad (4)$$

où  $\rho$  représente la densité du fluide.

Cette grandeur est très utilisée car elle traduit l'aptitude d'un fluide agité à revenir au repos. Lorsque  $\nu$  est grand,  $\mu$  est grand, et donc les forces de frottement sont importantes, et/ou,  $\rho$  est petit et donc l'inertie mécanique est faible, ce qui favorise le retour du fluide à un état de repos.

### 3.2. Fluide Newtonien et non Newtonien

#### 3.2.1. Fluide Newtonien

Un fluide est un milieu continu déformable. Il est donc possible d'introduire une loi de comportement du fluide en fonction des contraintes et des déformations. C'est la loi de

$$\text{Newton : } \tau_{xy} = -\mu \frac{dv_x}{dy} \quad (5)$$

Cette équation est une généralisation de la relation (3) et peut être interprétée d'un point de vue mécanique en parlant des forces de contrainte, ou d'un point de vue énergétique et massique, en parlant de quantité de mouvement.

De façon simple, cette équation stipule que les forces de cisaillement par unité de surface sont proportionnelles au gradient négatif de la vitesse. La viscosité est constante dans tout le fluide. La plupart des gaz et liquides peuvent être décrits avec cette équation.

Cette loi implique que :

- 1) La viscosité est indépendante de la vitesse de cisaillement.
- 2) La viscosité est indépendante du temps et les contraintes s'annulent immédiatement lorsque l'écoulement est arrêté.

Toute déviation de ces règles est le signe d'un comportement non Newtonien.

#### 3.2.2. Fluide non Newtonien

Selon la loi de Newton, si on trace  $\tau_{xy}$  en fonction de  $dv_x/dy$  pour un quelconque fluide, on devrait obtenir une ligne droite passant par l'origine et la pente de cette droite correspondrait à la viscosité du fluide. Cependant, il existe certains fluides qui ne répondent pas à ce critère. Ce sont des fluides non Newtoniens. Un fluide est dit non Newtonien lorsque sa déformation n'est pas directement proportionnelle à la force qu'on lui applique. Le caractère non Newtonien le plus répandu est la variation de viscosité avec la vitesse de cisaillement.

Lorsque la viscosité diminue au fur et à mesure que l'on augmente le taux de cisaillement (gradient de vitesse) auquel est soumis le fluide, il est alors appelé fluide rhéofluidifiant.

La viscosité peut s'exprimer en fonction du cisaillement par le modèle de puissance (voir annexe A pour le développement total) :

$$\mu = \mu_0 |\dot{\gamma}|^{n-1} \quad (5.1)$$

où  $n$  représente la constante de la loi de puissance ( $n = 1$  pour un fluide Newtonien)

### 3.2.3. Écoulement d'un fluide Newtonien dans un tube

Lorsque l'écoulement d'un fluide Newtonien est établi dans un tube, son profil est parabolique (Figure 3.3). La distribution de la vitesse du fluide dans la direction axiale du tube, pour un quelconque débit  $Q$ , dépend de la distance radiale  $r$  depuis le centre du tube et du rayon du tube  $R$ .

$$U(r) = \frac{2Q}{\pi R^4} (R^2 - r^2) \quad (6)$$

où  $U(r)$  est la vitesse du fluide à une distance radiale  $r$  donnée.

Le gradient de vitesse (ou taux de cisaillement), dans un écoulement de Poiseuille, est aussi fonction de la distance radiale  $r$  et est maximum aux parois du tube. Il décroît jusqu'à être nul au centre.

$$\dot{\gamma}(r) = -\frac{dU}{dr} = \frac{4Q}{\pi R^4} r \quad (7)$$

Comme on peut le voir à la figure 3.3, la vitesse d'écoulement est maximale au centre du tube et nulle sur les parois. En  $R$ , la vitesse du fluide est donc zéro et on peut écrire :

$$\dot{\gamma}(R) = \frac{4Q}{\pi R^3} = \frac{2U(0)}{R} \quad (8)$$

Pour un débit sanguin constant, le taux de cisaillement ainsi que la vitesse du fluide sont très sensibles au changement de rayon du tube. Le profil parabolique d'un écoulement de Poiseuille n'est atteint qu'à une longueur du tube suffisamment importante pour que les forces de friction des parois se soient manifestées dans tout le diamètre du tube. On dit alors que l'écoulement est établi. Lorsque c'est le cas, et que tous les éléments du fluide circulent à une vitesse constante, il y a un équilibre entre deux forces; la composante normale de la contrainte du fluide (c'est-à-dire la force par unité de surface dans la direction perpendiculaire à l'écoulement de celui-ci et représentée par un gradient de pression  $\frac{\Delta P}{\Delta z}$ ) opposée à la force tangentielle par unité de surface (qui est due aux frictions pariétales retardant le mouvement du liquide et qui est représentée par les contraintes de cisaillement pariétal  $\tau(R)$ ).

$$\text{L'équation de ces forces s'écrit ainsi : } -\frac{\Delta P}{\Delta z} \cdot \pi R^2 = 2\pi R \tau(R) \quad (9)$$

Dans le cas d'un fluide Newtonien, la contrainte de cisaillement est directement proportionnelle au taux de cisaillement (la constante de proportionnalité étant la viscosité dynamique  $\mu$ ). Ainsi en incorporant la viscosité dynamique à l'équation 9 et en substituant le résultat dans l'équation 8 on obtient:

$$\boxed{\frac{\Delta P}{\Delta z} = \frac{8\mu Q}{\pi R^4}} \quad (10)$$

Cette équation est celle de Poiseuille-Hagen qui décrit l'écoulement d'un fluide Newtonien dans un tube. Elle stipule que, pour un débit connu, le travail nécessaire pour supporter les forces de friction augmente 16 fois à chaque fois que le rayon du tube est réduit de moitié. Pareillement, le taux de cisaillement pariétal (Équation 8) et la contrainte de cisaillement pariétal augmentent de 8 fois lorsque le rayon est réduit de moitié.



### 3.2.4. Écoulement d'un fluide non Newtonien dans un tube

L'équation de Poiseuille ne peut être directement appliquée à la circulation sanguine. Dans les grands vaisseaux, l'écoulement n'est jamais établi et est pulsé. De plus, les écoulements locaux sont souvent perturbés par des variations géométriques (bifurcation, courbure), ce qui engendre des écoulements bi-phasiques. Le sang n'est pas un fluide Newtonien. La viscosité dynamique n'est alors plus une constante et devient sensible aux variations de cisaillement. Le terme de viscosité apparente est alors utilisé et décroît avec un accroissement du taux de cisaillement. Cet écoulement non Newtonien dans les petites artères et veines, et dans la microcirculation, est lié à la présence des globules rouges ainsi qu'à leur capacité à former des chaînes d'agrégats linéaires (rouleaux) ou complexes (réseaux de rouleaux) et à se déformer sous l'influence d'une contrainte ou d'un surpeuplement de cellules. En fait, en dessous d'un cisaillement typique de  $50 \text{ s}^{-1}$ , la baisse de la viscosité apparente est attribuée à la dissociation d'agrégats alors que pour des cisaillements supérieurs à  $50 \text{ s}^{-1}$ , cette baisse est due à la déformation des érythrocytes et à leur alignement selon les lignes de courant [2]. Par conséquent, les valeurs moyennes du taux de cisaillement et des contraintes de cisaillement pariétales sont plus fortes que celles d'un fluide Newtonien pour

le même débit. Comme on peut le voir à la figure 3.3, ceci a pour effet d'aplatir le profil de vitesse. On parle alors d'un écoulement bouchon partiel. Ce degré d'aplatissement diminue en augmentant le débit où les globules rouges deviennent excessivement déformés.

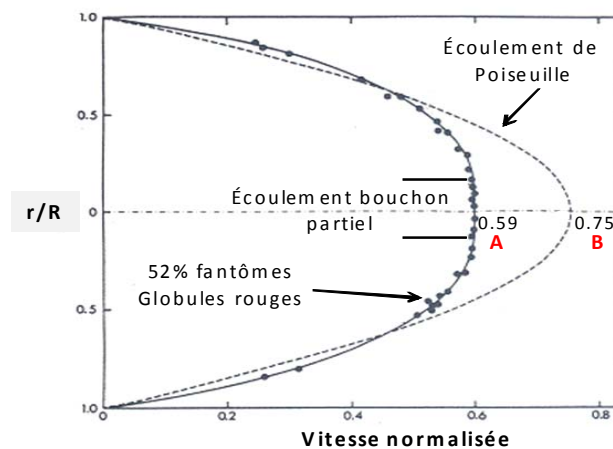


Figure 2.8 - Profil établi d'un fluide Newtonien (---) et non Newtonien (•) dans un tube cylindrique (modifiée de [2]). (A) Vitesse maximale d'un écoulement bouchon partiel reproduit avec 52% de fantômes de globules rouges, (B) vitesse maximale d'un écoulement de Poiseuille

### 3.3. Agrégation érythrocytaire

#### 3.3.1. Définition

La formation d'agrégats de globules rouges est régie par des interactions répulsives et attractives de types mécaniques, chimiques et électrostatiques. Chaque type de liaison peut avoir des effets agrégeants ou désagrégeants en fonction des interactions physico-chimiques avec le milieu. L'agrégation érythrocytaire est un processus naturel, complexe mais réversible qui se réalise tout au long de la circulation sanguine. Deux théories peuvent expliquer ce phénomène : la théorie de l'adsorption et celle de la déplétion.

L'hypothèse sous-jacente à la théorie de l'adsorption repose sur l'attraction intercellulaire et ne peut se réaliser que lorsque les forces de liaison dues à l'adsorption de macromolécules sont plus fortes que les forces de dissociation dues aux répulsions électrostatiques. C'est entre autre, le fibrinogène qui va servir de pont de liaison entre deux globules rouges. Selon cette théorie, il irait tout d'abord se déposer sur la membrane d'un globule rouge qui en adsorberait une partie. Lorsqu'un deuxième globule rouge arrive à proximité de l'extrémité libre du fibrinogène, celui-ci serait aussitôt adsorbé formant ainsi un agrégat de deux globules rouges.

L'hypothèse sous-jacente à la théorie de la déplétion, quant à elle, repose sur la création d'une zone de déplétion, c'est-à-dire l'exclusion des macromolécules de l'espace intercellulaire. La couche de déplétion correspond à une zone autour de la surface membranaire du globule rouge ayant une plus faible concentration en macromolécules par rapport au reste de l'espace intercellulaire. Cette exclusion des macromolécules proches de la surface membranaire entraînerait un gradient de pression osmotique, et lorsque deux érythrocytes seraient suffisamment proches pour que leurs zones de déplétion interagissent, ils auraient alors tendance à s'agréger.

Le rôle que joue l'agrégation érythrocytaire au niveau du comportement physiologique de la circulation sanguine n'est pas encore très bien compris. Les travaux de Fahraeus et Lindqvist [27] ont montré que l'agrégation érythrocytaire diminuait la résistance périphérique de la microcirculation.

Cependant, l'agrégation érythrocytaire est aussi un processus qui peut affecter directement la résistance à l'écoulement sanguin et résulter en un syndrome d'hyperviscosité. La formation d'agrégats a pour conséquence de diminuer le taux de cisaillement, ce qui a pour effet d'induire d'autant plus la formation d'agrégats [28]. Lorsque le taux de cisaillement diminue ( $< 100 \text{ s}^{-1}$ ), la viscosité apparente du sang augmente de façon non Newtonienne ce qui augmente également la résistance vasculaire. Une étude faite par Cabel *et al.*, [29] a démontré que plus de 50% de la résistance vasculaire pouvait être attribuées à l'agrégation érythrocytaire. Dans certains cas sévères, l'accroissement de la résistance à l'écoulement attribué à l'agrégation érythrocytaire peut résulter en des états de stases favorisant les formations de thromboses vasculaires. En effet, dans certaines circonstances cardiovasculaires pathologiques, le niveau d'agrégation devient anormalement élevé. Les agrégats de globules rouges sont alors caractérisés par la formation de larges réseaux 3D ayant de fortes liaisons intercellulaires. L'hyper agrégation est ainsi reliée à des maladies occlusives telles que la polycythémie, la thrombose veineuse, les ischémies vasculaires et peut même, dans certains cas extrêmes, entraîner l'arrêt circulatoire [30]. De plus, un niveau pathologique de l'agrégation érythrocytaire a été cliniquement corrélé avec le diabète [31], l'infarctus du myocarde ainsi que l'artériosclérose [32], l'obésité [33] et l'hypertension artérielle [34].

### 3.3.2. Propriétés viscosimétriques du sang

Les propriétés viscosimétriques du sang dépendent essentiellement des propriétés d'agrégation et de déformabilité des globules rouges, de leur concentration (hématocrite), des protéines plasmatiques qui peuvent interagir avec eux, ainsi que de facteurs externes tels que la vitesse de cisaillement et la température de mesure.

La courbe de rhéofluidification que l'on peut voir à la figure 3.4 s'interprète en considérant les changements que subit la structure organisée du sang qui résulte du phénomène réversible d'agrégation et de désagrégation érythrocytaire.

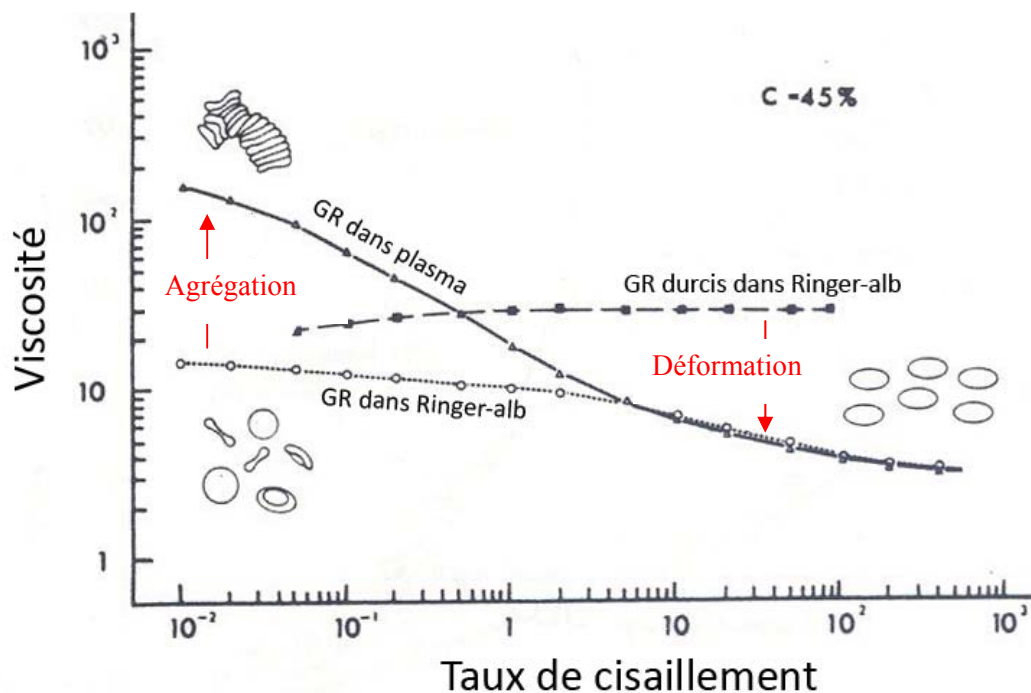


Figure 2.9 - Courbe de rhéofluidification. GR = globules rouges, Ringer-alb = solution Ringer-albumine, C = hémocrite (modifiée de [35]).

Cette figure, adaptée des travaux effectués par Chien *et al.* [35], montre la variation de la viscosité apparente d'une suspension de globules rouges normaux dans du plasma, d'une suspension de globules rouges dans une solution saline et d'une suspension de globules rouges durcis (par l'ajout de glutaraldéhyde) dans une solution saline, en fonction de différents paramètres. Nous pouvons remarquer que la viscosité apparente de la suspension de cellules rigides à 45% d'hématocrite et à un taux de cisaillement  $> 1 \text{ s}^{-1}$  est bien plus importante que celle d'une suspension de cellules normales. Ceci s'explique par le fait que les globules rouges durcis dans une solution Ringer-albumine ont perdu leur habilité à s'agréger ainsi que leur habilité à se déformer. Cette figure met en évidence l'importance de l'agrégation et de la déformation érythrocytaire sur le comportement viscoélastique du sang.

En partant d'un état de repos, et selon l'amplitude finale des forces de cisaillement qui sont exercées sur le fluide, trois comportements sont mis en évidence :

1) À faible cisaillement, le sang agit comme un fluide viscoélastique, la contrainte de cisaillement étant trop faible pour dissocier complètement la formation d'agrégats. Les

globules rouges s'associent en réseaux de rouleaux et/ou en rouleaux individuels (Figure 3.5).

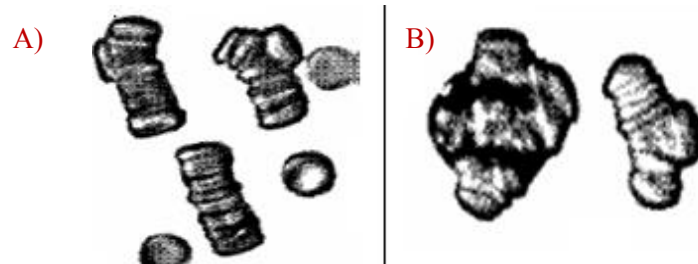


Figure 2.10 - A. Rouleaux de globules rouges. B. Réseaux complexes 3D de globules rouges.

2) Lorsque le cisaillement est modéré, la viscosité est essentiellement gouvernée par des phénomènes d'équilibre entre les deux mécanismes compétitifs de l'agrégation et de la désagrégation.

3) À cisaillement élevé, le sang se comporte comme un fluide Newtonien. Les globules rouges sont dispersés, se déforment et s'orientent dans l'écoulement. La viscosité est principalement influencée par les propriétés mécaniques individuelles du globule rouge, notamment par sa déformabilité.

### 3.3.3. Modification artificielle des propriétés viscosimétriques du sang

La viscosité du sang dépend de facteurs physiques tels que la température et la vitesse de cisaillement, de facteurs érythrocytaires tels que la concentration cellulaire, et de facteurs plasmatiques et membranaires. Il est donc possible de faire modifier les propriétés viscosimétriques du sang en faisant varier artificiellement l'un de ces facteurs. La méthode la plus répandue est celle de la modification du milieu suspendant par l'action d'agents spécifiques tels que le dextran. Le dextran se lie à la surface de nombreuses cellules (plaquettes, globules rouges) [36]. Un effet bien connu du dextran sur les globules rouges est la capacité de provoquer une augmentation du niveau d'agrégation [37]. Le dextran peut aussi influencer d'autres paramètres rhéologiques tels que la viscosité et la déformabilité des

globules rouges [38]. Il existe plusieurs types de dextran de poids moléculaires différents. Plus ce dernier est élevé, plus le niveau d'agrégation est augmenté selon une loi bimodale qui dépend de la concentration de dextran.

### **3.4. Le transport de masse**

#### **3.4.1. Principe**

Un point important pour comprendre le processus de formation de thrombus est le transport de cellules. Comment est-ce qu'une particule localisée au centre d'un vaisseau sanguin arrive à migrer à proximité d'une paroi vasculaire ?

Cette réponse peut s'expliquer par la théorie du transport de masse.

Le transfert total de matière dans un fluide peut se faire de deux façons : par convection due au flux principal et par diffusion due aux mouvements Browniens ou autres types de mouvements chaotiques. L'intégralité du transfert de matière est connue sous le nom de transport convectif – diffusif. Dans le transport convectif, les substances dissoutes, ainsi que les particules en suspension sont portées par le fluide, entraînées le long des lignes de courant à des vitesses essentiellement égales à celles du fluide. Dans le sang, le flot sanguin est le moyen le plus important par lequel le plasma et les particules en suspension sont emmenées au voisinage de la paroi vasculaire [2]. Cependant, comme la plupart des écoulements dans le corps humain sont laminaires, les particules en suspension voyagent selon une trajectoire parallèle aux parois vasculaires. Elles ne peuvent donc pas interagir avec les parois vasculaires par convection seulement. L'interaction avec les parois va se faire grâce à la diffusion qui, contrairement à la convection, est un processus aléatoire dans lequel chaque élément du milieu présente un mouvement chaotique, souvent se dirigeant dans une direction transverse aux lignes de courant du fluide et qui est dû aux collisions qui se produisent au niveau intramoléculaire. Le mouvement Brownien de petites particules telles que les plaquettes est le résultat d'une collision aléatoire de particules en suspension.

En l'absence d'écoulement, la diffusion résulte d'une égalisation de la concentration en particules en suspension. Le transport diffusif se fait d'une forte concentration vers une faible concentration. Comme il y a plus de particules par unité de volume dans la région centrale du fluide qu'au voisinage des parois vasculaires [8], celles-ci ont tendance à migrer de l'intérieur du vaisseau vers les parois vasculaires. Dans la circulation, la diffusion est un processus beaucoup plus lent que la convection. Il est évident que les distances parcourues par diffusion sont très faibles comparées à la vitesse moyenne du sang, même dans de petits vaisseaux. Cependant, au voisinage des parois vasculaires où les vitesses sont très faibles, voir stagnants, l'écoulement par convection diminue et devient presque nul. De ce fait, à proximité de la surface vasculaire, le mouvement dû à la diffusion, par rapport à la convection, n'est plus négligeable, et une rivalité plus importante entre la diffusion et la convection se met en place.

### **3.5. Influence des globules rouges dans la diffusion des microparticules en suspension**

Bien que les plaquettes jouent un rôle clé dans la formation de thrombus et de clous hémostatiques, ils n'occupent que  $\sim 0.7\%$  du volume de la phase cellulaire du sang [2]. D'un point de vue rhéologique, les plaquettes sont donc considérées comme futiles. Ce sont les globules rouges qui déterminent, au niveau macroscopique, les propriétés d'écoulement du sang et, au niveau microscopique, le mouvement des plaquettes (et des globules blancs). En effet, des études *in vitro* ont remarqué que l'adhésion des plaquettes au sous-endothélium était virtuellement abolie en l'absence de globules rouges [4, 6, 19]. Goldsmith *et al.* ont aussi observé que la présence de globules rouges améliorait la déposition ainsi que l'adhésion plaquettaire sur un endothélium dénudé [1]. L'objectif de cette section est d'expliquer, selon les différents mécanismes proposés dans la littérature, comment les globules rouges influencent la migration des plaquettes sanguines.

Il est important de préciser ici que ce projet ne se concentre que sur l'influence physique des globules rouges sur la migration et l'adhésion des plaquettes. Toutefois, il est important de savoir que les érythrocytes jouent aussi un rôle dans l'activation des plaquettes de façon

chimique. Sous l'action d'un taux de cisaillement élevé, les globules rouges s'hémolysent et relâchent de l'ADP qui, une fois larguée dans le sang, déclenche l'activation des plaquettes [39]. Ce phénomène explique, en partie, la formation de thrombose observée à des taux de cisaillement et d'hématocrite élevés [4].

La présence de globules rouges à 40-50% d'hématocrite contribue considérablement au déplacement des autres éléments du sang [6-8]. On pourrait penser qu'avec une telle concentration, les globules rouges viendraient plutôt gêner la diffusion des particules en suspension de plus petites tailles. Ceci n'est vrai que lorsque le sang est stationnaire [2]. La collision entre les globules rouges de même que leur déformabilité, conduisent à une méthode alternative de mélange des solutés qui peut être comparée au mouvement Brownien. Cet effet a été démontré dans un écoulement laminaire en observant le mouvement de cellules fluorescentes et de petites tailles, dans une suspension de fantômes<sup>2</sup> de globules rouges [3]. En l'absence de fantôme, les cellules marquées circulent sans être dérangées, parallèlement aux parois. Lorsque les fantômes de globules rouges sont rajoutés, les collisions entre les cellules augmentent, ce qui induit un déplacement latéral des particules marquées. Il se produit alors des collisions avec la paroi dont la fréquence augmente avec la concentration en fantômes de globules rouges.

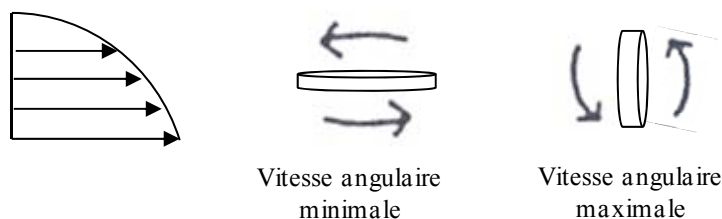
### 3.5.1. Caractéristiques d'un globule rouge singulier

Un globule rouge isolé dans du plasma subissant un écoulement de Poiseuille avec un cisaillement moyen  $\gamma < 20 \text{ s}^{-1}$  aura un effet rotatif similaire à celui d'une particule rigide tout en gardant sa forme biconcave [3]. Une telle rotation est provoquée par le gradient de vitesse présent dans le vaisseau et entraîne une contrainte du fluide qui s'exerce sur la surface du globule rouge. Ainsi, la vitesse angulaire d'une particule varie de façon périodique, étant maximum lorsque la particule est perpendiculaire à l'écoulement et minimum lorsqu'elle est alignée avec l'écoulement (Figure 3.6).

---

<sup>2</sup> On enlève l'hémoglobine du globule rouge et on referme sa membrane.





**Figure 2.11 - Disque rigide dans un écoulement de Poiseuille. Le gradient de vitesse présent dans ce type d'écoulement provoque la rotation du disque (modifiée de [2]).**

Pour des taux de cisaillement supérieur à  $20 \text{ s}^{-1}$ , la rotation du globule rouge dévie de celle d'une particule rigide. Sous l'effet de force de contrainte plus importante, le globule rouge devient plus déformable et reste plus longtemps aligné avec l'écoulement. La forme du globule rouge devient alors plus allongée.

Ces effets de rotation et de déformation du globule rouge entraînent alors une perturbation dans l'écoulement qui, selon plusieurs théories, peut expliquer la migration axiale des plaquettes sanguines. Nous allons voir dans ce mémoire que la formation d'agrégats érythrocytaires joue également un rôle prépondérant dans la migration plaquettaire.

### 3.5.2. Les théories proposées

Il existe plusieurs théories selon lesquelles les globules rouges améliorent le transport des plaquettes sanguines.

Une étude faite par Aarts *et al.* [6] suggère que les globules rouges augmentent la diffusion des plaquettes par un effet de mélange turbulent appelé *turbulent mixing effect*. Les globules rouges en rotation dans le champ de cisaillement provoquent un effet de mélange des particules environnantes, et, par ce fait, augmentent la diffusion des plaquettes. Selon Kellar et Skalak [40] et Barthes-Biesel et Sgaier [41], la déformabilité des globules rouges expulse les plaquettes de l'écoulement central vers les parois pendant qu'ils migrent au centre du conduit. Ceci résulte en une région bi-phasique avec, au centre, une zone riche en globules rouges et pauvre en plaquettes, et, en périphérie, une zone riche en plaquettes et pauvre en globules rouges. Selon Keller [42], les globules rouges subissent une rotation dans la région de cisaillement et provoquent ainsi des petites turbulences locales, entraînant un

effet de mélange et un mouvement plus rapide des molécules et particules voisines. Par ce mécanisme, les globules rouges favoriseraient le transport des plaquettes. D'après Chien, la rotation du globule rouge a un certain volume de balayage qui est appelé *swept-out volume* [43] et dont l'amplitude dépend de sa déformabilité. Plus le globule rouge se déforme, moins le volume de balayage sera important. En combinant cet effet avec le concept de mélange turbulent de Keller, Aarts *et al.* [7] ont démontré que l'effet de mélange sur les particules environnantes diminuait avec la déformabilité des globules rouges, et, par conséquent, diminuait la diffusion des plaquettes ainsi que leur adhésion sur les parois vasculaires. Une autre explication est basée sur les observations de Goldsmith [44] qui stipule que les globules rouges subissent un déplacement radial erratique. Ce déplacement radial des globules rouges est en fait dû aux collisions entre les particules circulantes, et provoque ainsi le déplacement des plaquettes. Dans cette théorie, la rapidité du transport des plaquettes est proportionnelle aux taux de cisaillement, à l'hématocrite, mais pas au diamètre du globule rouge. Finalement, la présence d'une couche d'écumage dit *skimming layer* [6] pourrait constituer une dernière explication potentielle à ce phénomène. Dans les vaisseaux sanguins, les globules rouges occupent le centre du conduit laissant ainsi une couche riche en plaquettes proches des parois vasculaires. Ceci est provoqué par la différence de taille entre les plaquettes et les globules rouges.

Ces théories aboutissent toutes à la même conclusion c'est-à-dire, que l'augmentation de la concentration de plaquettes à proximité des surfaces vasculaires entraîne une augmentation de l'adhésion plaquettaire et favorise la formation de thromboses.

### CHAPITRE 3 : **OBJECTIF DU PROJET**

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les plaquettes étaient des unités granuleuses de petite taille dont la fonction majeure était leur implication dans l'hémostase primaire, où elles étaient les premiers éléments à intervenir dans l'arrêt d'un saignement vasculaire. En réalité, les plaquettes jouent un rôle majeur dans les divers mécanismes de l'hémostase, de la coagulation et de la formation de thrombose. Afin de pouvoir intervenir dans la réparation d'une brèche ou dans la formation d'une thrombose veineuse, une concentration importante de plaquettes doit être transportée localement au niveau du site endommagé ou inflammé. Plusieurs mécanismes tels que l'inter-collision, induits par mouvement Brownien ou par haut cisaillement, de même que la présence de globules rouges, entrent en jeu afin de promouvoir cette migration. C'est la présence de globules rouges qui induit le plus de déplacements plaquettaires. En effet, de nombreuses études ont montré que la réduction ou l'absence de globules rouges (anémie) entraînait des désordres hémorragiques et qu'une concentration trop importante en globules rouges entraînait des désordres thrombotiques. Ce sont aussi les globules rouges qui sont responsables du caractère non Newtonien du sang. En s'agrégeant et en formant des structures plus complexes et plus larges, les globules rouges modulent la résistance au flot sanguin et affectent ainsi les particules en suspension du sang.

Nous avons vu le rôle important que jouent les globules rouges sur le transport des plaquettes. Qu'en est-il du rôle que jouent les agrégats de globules rouges ?

Il est possible que ces agrégats contribuent à la migration axiale des plaquettes. Nous savons que les agrégats de globules rouges occupent le centre des vaisseaux sanguins et favorisent la formation d'un noyau central d'érythrocytes. Ce processus provoque le développement d'un écoulement bouchon où plusieurs globules rouges sont agrégés les uns aux autres. La migration des plaquettes est le résultat d'une collision continue des globules rouges se situant en dehors de cet écoulement bouchon et l'amplitude de cette migration

augmente avec l'hématocrite. En d'autres termes, plus ce bouchon est large, plus les cellules individuelles seront situées en périphérie. La migration des plaquettes induite par les globules rouges pourrait ne pas être un mode de transport suffisant pour atteindre les parois vasculaires. La présence d'un certain degré d'agrégation érythrocytaire est peut être un phénomène nécessaire ou contribuant. L'hyperviscosité causée par ce phénomène pourrait aussi augmenter le temps d'interaction des plaquettes avec la paroi vasculaire et favoriser ainsi la thrombose veineuse.

De plus, pour que les plaquettes puissent adhérer aux parois vasculaires, elles doivent d'abord quitter le flux principal de l'écoulement sanguin. Nous avons vu dans les pages précédentes que, pour ce faire, plusieurs facteurs hémodynamiques clé entraînent en jeu (taux de cisaillement local et contraintes de cisaillement pariétal) mais ces facteurs sont eux-mêmes influencés par certaines propriétés rhéologiques du sang telles que l'hématocrite et le niveau d'agrégation érythrocytaire [2]. Récemment, une étude qualitative faite par Nash *et al.* [11] a essayé de démontrer que bien que l'agrégation érythrocytaire n'était pas requise pour la migration des plaquettes qui augmente avec l'hématocrite et le cisaillement, l'augmentation, ou la variation du niveau d'agrégation en présence d'un taux de cisaillement faible, pourraient tout de même la favoriser. Ces discussions ne sont cependant pas très claires et ne sont fondées sur aucun résultat expérimental. Selon Nash *et al.*, la contribution du niveau d'agrégation reste floue, mais il existe tout de même de bonnes explications théoriques pour y croire. Une étude utilisant du dextran *in vivo* suggérait que l'agrégation érythrocytaire pouvait interférer avec la migration des plaquettes [45]. Néanmoins des études *in vitro*, où le niveau d'agrégation peut être contrôlé en l'absence de facteurs confondants, seraient nécessaires pour confirmer cette observation.

Très peu d'études ont donc été faites pour confirmer l'hypothèse d'une contribution de l'agrégation érythrocytaire sur la migration des plaquettes. En fait, à ce jour, aucun groupe n'a directement étudié l'impact que l'agrégation pourrait avoir sur la migration plaquettaire, et aucune étude *in vitro* n'a encore été réalisée. La formation d'agrégats de globules rouges, dans la circulation, est modulée par le taux de cisaillement local. Les études antérieures ont toujours été réalisées ou modélisées dans des tubes de façon à reproduire un écoulement physiologique. Dans un tube, le profil de l'écoulement est parabolique ou quasi parabolique

(aplani) et implique une variation spatiale du taux de cisaillement et possiblement de l'hématocrite. Il n'est donc pas possible de maintenir un niveau d'agrégation homogène et d'éliminer tout facteur confondant. Ceci peut être vu comme une limitation car dans ces conditions d'écoulement de Poiseuille, il est impossible d'étudier, de manière isolée, l'influence que l'agrégation érythrocytaire a sur le transport des plaquettes sanguines. Les interprétations quantitatives ne peuvent être pertinentes que lorsqu'il s'agit d'un écoulement de Couette. En utilisant un rhéomètre de Couette (ou rhéomètre de Couette), cette étude va suivre une procédure de mesure où le taux de cisaillement est constant et contrôlé dans tout l'écoulement permettant ainsi une quantification de l'impact de l'agrégation érythrocytaire en fonction du cisaillement et de l'hématocrite.

L'objectif de ce projet est donc de quantifier, *in vitro*, la migration axiale de particules simulant des plaquettes sanguines en fonction des paramètres précités. L'hypothèse de départ est que la migration des plaquettes vers les surfaces internes du Couette augmente avec l'importance du niveau d'agrégation présent. Dans un échantillon de globules rouges suspendus dans une solution saline (milieu non agrégeant) le nombre de particules fixées sur les surfaces internes du Couette devrait donc être très faible. Par contre, en modulant la tendance qu'ont les globules rouges à former des agrégats à l'aide de macromolécules en suspensions (dextran), le nombre de particules fixées sur les surfaces internes du rhéomètre de Couette devrait augmenter. Le protocole expérimental décrit au chapitre suivant permettra des confirmer ces hypothèses.

## CHAPITRE 4 : MATÉRIEL ET MÉTHODE

Le but de ce projet est de quantifier la migration des particules de taille équivalente à celle des plaquettes sanguines, c'est-à-dire de compter le nombre de particules qui ont migrées axialement et qui ont adhérees aux parois du rhéomètre, en fonction du niveau d'agrégation érythrocytaire présent *in vitro* (Figure 5.1).

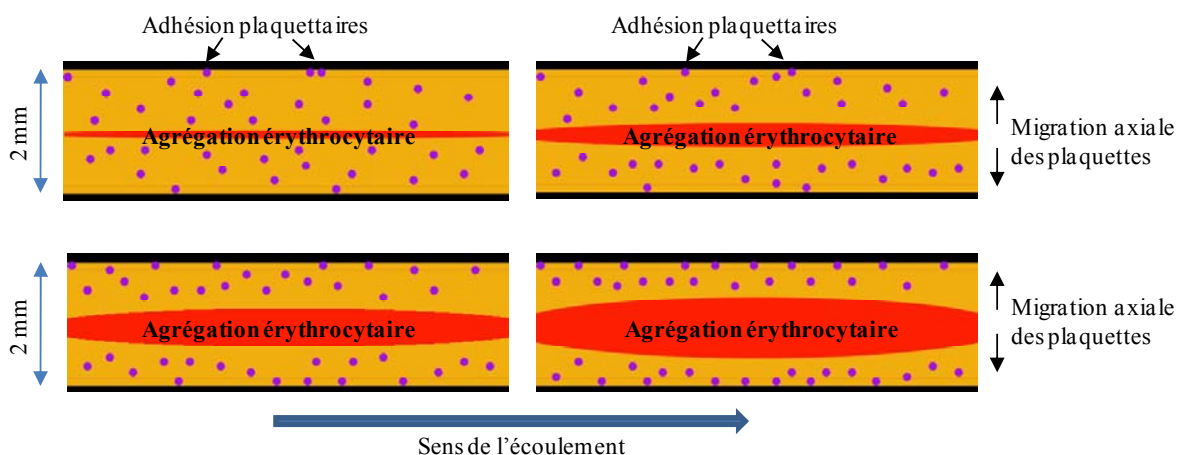


Figure 4.1 - Migration axiale et adhésion des plaquettes sanguines simulées en fonction du niveau d'agrégation érythrocytaire.

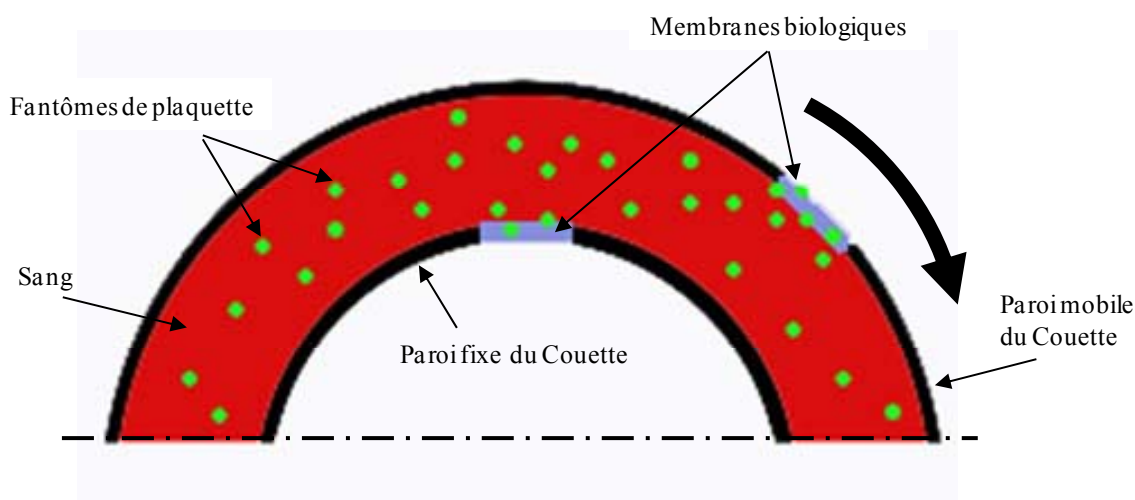
Afin de mettre en place un montage *in vitro* et efficace, deux éléments doivent être pris en compte :

1) Les plaquettes sanguines, une fois extraites du corps humain, sont très difficilement manipulables, et coagulent très rapidement sur de nombreuses surfaces. Il est donc difficile de travailler avec des plaquettes *in vitro* sans l'ajout d'un anticoagulant. Cependant, cet ajout inhibe l'activation plaquettaire et, de ce fait, l'adhésion plaquettaire. Cette adhésion incontrôlée apporte alors un artefact à nos mesure et aura pour effet de fausser la quantification de plaquettes sanguines [46]. Comme cette étude ne se concentre que sur un aspect physique et non sur les propriétés biochimiques des plaquettes, il est possible de les

remplacer par des fantômes (microparticules) ayant des propriétés physiques similaires mais dont l'adhésion peut être contrôlée.

2) Nous voulons étudier le déplacement des plaquettes en fonction du niveau d'agrégation érythrocytaire. Pour cela, le taux de cisaillement doit pouvoir être facilement contrôlable afin de maintenir un tel niveau homogène durant chaque manipulation réalisée lors de cette étude. Or, nous avons vu que le taux de cisaillement, dans un écoulement tubulaire, variait en fonction de la position radiale. De ce fait, l'étude se fera dans un écoulement de Couette car ce dernier a l'avantage de maintenir un profil de cisaillement constant dans tout l'échantillon d'étude pour une vitesse relative constante des deux cylindres de l'appareil.

Le principe du montage *in vitro* est le suivant : en faisant tourner le rhéomètre de Couette à une vitesse angulaire contrôlée, un taux de cisaillement constant s'établira dans l'entrefer de l'appareil où se loge l'échantillon sanguin à étudier. Ainsi, le niveau d'agrégation présent sera homogène. Après avoir injecté des fantômes de plaquettes sanguines (microparticules) dans l'échantillon, ceux-ci, influencés par le niveau d'agrégation présent, seront expulsés à un taux plus ou moins rapide vers les parois de l'appareil (Figure 5.2). Une fois en contact avec les parois du Couette, les fantômes y seront fixés de manière permanente afin de permettre, à la fin de l'expérience, le comptage du nombre de particules qui ont migré.



**Figure 4.2 - Utilisation de fantômes de plaquettes et de membranes biologiques pour simuler l'adhésion plaquettaire aux parois du rhéomètre de Couette.**

C'est à l'aide de membranes biologiques attachées sur les parois interne et externe du Couette que les fantômes de plaquettes seront maintenus emprisonnés.

Pour ce faire, deux principes devront être utilisés : le principe d'affinité anticorps/antigène (membranes biologiques utilisées pour fixer les fantômes aux parois du Couette de manière spécifique et permanente) et le principe de fluorescence (pour quantifier le nombre de fantômes fixés sur les membranes biologiques).

Ce chapitre se divise en deux sections : dans la première section, intitulée 'principes et matériel', le principe de la fluorescence ainsi que celui d'affinités anticorps/antigène sont exposés sommairement. Le rhéomètre de Couette est ensuite présenté et les équations permettant d'établir le profil de vitesse et le profil du cisaillement présents dans l'entrefer du Couette sont aussi développées. Cette section présente également une description détaillée des microparticules et des membranes biologiques utilisées pour ce projet. Une présentation des appareils utilisés pour la quantification des microparticules finalisera cette première section. Par la suite, dans la deuxième section intitulée 'méthodologie', une explication détaillée de la préparation des échantillons sanguins ainsi que du protocole expérimental et du post traitement sera proposée. Finalement, une brève description des analyses statistiques utilisées pour se projet clôturera ce chapitre.

## **5.1. Principes et matériel**

Le principe d'affinité anticorps/antigène ainsi que celui de la fluorescence sont indispensables à la bonne réussite de ce projet et sont à la base du montage *in vitro*. Il est, de ce fait, important de bien comprendre leur rôle ainsi que leur fonctionnement.



### 5.1.1. Revêtement protéinique

#### 5.1.1.1. Rappel sur le principe d'anticorps-antigène

Afin de survivre dans un environnement hostile, les organismes vivants ont su développer un mécanisme de défense très spécifique et robuste. Un anticorps est une protéine contenue dans le sang (plus précisément dans le sérum sanguin) que l'on appelle également immunoglobuline. Un antigène, quant à lui, est une substance étrangère de nature organique (provenant du vivant) ayant l'aptitude d'induire, au moment de son introduction dans l'organisme, la formation d'anticorps spécifiques (i.e. qui ne reconnaissent qu'un seul type d'antigène). Lorsqu'un antigène entre dans le corps humain, une infection se développe (rhume, pharyngite, grippe, hépatite, etc.). Les différents anticorps circulent librement dans l'organisme à la recherche du responsable de l'infection, et lorsque l'antigène rencontre l'anticorps qui lui est spécifique, un complexe immun se forme; l'anticorps va se fixer à l'aide de ses chaînes légères sur les récepteurs membranaires de l'antigène. La liaison qui s'y crée est très forte et quasi irréversible. On dit que l'anticorps a une affinité très spécifique avec l'antigène. Cette liaison constitue l'un des mécanismes de défense du système immunitaire. De nombreuses études ont été faites pour reproduire ce type de liaison, *in vitro* et *in vivo*, de manière biologique et synthétique [47]. Aujourd'hui, on ne parle plus d'antigène/anticorps mais plutôt de récepteur/ligand, qui est un terme plus général. Le degré d'affinité entre un récepteur et un ligand se définit par la force de liaison présente [48]. Le couple le plus communément utilisé dans la littérature est le couple biotine/(strept)avidine.

#### 5.1.1.2. La (strept)avidine et la biotine

L'avidine est une protéine qui se retrouve entre autres dans le blanc de l'œuf alors que la streptavidine est une protéine isolée d'une culture d'avidine. Leur structure est constituée de quatre sous-unités identiques. Leur formule chimique, composition, propriétés ainsi que les différentes étapes de préparation sont disponibles en [49-51]. La streptavidine est plus résistante à la dénaturation que l'avidine, c'est-à-dire qu'elle conserve plus longtemps sa conformation originelle sans l'effet de traitements thermiques ou chimiques. De plus, les

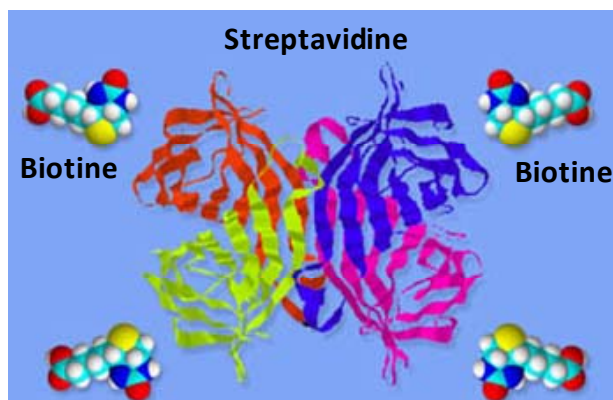
caractéristiques de fixation non-spécifiques de l'avidine sont plus importantes. La streptavidine est donc un meilleur candidat pour ce projet.

La biotine, aussi appelée vitamine H ou B8, est, quant à elle, une vitamine qui est entièrement apportée dans le corps humain par l'alimentation. Ainsi, on la retrouve dans la plupart des organes (foie, rein, etc.) [47].

Il existe de nombreuses autres interactions récepteur/ligand décrites dans la littérature [52]. Cependant, l'interaction biotine/(strept)avidine possède des caractéristiques uniques qui la rendent idéale pour de multiples applications. En effet, depuis 1940, l'interaction (strept)avidine/biotine est devenue très populaire pour une variété de technologies (immunohistochimie, biologie moléculaire, bactériologie, etc.) et d'applications spécifiques (interaction moléculaire, système de détections d'ADN, biocapteurs, etc.) [53].

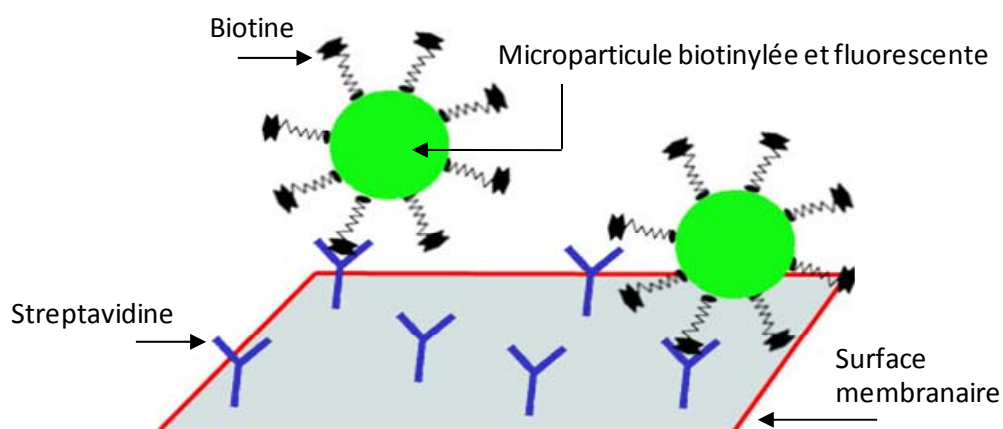
L'interaction streptavidine/biotine est la plus forte interaction biologique non covalente qui existe. La constante d'association  $K_a$ , ou constante d'affinité, est de  $10^{15}$  L.mol<sup>-1</sup> [47]. Elle est à peu près  $10^3$ - $10^6$  fois plus forte que l'interaction chez les autres différents couples de récepteur/ligand disponibles sur le marché. De plus, la liaison est très rapide et une fois la liaison faite, elle n'est pas affectée par des changements de température, de pH, de solvant ou autres agents dénaturants.

La liaison de la streptavidine à la biotine est donc très spécifique. La streptavidine ne se liera jamais à une molécule autre que la biotine. De plus, la streptavidine possède quatre sites de liaison par molécule (Figure 5.3). Cette propriété est très utile, surtout en marquage par fluorescence, car elle permet à plusieurs ligands de se fixer sur un même récepteur, augmentant ainsi le signal fluorescent [54]. Enfin, la biotine est une petite molécule (244.31 Da) [47] qui n'affecte pas l'activité biologique du site dans lequel elle est introduite. Dans notre cas, la biotine n'aurait aucun effet sur les propriétés rhéologiques du sang.



**Figure 4.3 - Représentation schématique de la streptavidine avec ses quatre sites de liaison sur lesquels la biotine vient se lier (modifiée de [www.arrayit.com](http://www.arrayit.com)).**

Dans un système biotine/streptavidine, l'un des deux éléments peut être biotinylé grâce à un processus d'attachement sur une molécule ou sur une surface (surface membranaire, microparticule, macromolécule, etc.) comme il est schématisé à la figure 5.4. C'est un processus qui requiert une certaine expertise en la matière [55]. Cependant, de nombreux agents biotinylés (avec fluorophores, polystyrènes, métal, etc.) ainsi que différents dérivés de streptavidine sont aujourd'hui disponibles commercialement (Section 5.1.5).



**Figure 4.4 - Streptavidine (Y) fixée à une surface sur laquelle une microparticule fluorescente, biotinylée, vient se fixer par liaison non covalente.**

La streptavidine/biotine est donc le couple désiré car l'utilisation de ce principe est idéale pour ce projet. La streptavidine doit pouvoir être fixée sur des membranes biologiques que l'on viendrait coller sur les parois internes du Couette. Lorsque les microparticules entreraient en contact avec l'une des membranes, elles seraient immédiatement emprisonnées de façon irréversible par la streptavidine. Il a donc été nécessaire de trouver commercialement des microparticules dotées d'un revêtement de biotine ainsi qu'une membrane biologique de streptavidine.

### 5.1.2. Principe de la fluorescence

#### 5.1.2.1. Introduction

Parmi les méthodes physiques d'investigation des milieux biologiques, la fluorescence, de par sa grande sensibilité d'analyse et ses résolutions (spectrale, spatiale, temporelle et d'orientation) est devenue un outil très intéressant en biologie pour le monitoring, la détection et l'analyse de cellules ou de tissus [56]. Cependant, les modes d'utilisation de la fluorescence peuvent être de différents types (excitation en mode continue, pulsé ou modulé), et s'appliquent maintenant à des domaines autres que la biologie moléculaire (industriel, optique, imagerie, etc.). En effet, de grandes avancées dans la photo physique ont été réalisées à partir des années 80. L'utilisation de la fluorescence a particulièrement augmenté depuis l'amélioration de nouveaux traceurs fluorescents et la mise à profit de leurs caractéristiques d'émission (longueur d'onde, résolution spectrale, durée de vie de l'état excité, résolution temporelle, rendement quantique de fluorescence, etc.). De plus, avec le développement d'appareils permettant une meilleure analyse de quantification, l'apparition progressive de capteurs de plus en plus performants et le développement de la micro-informatique, le principe de la fluorescence est devenu une technique de pointe très précise.

L'amélioration de la résolution spatiale a été possible avec l'utilisation de fibres optiques pour localiser l'excitation et/ou l'émission. Les nouveaux progrès ont permis de déplacer l'analyse globale d'un échantillon vers des volumes de plus en plus petits, via des techniques de microscopie (microscopie confocale ou alternatives en champ lointain, microscopie en champ proche optique, etc.) et ce, jusqu'à atteindre pratiquement l'observation d'une

molécule unique. Il est maintenant possible de détecter une particule fluorescente d'une taille équivalente à celle d'une plaquette sanguine ( $\approx 2 \mu\text{m}$ ).

### 5.1.2.2. Excitation d'un électron

Comment certaines molécules peuvent-elles émettre de la fluorescence ?

Afin de répondre à cette question, il est tout d'abord important de connaître certaines bases de mécanique quantique : l'atome est constitué de trois types de particules atomiques: le proton, chargé positivement, le neutron, ne portant aucune charge, et l'électron, chargé négativement. Le groupement des protons et des neutrons forme un petit noyau contenant presque toute la masse de l'atome. Les électrons, eux, voyagent autour du noyau dans une orbite circulaire, comme une planète autour du Soleil (Figure 5.5.A). En 1900, Planck a supposé (théorie quantique) que les systèmes qui émettent un rayonnement, le font par saut d'énergie. A partir de cette théorie, Bohr [57] a postulé qu'il y avait émission ou absorption d'une radiation lorsque l'électron passait d'une orbite à l'autre.

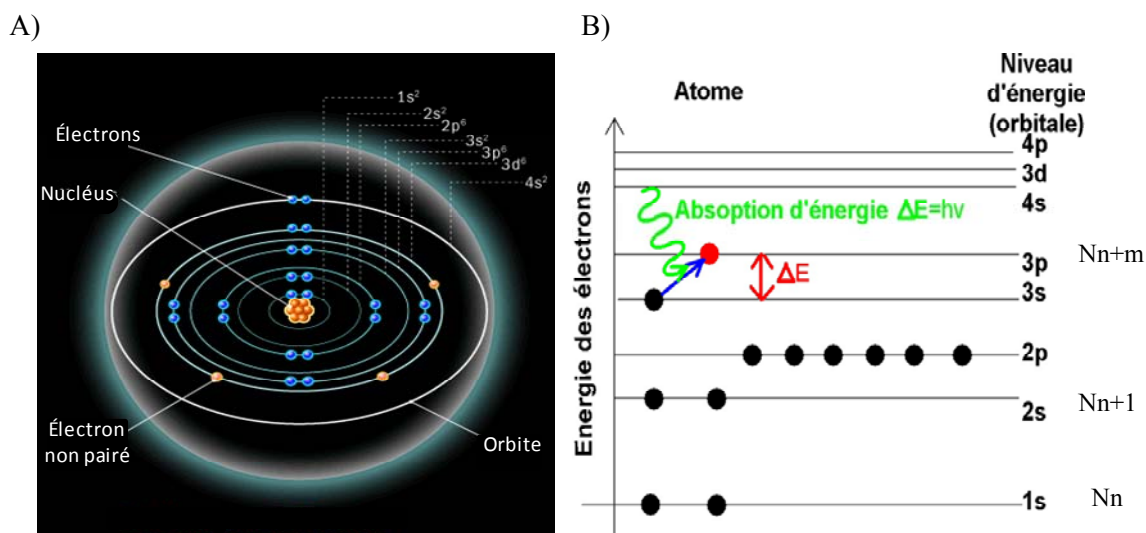


Figure 4.5 - A. Organisation des électrons en orbite autour du noyau atomique B. Niveau d'énergie orbitale. L'absorption d'énergie de l'électron ( $\Delta E$ ) provoque un saut à un niveau d'énergie supérieure ( $N_{n+m}$ ) ([www.science.howstuffworks.com](http://www.science.howstuffworks.com)).

Cependant, selon les théories de mécanique quantique, un électron en orbite autour du noyau devrait rayonner et, perdant son énergie par rayonnement, tomber sur le noyau. En 1913, Bohr supposa alors qu'il existait certaines orbites où l'électron n'émettait pas de rayonnement. Les atomes en orbite seraient donc stables et à un état énergétique d'équilibre. Toutefois, si l'atome est soumis à une source d'énergie extérieure, des électrons des couches énergétiques inférieures peuvent sauter à un niveau supérieur (Figure 5.5.B). Les électrons sautent d'un niveau à un autre lorsqu'ils absorbent de l'énergie [58]. Chaque orbite correspond à un niveau  $N$  d'énergie donné de l'atome: le niveau d'énergie le plus bas, dit niveau fondamental, correspond à l'orbite la plus proche du noyau, qui porte le numéro  $N=1$ . Plus  $N$  est grand et plus l'orbite a un grand rayon, ce qui veut dire que l'énergie de l'atome est plus élevée. Lorsque l'électron retombe d'un niveau excité à un niveau de plus basse énergie, il y a émission d'un rayonnement qui transporte exactement l'énergie correspondant à la différence d'énergie entre les deux niveaux. Pour qu'il y ait émission, il faut que l'énergie du niveau initial soit supérieure à l'énergie du niveau final, c'est-à-dire que  $E_{n+1} > E_n$ . L'occupation des différents niveaux d'énergie est décrite par la distribution d'énergie de Boltzmann [59].

### 5.1.2.3. Principe

Le phénomène de fluorescence est basé sur le même principe des changements d'état d'énergie [56], mais appliqué sur des molécules fluorophores ou isotopes radioactifs. Le fluorophore, ou fluorochrome, est une substance chimique qui a la capacité de rendre une molécule fluorescente. L'utilisation de fluorochromes en biologie moléculaire est plus récente que celle d'isotopes radioactifs. Cependant, elle a l'avantage de donner des résultats instantanés, tout en s'affranchissant des longs temps d'exposition requis pour la technique par radioactivité. Cependant, et c'est un point important, la fluorescence par fluorophore n'est pas permanente et l'intensité de la fluorescence diminue avec le temps.

Dans la forme la plus simple, l'intensité de fluorescence diminue après illumination suivant un déclin exponentiel qui est régi par la relation suivante :

$$I(t) = I_0 \times e^{-t/\tau} \quad (11)$$

avec

$I(t)$  : L'intensité de fluorescence au temps  $t$ ,

$I_0$  : L'intensité de fluorescence au temps 0,

$T_f$  : Le temps quand la fluorescence a atteint  $I_0/e$  avec  $T_f = F_f/k_f$ ,

$F_f$  : Le rendement quantique de la fluorescence et

$K_f$  : La constante de fluorescence.

Une intensité lumineuse incidente, d'une certaine énergie, et donc, à une certaine longueur d'onde, est envoyée sur une molécule fluorophore au repos. Celle-ci va emmagasiner de l'énergie, ce qui va l'exciter. La particule va monter à un niveau d'excitation supérieur (Figure 5.6).

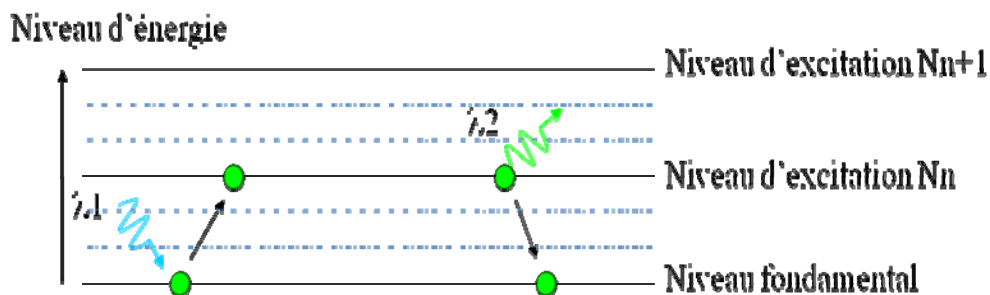


Figure 4.6 - Excitation par fluorescence. Le fluorophore est excité par une énergie de longueur d'onde  $\lambda_1$  et doit émettre un photon d'énergie (de longueur d'onde  $\lambda_2$ ) pour retomber à son niveau d'énergie fondamentale.

Pour revenir à son état de stabilité, c'est-à-dire au niveau de repos, elle doit impérativement relâcher l'énergie qu'elle a en surplus. La particule va donc émettre un photon d'une énergie correspondant à une deuxième longueur d'onde. L'émission de ce photon représente une perte d'énergie d'un état d'excitation accompagné de radiation (lumière). Le photon émet une lumière fluorescente de couleur dépendant de la longueur d'onde d'émission. Le spectre d'émission est presque équivalent au spectre d'excitation. Cependant, le spectre d'émission se produit à une longueur d'onde plus grande (plus vers le rouge) et à une intensité plus faible, c'est le décalage de Stokes. En fait la différence

énergétique entre l'excitation et l'émission représente l'énergie perdue lors du retour à l'état de repos.

#### 5.1.2.4. Couple de longueur d'onde excitation/émission

Pour que le fluorophore puisse émettre une fluorescence de couleur particulière, il faut que la longueur d'onde de l'intensité lumineuse incidente soit d'une certaine valeur. Par exemple, si l'on souhaite que le fluorophore émette de la lumière verte ( $\lambda = 520\text{nm}$ ), il faut l'exciter avec une lumière bleu ( $\lambda = 480\text{nm}$ ). On parle alors de couple excitation/longueur d'onde. Le tableau 2 énumère certains couples disponibles sur le marché.

**Tableau 2 - Liste des couples excitation/émission pour les fluorophores disponibles commercialement (modifiée de [60]).**

<b>Fluorophore</b>	<b>Excitation/Emission (nm)</b>	<b>Marquage</b>	<b>Fluorescence</b>
<b>Plum purple</b>	360, 420	interne	violet
<b>Estapor U</b>	395, 410	interne	violet
<b>Twilight blue</b>	425, 480	interne	bleu
<b>Estapor X</b>	460, 480	interne	bleu / vert
<b>Regatta blue</b>	460, 500	interne	bleu / vert
<b>Surf green</b>	470, 525	interne	vert
<b>Estapor XC</b>	480, 520	interne	vert
<b>Dragon green</b>	480, 520	interne	vert
<b>Envy green</b>	525, 565	interne	vert
<b>Suncoast yellow</b>	540, 600	interne	jaune
<b>Estapor Y</b>	555, 570	interne	vert
<b>Estapor Z</b>	Broad, 655	interne	jaune / orange / rouge
<b>Flash red</b>	660, 690	interne	rouge

#### 5.1.3. Le rhéomètre de Couette

Le rhéomètre de Couette employé dans ce projet a été conçu et développé par notre laboratoire en s'inspirant des appareils mis en place par Foster *et al.* [61] et De kroon *et al.* [62]. Il s'agit d'un rhéomètre de Couette à entrefer restreint. L'échantillon à étudier vient se placer dans un entrefer de 2 mm entre deux cylindres de rayons de 8 cm et 8,2 cm (Figure



5.7). Le cylindre externe du Couette est maintenu fixe, et le cylindre interne est entraîné par un moteur pas à pas (Compumotor, Modèle LN57-170, Richmond, CA, USA) à une vitesse angulaire ( $\Omega$ ) constante. Ce montage permet de générer des contraintes de cisaillement ajustables en fonction de la vitesse de rotation appliquée. Le moteur pas à pas est commandé par un programme élaboré à partir du logiciel Matlab et permet ainsi à l'opérateur d'appliquer, à l'échantillon sanguin, des taux de cisaillement constants sur des durées prédéterminées.

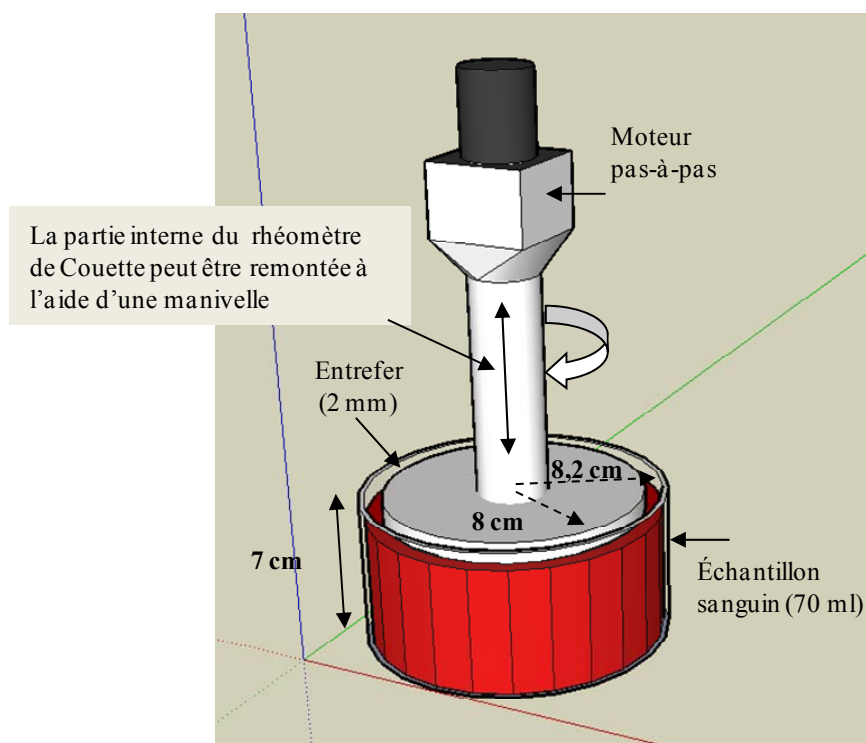


Figure 4.7 - Rhéomètre de Couette<sup>3</sup>.

Le cylindre interne du Couette a un degré de liberté sur l'axe des y et, à l'aide d'une manivelle, peut être remonté. Cette particularité est avantageuse lors du versement de l'échantillon sanguin dans le Couette car il est difficile de verser un volume important dans un espace de 2 mm. Une fois le volume sanguin versé dans l'appareil, le cylindre interne peut

<sup>3</sup> Illustration réalisée avec Google SketchUp.

être rabaissé. Au fur et à mesure que le cylindre descend, le volume sanguin s'emprisonne dans l'entrefer. La hauteur totale du volume d'intérêt est de 7 cm.

#### 5.1.3.1. Profil de vitesse présent dans l'entrefer du rhéomètre de Couette et relation entre la vitesse angulaire et le taux de cisaillement

Afin de déterminer les profils de vitesse et de cisaillement dans un rhéomètre de Couette pour un fluide non Newtonien, il faut résoudre les équations de Navier Stokes (développement complet disponible en annexe A).

Si les parois du rhéomètre de Couette sont séparées d'une distance  $r$  (Figure 5.8), et que la paroi mobile avance selon  $\theta$  à une vitesse angulaire constante  $\Omega_{max}$ , alors le taux de cisaillement appliqué sur un fluide non Newtonien s'écrit :

$$\dot{\gamma}(r) = r \frac{\partial \Omega(r)}{\partial r} = r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta(r)}{r} \right) \quad (12)$$

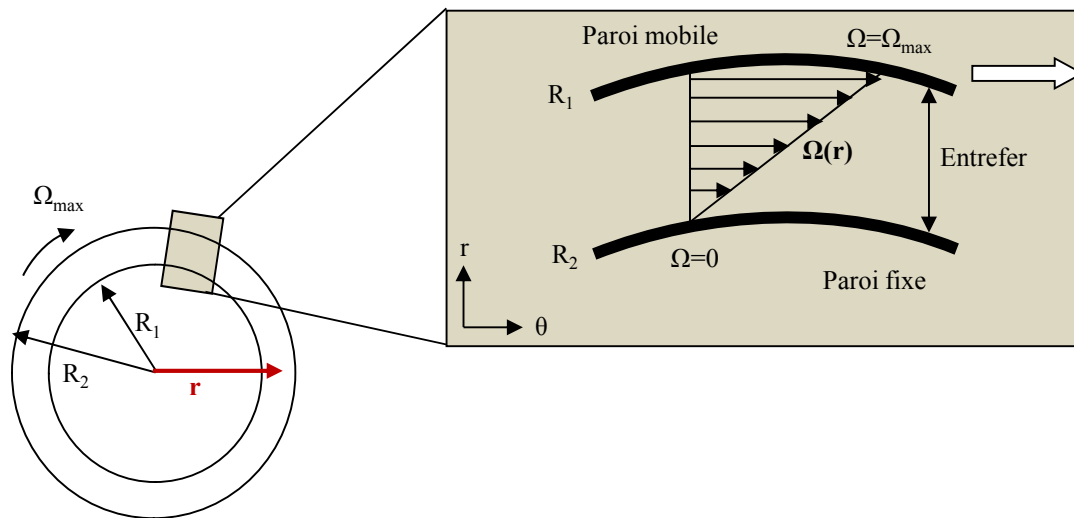


Figure 4.8 - Rhéomètre de Couette – Profil de la vitesse angulaire d'un fluide non Newtonien.

La vitesse angulaire  $\Omega(r)$  d'une couche du fluide à une distance  $r$  de l'origine, et compris entre  $R_1$  et  $R_2$ , peut s'exprimer en fonction de la vitesse angulaire  $\Omega_{max}$  du cylindre mobile. En développant les équations de Navier-stokes, nous obtenons :

$$\Omega(r) = \Omega_{max} \left( \frac{1 - \left(\frac{R_2}{r}\right)^{2/n}}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \right) \quad (13)$$

$R_2$  représente le rayon du cylindre externe (mobile) et  $R_1$  le rayon du cylindre interne (fixe).  $\Omega$  est la vitesse angulaire exprimée en nombre de révolutions/seconde.

En dérivant  $\Omega(r)$  nous obtenons alors  $\gamma$  : 
$$\dot{\gamma}(r) = r \frac{d\Omega}{dr} = \frac{2}{n} \frac{\Omega_{max}}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \times \left( \frac{R_2^{2/n}}{r^{2/n}} \right) \quad (14)$$

L'équation 13 nous indique que la vitesse angulaire varie en fonction de la position radiale  $r$  du fluide. L'équation 14 exprime le taux de cisaillement en fonction de la vitesse angulaire, ce qui implique qu'il n'est pas constant dans l'entrefer.

Cependant, cette variation du cisaillement peut être minimisée en choisissant une configuration géométrique idéale par l'utilisation d'un entrefer dit restreint. Si les rayons de courbure des deux cylindres sont suffisamment grands devant l'épaisseur de l'entrefer pour que les parois des cylindres soient considérées comme parallèles, c'est-à-dire si le rapport  $e = (R_2 - R_1)/R_1 \ll 1$ , alors le taux de cisaillement peut être considéré comme constant dans l'entrefer, l'équation (14) peut donc se simplifier et s'écrire :

$$\dot{\gamma}(r) \approx r \frac{d\Omega}{dr} = \frac{2\Omega R_1 R_2}{(R_2^2 - R_1^2)} \quad (15)$$

Ceci s'applique au rhéomètre de Couette utilisé puisque  $e = \frac{R_2 - R_1}{R_1} = \frac{16,2 - 16}{16} = 2,5$

En utilisant l'équation 15, le taux de cisaillement peut être considéré comme constant dans tout l'entrefer. Cependant, bien que cette approximation soit acceptée théoriquement, elle

n'est pas complètement réaliste. Il est possible d'évaluer la variation maximale du taux de cisaillement dans l'entrefer d'un rhéomètre de Couette en utilisant l'équation

$$\Delta\dot{\gamma} = 100 \times \left| 1 - \frac{\dot{\gamma}(R_1)}{\dot{\gamma}(R_2)} \right|$$

et en remplaçant les valeurs de  $R_1$  et  $R_2$  par les dimensions radiales du système conçu c'est-à-dire :  $R_1=80$  mm et  $R_2=82$  mm.

La figure 5.9 représente la variation maximale du taux de cisaillement en fonction de  $n$  où  $n$  représente la constante de la loi de puissance utilisée pour modéliser l'aspect non Newtonien d'un fluide ( $n=1$  pour un fluide Newtonien). Pour du sang humain normal,  $n < 0.8$  [63].

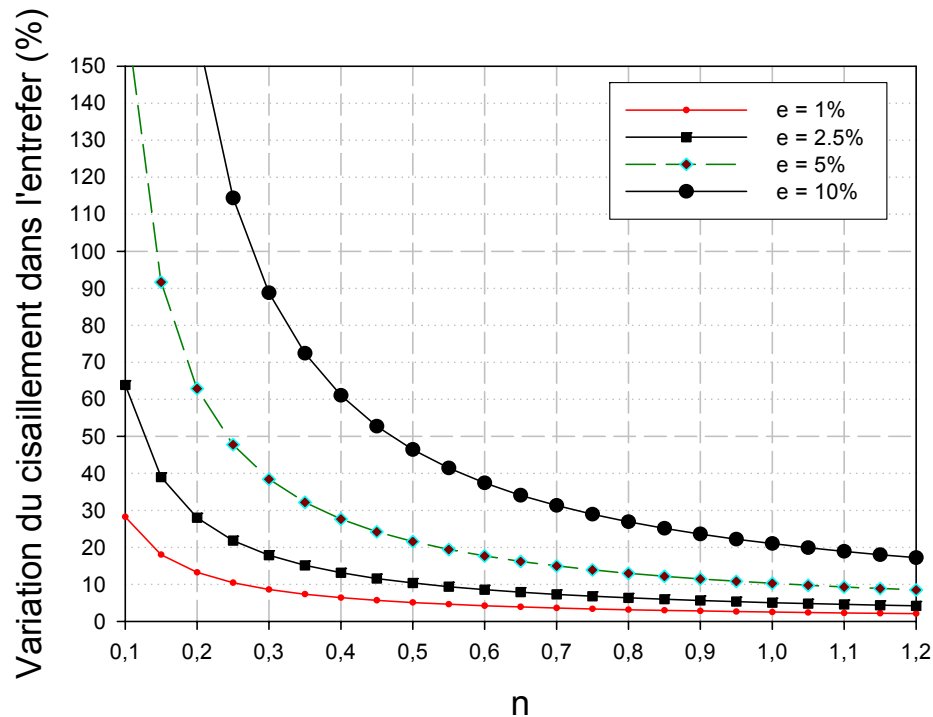


Figure 4.9 - Variation maximale du taux de cisaillement dans un rhéomètre de Couette pour différents rapports (e) entre les diamètres des cylindres de l'appareil.

Pour un fluide Newtonien ( $n = 1$ ) et pour un rapport  $e = 10\%$ , l'erreur d'estimation du taux de cisaillement s'élève à 20%. Cette erreur diminue pour des rapports de  $e$  plus faibles (pour  $e = 1\%$  à  $n = 1$ , erreur = 2%) et augmente de façon exponentielle pour des valeurs de  $n < 1$ .

En ce qui concerne le rapport  $e$  des cylindres de l'appareil utilisé ( $e = 2.5\%$ ), l'erreur peut être de 20% puisque  $0.3 < n < 0.8$ . On peut supposer que plus le sang sera agrégant, plus  $n \ll 1$  et plus l'erreur d'estimation du taux de cisaillement se rapprochera de 20%. Pour du sang non agrégant, presque considéré comme un fluide Newtonien, l'erreur d'estimation se rapprochera de 10%.

Cependant, bien que l'existence d'une variation du taux de cisaillement, fonction du type de sang utilisé, ait été démontrée, l'hypothèse d'un cisaillement constant dans l'entrefer sera tout de même considérée.

Il est maintenant possible de relier le taux cisaillement présent dans l'échantillon à la vitesse angulaire du moteur pas à pas (1 tour = 4000 pas), et ainsi quantifier le niveau d'agrégation érythrocytaire en fonction du taux de cisaillement.

Exemple :

1) Pour un cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Omega = 0.247 \text{ rev/sec}$  et

$$\Omega = 0.247 \text{ rev/sec} \times 4000 \text{ pas/rev} \Rightarrow \text{que le moteur doit effectuer } 988 \text{ pas/sec.}$$

2) Pour un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Omega = 0.0494 \text{ rev/sec}$  et

$$\Omega = 0.0494 \text{ rev/sec} \times 4000 \text{ pas/rev} \Rightarrow \text{que le moteur doit effectuer } 197 \text{ pas/sec.}$$

#### 5.1.3.2. Le Nombre de Taylor

Le nombre de Taylor est un nombre sans dimension qui représente le rapport entre la force centrifuge et la force de viscosité présentes entre deux cylindres concentriques. Il permet de caractériser la stabilité de l'écoulement d'un fluide placé dans l'entrefer d'un rhéomètre de Couette.

Le nombre de Taylor est déterminé par la vitesse de rotation angulaire critique. Un nombre de Taylor  $\geq 1712$  implique la présence d'un fluide instable provoquant des flux convectifs.

Le nombre de Taylor s'exprime par :  $Ta = \frac{\Omega_{\max} R d^3}{\nu^2}$  (16)

où  $\Omega_{\max}$  représente la vitesse angulaire max,  $R = (R_1 + R_2)/2$ ,  $d = R_2 - R_1$  et  $\nu$  la viscosité cinématique ( $= \mu/\rho$ ).  $R_1 = 40$  mm et  $R_2 = 42$  mm,

la vitesse angulaire maximale utilisée lors de cette étude est de 0.247 rev/sec soit :  $2 \times \pi \times 0.247 = 1.55$  rad/s.

En considérant  $\nu \approx 4 \times 10^{-6}$  pour  $\mu = 4$  cP et  $\rho \approx 1000$  kg/m<sup>3</sup>,

on obtient ainsi un nombre de Taylor de :  $Ta = \frac{1.55^2 \times 41 \times 10^{-3} \times (2 \times 10^{-3})^3}{(4 \times 10^{-6})^2} = 52$ .

Ce nombre implique que la vitesse maximale utilisée est bien en dessous de la vitesse angulaire critique. L'écoulement du fluide dans le Rhéomètre de Couette est donc laminaire.

#### 5.1.4. Les microparticules

Il existe plusieurs types de microparticules, tous ayant des particularités spécifiques en termes de dimensions, compositions et certaines autres propriétés particulières (fluorescence, revêtement, magnétisme, etc.). Les compositions de microparticules les plus communes incluent le polystyrène, le gel de silice et le PMMA (polyméthacrylate de méthyle), mais il existe aussi des microparticules en latex ou en métal. Enfin, il existe des microbulles utilisées généralement comme agent de contraste dans des applications d'imagerie ultrasonore [64].

Depuis quelques années maintenant, l'utilisation de microparticules est devenue une technique très attirante. Le fait de pouvoir ajouter un revêtement protéinique, ou de les rendre fluorescentes, a ouvert de nouvelles portes dans le domaine de l'immunologie et de la biologie moléculaire (relargage de médicaments [65], cytométrie en flux [66], microscopie, marquage et détection de cellules [67], biocapteur [68], etc.). Dans le domaine de la rhéologie du sang, les microparticules sont surtout utilisées pour simuler le comportement des particules en suspension dans l'écoulement sanguin [3, 6, 7]. Cependant, les microparticules n'ont jamais pu servir de fantômes de plaquettes sanguines à cause de leur

taille trop importante. Aujourd'hui, grâce aux nouvelles méthodes de fabrication, la taille des microparticules peut atteindre jusqu'à l'ordre du nanomètre, rendant possible leur utilisation pour simuler des plaquettes sanguines. À la fin des années 80, Eugene C. Eckstein fut l'un des premiers à utiliser les microparticules fluorescentes pour servir de fantômes de plaquettes grâce à quoi, il a pu observer *in vitro*, et par une technique d'imagerie microscopique, la présence excessive de plaquettes sanguines à proximité des parois d'un tube en fonction de l'hématocrite et du taux de cisaillement pariétal [10, 69].

Dans le cadre de notre étude, c'est l'aspect physique des plaquettes sanguines qui doit être reproduit. En plus, les microparticules retenues doivent être fluorescentes et dotées d'un revêtement protéinique. Les deux propriétés les plus importantes des plaquettes sanguines sont leur taille et leur densité. Le tableau 3 énumère toutes les propriétés essentielles des plaquettes que les microparticules doivent posséder.

**Tableau 3 - Propriétés importantes pour simuler l'aspect physique des plaquettes sanguines.**

Propriétés	
Diamètre	2 $\mu\text{m}$
Particule	Rigide <sup>4</sup> et en suspension
Concentration	Importante ( $\times 10^5/\mu\text{l}$ )

#### 5.1.4.1. Procédure de marquage par fluorescence

Il existe deux façons de rendre une microparticule fluorescente : soit par le marquage interne ou le marquage externe (Figure 5.10) [60, 70]. Le marquage interne est une procédure similaire à la teinture. Les microparticules sont submergées dans un solvant organique ou un colorant. Ce liquide insoluble va, petit à petit, se diffuser dans la matrice interne de la microparticule et y restera emprisonné une fois les microparticules retirées de la solution.

<sup>4</sup> Les plaquettes sanguines sont considérées comme des particules rigides car leur petite taille provoque une déformation négligeable [8] P. A. Aarts, S. A. van den Broek, G. W. Prins, G. D. Kuiken, J. J. Sixma, and R. M. Heethaar, "Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood," *Arteriosclerosis*, vol. 8, pp. 819-24, Nov-Dec 1988. De plus, elles ont une structure interne.

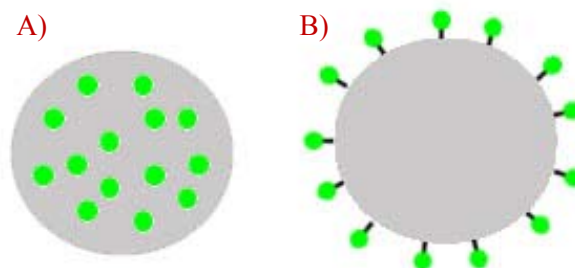


Figure 4.10 - A. Marquage interne et B. Marquage externe d'une microparticule.

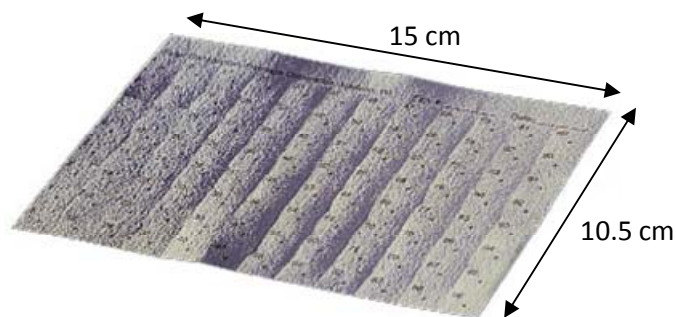
Le marquage externe est, quant à lui, une procédure plus longue et complexe. Cependant, la conjugaison de fluorophores à la surface d'une microparticule apporte des avantages uniques pour certaines applications telles que la cytométrie de flux.

En ce qui concerne l'application de la fluorescence dans ce projet, c'est le marquage interne qui est le plus adéquat. Grâce à cette technique, les sites d'adhésion membranaires restent libres pour y conjuguer des ligands (protéine, anticorps, etc.) à la surface de la microparticule. De plus, le marquage interne permet d'insérer plus de marqueurs et de produire une fluorescence stable et d'intensité plus forte.

#### 5.1.5. Sélection des produits

Plusieurs laboratoires (WVR, Analytix, Targeson, Polymer Laboratories (PL), Bangslabs, PolyMicrospheres ou encore Sigma-Aldrich) disposent de la technologie nécessaire pour produire des microparticules de toutes sortes. Le plus difficile fut de trouver une surface avec un revêtement protéinique. Pour que les particules puissent adhérer aux parois du rhéomètre de Couette, il faut y coller une surface protéinique de streptavidine ou de biotine. Le produit idéal était une membrane flexible et très fine pouvant être collée, par le moyen d'un adhésif, sur les parois du rhéomètre. C'est la compagnie Promega qui a proposé le produit le plus ressemblant à ce qui était recherché. La membrane *SAM<sup>2</sup> biotin-capture membrane* (Figure 5.11) est constituée d'un revêtement de streptavidine. La membrane ressemble à une feuille de papier de 10.5 x 15.0 cm prédécoupée en 96 carrés. Elle est très utilisée en immunologie pour étudier l'activité de la protéine kinase [67].





**Figure 4.11 - Membrane prédécoupée SAM<sup>2</sup> utilisée pour capturer les molécules biotinylées ([www.promega.com](http://www.promega.com)).**

La capacité d'adhésion et d'affinité du revêtement de streptavidine est très forte et quasi instantanée. Une fois l'association biotine/streptavidine formée, elle n'est pas affectée par des variations importantes en température, pH, solvant organique, ionique et non ionique et agent dénaturant [71]. De ce fait, il est tout à fait possible de coller la membrane à l'aide d'un adhésif commercial sans que celui-ci ne vienne endommager les sites de liaison actifs de la membrane. Les 96 petits carrés sont prédécoupés et numérotés afin de pouvoir les identifier facilement. De plus, l'utilisation de la fluorescence pour détecter des particules emprisonnées par la membrane SAM<sup>2</sup> a récemment été démontrée [71].

La figure 5.12 montre la relation entre le nombre de particules radioactives biotinylées par la membrane et l'intensité lumineuse de la radioactivité quantifiée par scintillation. On peut voir que la réponse est linéaire. Plus le nombre de particules radioactives liées à la membrane augmente et plus l'intensité lumineuse augmente. Cependant, cette relation n'est linéaire qu'en dessous d'un volume de 30  $\mu\text{L}$  (soit  $\leq 2.0 \text{ nmol/cm}^2$ ) de microparticules par carré. Il est donc important de respecter cette limitation lorsque les mesures expérimentales sont réalisées. Cette relation est similaire pour des particules fluorescences.

La membrane sélectionnée ayant un revêtement de streptavidine, le type de microparticules à choisir doit donc être biotinylé.

Le choix de la densité des microparticules est aussi un paramètre important. Dans un écoulement de Couette, si les particules sont moins denses (ex : microbulles) que le fluide, elles flotteront, et si elles sont plus denses (ex : particules en métal), elles couleront.

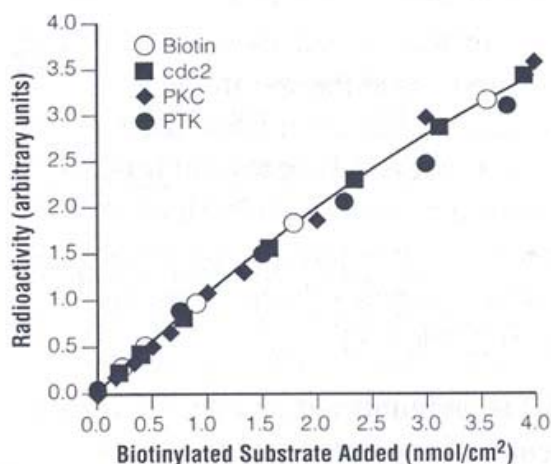


Figure 4.12 - Réponse linéaire entre l'adhésion de particules radioactives (ou fluorescentes) biotinylées à la membrane SAM<sup>2</sup> et l'intensité lumineuse quantifiée par scintillation [71].

La densité des microparticules en polystyrène est de  $1.06 \text{ g/cm}^3$ , ce qui est équivalent à la densité d'une plaquette sanguine [72], assurant ainsi leur suspension dans les échantillons sanguins à étudier. De plus, des études faites par Cho *et al.* ont montré que le déplacement de microparticules en polymère et de diamètre de 1 à 3  $\mu\text{m}$ , dans un écoulement de Poiseuille, était similaire au mouvement brownien et à la diffusion induite par cisaillement [73].

De ce fait, les microparticules désirées doivent être en polystyrène, avec un marquage de fluorescence interne, avoir un diamètre moyen de 2  $\mu\text{m}$  et un revêtement de biotine.

Les microparticules disponibles commercialement ont généralement un revêtement de streptavidine, et c'est la compagnie Bangslabs qui a été retenue car c'est la seule capable de produire ces particules personnalisées à un prix abordable.

La couleur de la fluorescence devait ensuite être définie. Bangslabs proposait différents couples de longueur d'onde d'émission/excitation disponibles. Le couple a été choisi en fonction des filtres monochromatiques disponibles pour le microscope qui serait utilisé pour la visualisation des microparticules. Les deux filtres disponibles sont : le bleu pour la lumière incidente (longueur d'onde d'excitation 480 nm) et le vert pour la lumière renvoyée par les microparticules (longueur d'onde d'excitation 520 nm). Le fluorophore disponible pour ce

couple de longueurs d'onde était le Dragon Green (tableau 2). Le tableau 4 énumère les spécifications des microparticules utilisées et compare leur caractéristiques avec celles des plaquettes sanguines.

**Tableau 4 - Spécifications des microparticules utilisées pour cette étude et comparaison avec les plaquettes sanguines.**

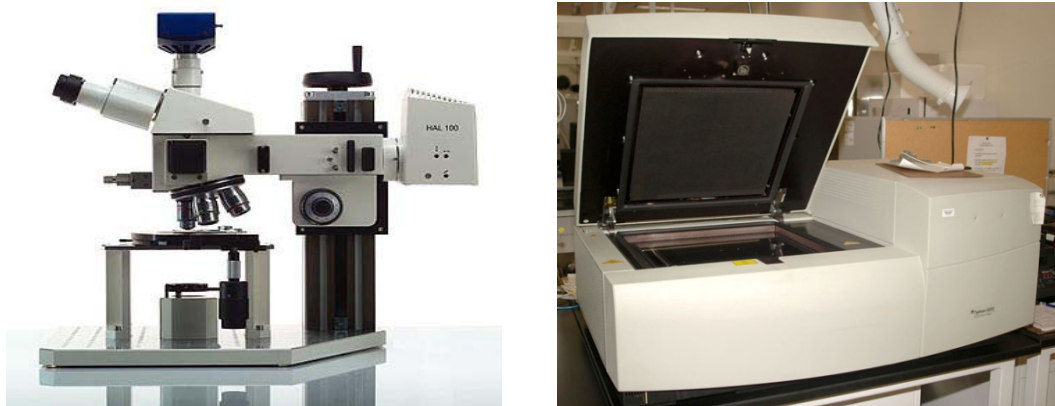
<b>Nom</b>	<b>Microparticules (480,520)</b>	<b>Plaquettes sanguines</b>
<b>Diamètre</b>	2 µm	2 µm
<b>Densité</b>	1.06 g/ml	1.062 g/ml
<b>Revêtement</b>	Biotine	N/A
<b>Couleur</b>	Dragon green (vert)	N/A
<b>Volume</b>	15 ml à 1% solide	N/A
<b>Solvant</b>	Borate + EDTA	N/A
<b>Quantité</b>	3.364e <sup>9</sup> / ml	2500 / ml

#### 5.1.6. Les méthodes d'imagerie

Il existe plusieurs appareils utilisés pour détecter la fluorescence : microscope, PhosphorImager, storm molecular imager et scintillateur.

Les laboratoires regroupés du centre de recherche du centre hospitalier de l'université de Montréal ont à leur disponibilité un microscope (Axiotech Vario, Zeiss) et un PhosphorImager (Typhoon 8600 Variable Mode Imager, Molecular dynamics) utilisés dans ce projet (Figure 5.13).

Le Typhoon 8600 est un appareil multifonction pouvant détecter, imager et quantifier la chimiluminescence, la phosphorescence et la fluorescence [74]. En ce qui concerne la fluorescence, le système utilise deux lasers monochromatiques vert et rouge. Combiné avec une optique très sensible, le Typhoon peut détecter jusqu'à quatre différents marqueurs de fluorescence dont le bleu.

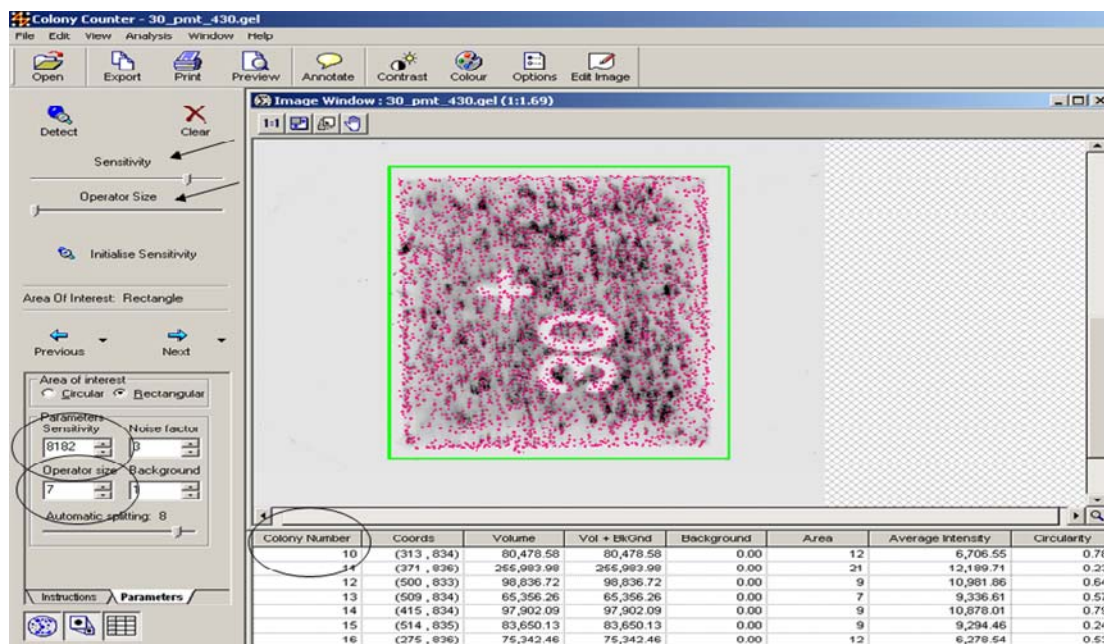


**Figure 4.13 - Microscope Axiotech Vario et PhosphorImager Typhoon 8600 ([www.techtrader.com.au](http://www.techtrader.com.au), [www.core.uaf.edu](http://www.core.uaf.edu)).**

La résolution spatiale maximale du laser est de 25  $\mu\text{m}$ , ce qui équivaut à enregistrer 400 points par centimètre [75]. Cette résolution est très importante lorsque l'on travaille avec des microparticules de 2  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il est aussi possible de définir la profondeur ainsi que l'épaisseur de la zone focale du laser permettant ainsi l'utilisation de différents types de supports tels que des gels, des lames, des blots ou encore des membranes. Les paramètres importants à régler lors d'une acquisition sont les longueurs d'ondes d'émission/excitation, la résolution spatiale, la distance focale, la sélection de la région d'intérêt et l'intensité d'acquisition (le PMT voltage). Ce dernier paramètre représente le gain de l'intensité lumineuse enregistrée et doit être réglé de manière empirique. Il faut toujours s'assurer que le signal soit linéaire. Si le PMT est trop élevé, il y aura saturation, et s'il est trop faible, il y aura une perte en précision. Dans le cadre de ce projet, et pour l'utilisation des membranes SAM<sup>2</sup>, le PMT a été réglé empiriquement à 430 volts.

Le Typhoon PhosphorImager est accompagné d'un logiciel de quantification, l'ImageQuant V.2005. Ce logiciel, très simple d'utilisation, comprend plusieurs palettes d'outils permettant d'effectuer différents types de quantification [76]. C'est l'outil compteur de colonies (colony count) qui est le plus adéquat pour cette étude. Chaque colonie représente un ensemble de microparticules fluorescentes détectées sur la membrane SAM<sup>2</sup> sur une région équivalent à la résolution spatiale définie c'est-à-dire 25  $\mu\text{m}$ . Sur l'interface d'utilisation (Figure 5.14), il y a plusieurs paramètres à régler : le niveau de détection, la

sélection de la région d'intérêt et la soustraction du bruit de fond. La quantification se fait automatiquement par le logiciel à chaque mise à jour de l'un de ces paramètres.



**Figure 4.14 - Interface de l'outil *compteur de colonies* permettant de quantifier le nombre de microparticules présentes sur la membrane. Les paramètres importants à régler sont : la sensibilité, la taille de l'opérateur et la région d'intérêt. Le résultat affiche toutes les colonies repérées accompagnées de paramètres tels que la position de la colonie sur la membrane, l'intensité moyenne, la taille,...etc. Chaque point rose représente une microparticule comptée.**

C'est le niveau de détection qui est le paramètre le plus important. Ce dernier est calibré à l'aide de deux paramètres qui sont la sensibilité et la taille de l'opérateur. La taille de l'opérateur représente un indice proportionnel à la taille des colonies à détecter. De ce fait, plus la taille de l'opérateur est faible plus la taille des colonies à détecter sera petite. Dans cette étude, la taille de l'opérateur est réglée de manière empirique sur la valeur sept (cinq étant la plus petite taille). La sensibilité de la détection est automatiquement réglée sur une valeur initiale par le logiciel en fonction de l'intensité de la zone de travail. Le tableau 5 récapitule tous les paramètres à régler.

Tableau 5 – Récapitulatif des paramètres à régler sur le Typhoon PhosporImager

Paramètre	Valeur
<b>Mode d'acquisition</b>	Fluorescence
<b>Résolution spatiale du laser (pixel size)</b>	25 $\mu\text{m}$
<b>Plan focale (focal plane)</b>	Platern + press sample
<b>Laser</b>	Bleu (488 nm)
<b>Sensibilité</b>	Normal
<b>Intensité d'acquisition (PMT voltage)</b>	430 volts

## 5.2. Méthodologie

### 5.2.2. Préparation des échantillons sanguins

Le sang de porc est facilement accessible et ses propriétés rhéologiques se rapprochent de celles du sang humain [77]. On utilise donc du sang de porc frais récupéré d'un abattoir local et anti-coagulé avec 3 g/l d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA ACS reagent, 99.4-100.66%, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Les plaquettes et les globules blancs sont ensuite retirés après une première centrifugation à 2500 rpm pendant 15 minutes.

Nous avons vu que le niveau d'agrégation érythrocytaire était modulé par trois paramètres rhéologiques : 1) Le taux de cisaillement local, 2) l'hématocrite et enfin 3) l'agrégabilité des érythrocytes (i.e. non agrégeant, agrégeant et hyper agrégeant).

Le protocole expérimental se divisera en deux parties. La première partie consistera à faire varier l'hématocrite ainsi que l'agrégabilité des érythrocytes à un taux de cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$  et la deuxième partie consistera à faire varier l'agrégabilité des érythrocytes fixés à un hématocrite de 40% et à un taux de cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$ .

Le tableau 6 et 7 énumère tous les échantillons sanguins utilisés pour le premier et le deuxième protocole respectivement. La lettre H est le symbole employé pour définir les échantillons sanguins non agrégeant, T est le symbole qui représente les échantillons agrégeants et T\_D512 est le symbole utilisé pour définir le type de sang hyper agrégeant. Le

sang hyper agrégeant est obtenu en remplaçant le plasma par une solution saline de dextran au poids moléculaire élevé. De la poudre de dextran D512 (lot 124H055, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) est dissoute dans 100 ml de solution saline à une concentration de 3 g/L [78]. Les échantillons non agrégeants s'obtiennent en remplaçant le plasma par une solution saline.

**Tableau 6 - Récapitulatif des échantillons sanguins utilisés lors du premier protocole expérimental c'est-à-dire faire varier l'hématocrite ainsi que l'agrégabilité des érythrocytes à un taux de cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ .**

Nom	Hématocrite	Suspension	Agrégabilité des érythrocytes	Nombre d'échantillons	Volume (ml)	Cisaillement ( $\text{s}^{-1}$ )
H40	40%	Saline	Non agrégeant	1	70	2
H20	20%	Saline	Non agrégeant	1	70	2
H60	60%	Saline	Non agrégeant	1	70	2
T40	40%	Plasma	Agrégeant	1	70	2
T20	20%	Plasma	Agrégeant	1	70	2
T60	60%	Plasma	Agrégeant	1	70	2
T40D512	40%	Dextran	Hyper agrégeant	1	70	2
T20D512	20%	Dextran	Hyper agrégeant	1	70	2
T60D512	60%	Dextran	Hyper agrégeant	1	70	2

**Tableau 7 – Récapitulatif des échantillons sanguins utilisés lors du deuxième protocole expérimental c'est-à-dire faire varier l'agrégabilité des érythrocytes fixés à un hématocrite de 40% et à un taux de cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$ .**

Nom	Hématocrite	Suspension	Agrégabilité des érythrocytes	Nombre d'échantillons	Volume (ml)	Cisaillement ( $\text{s}^{-1}$ )
H40	40%	Saline	Non-agrégeant	1	70	10
T40	40%	Plasma	agrégeant	1	70	10
T40D512	40%	Dextran	Hyper agrégeant	1	70	10

Trois échantillons à hématocrite différents ont été préparés pour chaque niveau d'agrégabilité des érythrocytes. Le premier échantillon possède un hématocrite à 40%, représentant une concentration physiologique en globules rouges. Les deuxième et troisième échantillons de chaque type de sang ont été ajustés à un hématocrite de 20% et 60%

respectivement. Les échantillons à 20% d'hématocrite permettront de modéliser un sang pauvre en globules rouges (anémie très sévère), alors que les échantillons à 60% d'hématocrite modéliseront du sang riche en globules rouges (polycythémie sévère).

Comme chaque mesure a été répétée pour deux cisaillements différents ( $2 \text{ s}^{-1}$  et  $10 \text{ s}^{-1}$ ), deux échantillons ont été préparés pour chaque niveau d'agrégabilité des érythrocytes et pour chaque hématocrite.

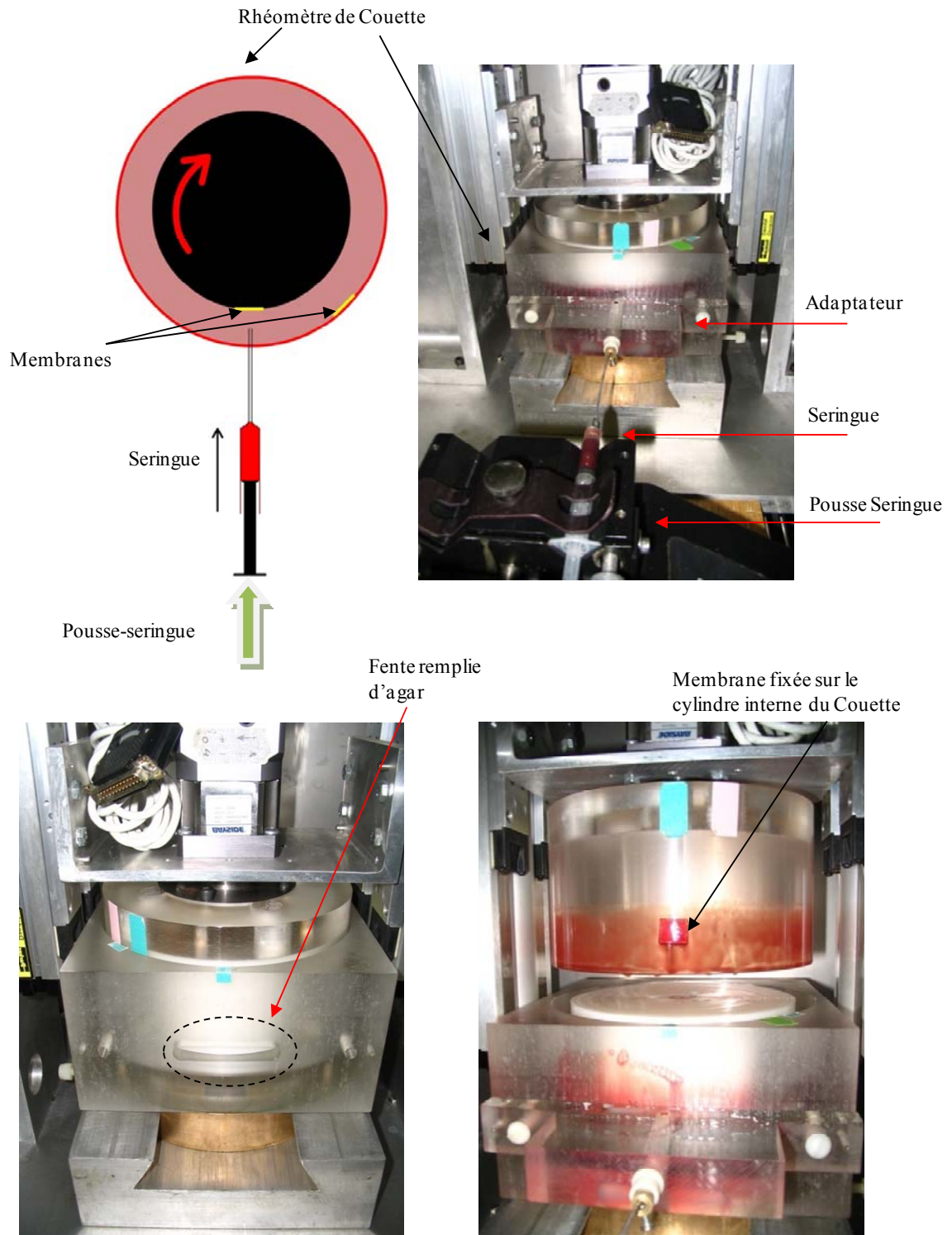
Des échantillons de contrôle de 70 ml ont aussi été préparés. L'un est juste composé de saline et l'autre d'un mélange saline + dextran. Ces échantillons serviront de milieu de référence. L'échantillon juste composé de saline simulera un échantillon à 0% d'hématocrite (sans globules rouges). Comme il n'y a pas de globules rouges (ou autres particules) présents dans la solution saline, les microparticules devraient être distribuées de façon homogène dans tout l'entrefer du rhéomètre. De ce fait, très peu de microparticules devraient migrer sur les bords du rhéomètre et se fixer sur les membranes SAM<sup>2</sup>. Le dextran au poids moléculaire de 512M est composé de macromolécules qui pourraient influencer l'effet migratoire des microparticules. De ce fait, l'échantillon composé de saline + dextran va nous permettre de vérifier si le dextran en suspension, sans la présence de globules rouges, a un effet sur la migration des microparticules.

Les protocoles de lavage ainsi que les mesures et ajustements d'hématocrite sont disponibles à l'annexe B.

### 5.2.3. Protocole de mesure

Toutes les expériences ont été réalisées dans les 48 h suivant la récupération du sang à l'abattoir. La figure 5.15 présente le montage expérimental complet. Ce dernier est constitué du rhéomètre de Couette, d'une seringue (3 CC BD), d'une aiguille de 7 cm (Popper laboratory pipetting needle, Fisher Scientific) et d'un pousse-seringue (PHD 2000, Harvard apparatus).





**Figure 4.15 - Montage expérimental constitué du rhéomètre de Couette, d'une seringue et d'un pousse-seringue. La rotation du rhéomètre se fait dans le sens des aiguilles d'une montre. L'aiguille de la seringue est insérée au centre de l'entrefer du rhéomètre au travers de la fente via un adaptateur.**

Un volume de 1 ml de l'échantillon sanguin à étudier, mélangé avec 300  $\mu\text{l}$  de solution de microparticules est injecté par la seringue. La quantité de microparticules injectées dans le sang se situant dans le rhéomètre de Couette peut se calculer ainsi:

300  $\mu\text{l}$  de solution de microparticules à 1% solide  $\Rightarrow$  3  $\mu\text{l}$  de microparticules.

$$\text{Le volume d'une microparticule} = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3}\pi(2e^{-6})^3 \approx 3.35e^{-17} m^3,$$

ce qui implique que dans 3  $\mu\text{l}$  il y a :  $3e^{-6} / 3.35e^{-17} = 9e^{10}$  microparticules.

Dans la circulation sanguine, il y a entre 150-400 mille plaquettes/ $\mu\text{l}$  soit entre  $1e^{10}$ - $3e^{10}$  plaquettes/70 ml (volume de nos échantillons à étudier). On peut donc faire l'hypothèse que la concentration des microparticules utilisée lors de nos expériences est similaire à la concentration des plaquettes dans le sang.

De plus, le fait de n'utiliser que 3  $\mu\text{l}$  de microparticules par expérience assure la linéarité de la quantification de l'intensité lumineuse sur chaque membrane (Section 5.1.5).

Il est important de désagréger les microparticules avant chaque mesure expérimentale car ceci peut apporter d'importantes erreurs expérimentales (Section 7.1). La dissociation des microparticules peut se faire à l'aide d'un vortex ou d'un rotor. Le volume de solution de microparticules à injecter (c'est-à-dire 300  $\mu\text{l}$ ) a été établi de façon empirique. En commençant à 25  $\mu\text{l}$ , et en incrémentant de 25  $\mu\text{l}$  à chaque nouvel essai, le volume final de solution de microparticules a été déterminé en fonction de l'intensité de fluorescence perçue tout en respectant la zone de linéarité.

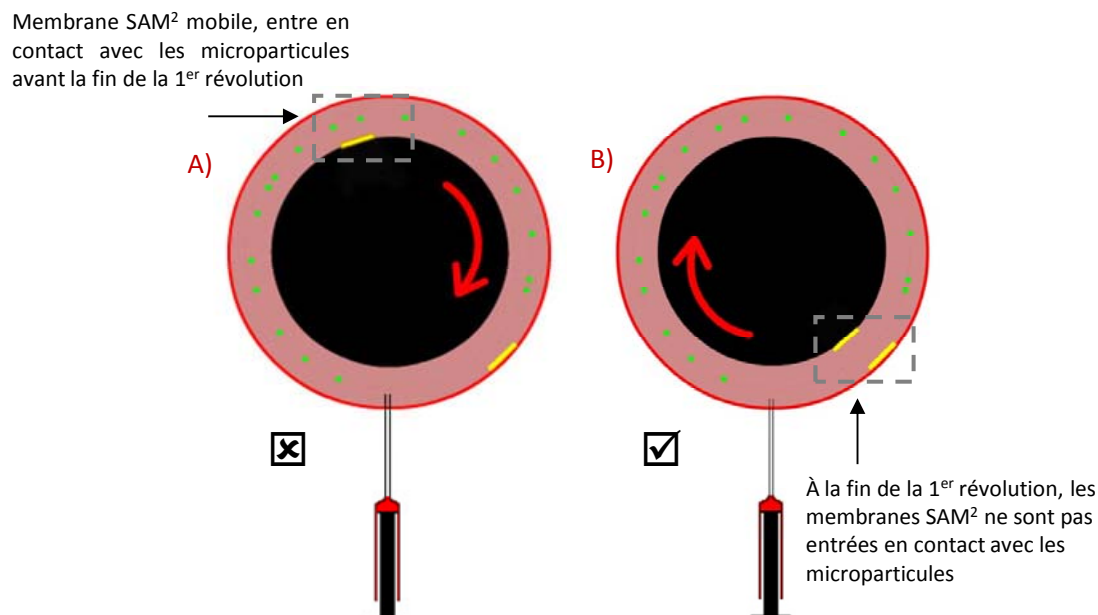
Le rhéomètre de Couette possède une fente sur sa paroi externe (Figure 5.15). Un gel d'agar (lot A9799, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) est utilisé pour combler cette fente (2 g d'agar et 8 ml de glycérol pour 100 ml d'eau) et permettre d'insérer dans l'entrefer du Couette, de façon hermétique, l'aiguille de la seringue. Il faut s'assurer que l'embout de l'aiguille soit positionné de façon à ce que les microparticules soient larguées au centre de l'entrefer. En utilisant des gants et à l'aide d'un pinceau, l'envers des deux membranes SAM<sup>2</sup> est badigeonné d'un adhésif en spray commercial (Nashua covalent adhesives 357) et ensuite collé sur les parois interne du cylindre externe et interne du Couette. L'adhésif, ayant comme

solvant un alcool, ne diffuse pas au travers de la membrane et, de ce fait, n'affecte pas les sites de streptavidine. De plus, une petite quantité d'adhésif suffit pour fixer les membranes temporairement. Sur le cylindre externe, la membrane est collée à droite de la seringue. Sur le cylindre interne, la membrane est fixée en face de la seringue. Le choix de ces deux positions est expliqué plus loin. Les deux membranes sont collées à une hauteur de 3-3.5 cm par rapport à la base du rhéomètre. La quantification de la migration axiale des microparticules se fait en fonction du nombre de tours. En tout, le rhéomètre de Couette effectuera trois révolutions (peu importe le taux de cisaillement). Le premier tour servira à l'injection complète du mélange sang+solution de microparticules dans l'entrefer. Il est donc important de s'assurer que tout le mélange ait été injecté dans l'entrefer avant la fin de la première révolution du rhéomètre. Le débit d'éjection du mélange dans l'entrefer est contrôlé à l'aide d'un pousse-seringue. Pour un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ , le débit d'éjection du mélange est de 0.6 ml/min et pour un cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$ , le débit d'éjection est de 3 ml/min<sup>5</sup>. La quantification de la migration des particules se fera lors des deux révolutions suivantes. Il est crucial que le départ de l'injection du mélange se fasse une fois que la membrane SAM<sup>2</sup> fixée sur le cylindre mobile, soit à gauche de la seringue (la rotation du Couette se fait dans le sens des aiguilles d'une montre). Ceci assure que les microparticules injectées dans l'entrefer n'entrent pas en contact avec la membrane SAM<sup>2</sup> mobile avant la fin de la première révolution. La figure 5.16.A montre une mauvaise synchronisation de l'injection du mélange. Dans ce cas si, les microparticules entrent en contact avec la membrane mobile avant la fin de la première révolution du Couette et avant la deuxième membrane. La quantification est alors erronée car la distribution des particules dans le Couette n'est pas homogène et l'adhésion des particules aux membranes ne se fait pas au même instant.

La figure 5.16.B montre une bonne synchronisation de l'injection du mélange. Dans ce cas-ci, les microparticules suivent la membrane mobile sans l'affecter jusqu'à la fin de la première révolution. Au bout d'un tour complet, les microparticules sont intégralement injectées et sont distribuées de façon homogène dans tout l'entrefer du Couette. D'autre part, l'adhésion des microparticules sur les deux membranes commence en même temps.

---

<sup>5</sup> Les débits d'injection ont été déterminés empiriquement.



**Figure 4.16 - A. Mauvaise et B. bonne synchronisation de l'injection du mélange de microparticules par rapport aux positions des membranes fixe et mobile.**

A la fin de la première révolution du Couette, une fois que le mélange a été complètement injecté, l'aiguille est retirée de l'entrefer. Au bout de deux révolutions, le moteur pas-à-pas est stoppé. Une fois les expériences terminées, les microparticules ne doivent plus venir s'adhérer aux membranes SAM<sup>2</sup>. Le cylindre interne du Couette est donc aussitôt remonté afin que le niveau de sang dans l'entrefer tombe en dessous des membranes.

En moyenne, pour chaque échantillon (où l'hématocrite et le niveau d'agrégation sont variés) et chaque cisaillement, cinq séries expérimentales ont été réalisées (i.e. cinq porcs différents) afin d'obtenir une moyenne et un écart-type. Cependant, nous verrons par la suite qu'à cause de problèmes expérimentaux (Section 7.1), certains échantillons auront plus, ou moins, de séries expérimentales (certains échantillons auront jusqu'à 11 mesures, soit 11 porcs différents, alors que d'autres n'en auront que quatre).

Un protocole détaillé est disponible à l'annexe B.

#### 5.2.4. Contrôle du moteur pas-à-pas et du pousse-seringue

Une fonction développée sous le logiciel matlab 7.0.4 (2005 Mathworks, Inc) a été utilisée pour contrôler le moteur pas-à-pas. Ce programme définit la vitesse angulaire correspondante au cisaillement désiré lors de l'étude (Équation 15) et contrôle aussi le temps de rotation et le nombre de révolutions que devra effectuer le Couette. Avant de commencer à injecter les microparticules dans l'entrefer, il est important de s'assurer que l'échantillon sanguin soit complètement désagrégé afin d'avoir la même référence peu importe le type de sang agrégeant ou non. Initialement, le Couette va donc tourner pendant 30 secondes à un cisaillement de  $500 \text{ s}^{-1}$  afin de brasser l'échantillon sanguin. A la fin de ces 30 secondes, le Couette repartira à la vitesse de cisaillement désiré ( $2 \text{ s}^{-1}$  et  $10 \text{ s}^{-1}$ ). Il faut ensuite laisser le temps à l'échantillon d'atteindre son niveau d'agrégation maximal. Au bout de 70 secondes, la cinétique d'agrégation aura atteint son plateau et c'est alors que l'injection des microparticules dans l'entrefer doit se faire. Le Couette s'arrête automatiquement une fois l'expérience terminée.

En ce qui concerne le pousse-seringue, le départ de l'injection a été contrôlé manuellement. Lorsque les 30 secondes de brassage suivi des 70 secondes consacrées à la cinétique de formation de rouleaux sont terminées, l'utilisateur enclenche le départ de l'injection de la seringue.

#### 5.2.5. Lavage des membranes

Une fois les mesures expérimentales achevées, les membranes sont décollées à l'aide d'un forceps (Dumont 5 standard tip, Dumont Swissmade) et aussitôt insérées dans un produit de rinçage. Un protocole de lavage est nécessaire pour enlever toutes les molécules indésirables qui sont restées collées sur les membranes de manière non-spécifique. Le protocole suivant a été pris de Schaefer et Guimond. [67]:

Sur une plateforme oscillante (Gyrotory shaker-model G2, New Brunswick Scientific Co., USA), chaque membrane a été nettoyée pendant 30 sec avec 200 ml de 2M NaCl, 3 x 2 min avec 200 ml de 2M NaCl, 4 x 2 min avec 200 ml de 2M NaCl avec 1% (poids moléculaire)

de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 x 30 sec avec 100 ml d'eau bi distillée et enfin 10 sec avec 95% d'éthanol (cette dernière étape accélère le temps de séchage de la membrane et n'est pas obligatoire). Ce protocole de lavage dure vingt minutes. Une fois les membranes lavées et séchées, elles doivent être conservées à une température située entre 2 et 8°C [71]. La préparation des produits utilisés pour ce lavage doit se faire sous une hotte chimique. Un volume d'un litre pour chaque produit a été préparé pour s'assurer d'une quantité suffisante.

En ce qui concerne le chlorure de sodium (NaCl 8B6796, Bioshop Canada Inc), le dosage a été calculé de la façon suivante :

$$1M = 1 \text{ mole/L} = 58.5 \text{ g/mol} \Leftrightarrow 2M = 2 \text{ mole/L} = 2 \times 58.5 \text{ g/mole} = 117 \text{ g/L.}$$

Pour obtenir deux litres de ce produit, il faut mélanger 234 g de poudre de NaCl dans deux litres d'eau distillée. Un litre de cette solution est utilisé comme solution NaCl, et l'autre litre sert à la préparation du deuxième produit nécessaire au lavage.

En ce qui concerne la préparation du chlorure de sodium à 1% d'acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ≥ 85 WT% solution in water reagent, 438001-500 ml, Sigma-Aldrich, USA), la recette suivante a été utilisée :

Pour un litre de NaCl, il faut ajouter 11.7 ml (≈ 12 ml) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Ce volume a été calculé en utilisant une loi de base de la chimie analytique :  $C_{initial} \cdot V_{initial} = C_{final} \cdot V_{final}$  (i.e. la quantité de matière ne change pas lors d'une dilution) où  $C$  est la concentration et  $V$  le volume.

#### 5.2.6. Post-traitement des membranes

La prochaine étape du protocole est d'imager les membranes. Celles-ci ont tout d'abord été scannées en utilisant le Typhoon PhosphorImager. Ensuite, en utilisant le microscope Zeiss, une première quantification des microparticules s'est faite à l'œil. Si la quantité de microparticules est faible (< 200), alors l'utilisateur est en mesure de toutes les compter visuellement. Si la quantité de microparticules est trop élevée, alors l'utilisateur ne pourra avoir qu'une idée approximative du nombre de microparticules présentes sur chaque membrane. Dans les deux cas, cette quantification sera vérifiée et confirmée par la suite en

utilisant le logiciel de quantification automatique ImageQuant 2005. C'est cette dernière mesure qui sera utilisée pour quantifier le niveau de migration des particules.

### **5.3. Analyse statistique**

L'analyse statistique a pour but de déterminer si un ou plusieurs facteurs ont un effet significatif sur une variable dépendante.

Dans le cas de cette étude par exemple, est-ce que l'hématocrite a un effet sur la migration des microparticules ?

L'hématocrite est le facteur, et le nombre de particules comptées est la variable dépendante. L'analyse statistique va alors comparer les trois groupes correspondant aux différents taux d'hématocrite (20%, 40% et 60%). L'hypothèse de base est qu'il n'y a pas de différence entre les groupes (hypothèse nulle). Si l'hypothèse est rejetée alors il y a une différence statistique entre les groupes. Cela signifie que l'hématocrite a un effet sur la migration des microparticules. Si l'hypothèse ne peut être rejetée cela implique qu'aucune différence ne peut être démontrée. Dans ce cas, l'hématocrite n'a pas d'effet significatif sur la migration des microparticules.

Il existe plusieurs tests différents qui permettent de tester cette hypothèse nulle. Le choix de l'analyse à utiliser dépend de la distribution des mesures (paramétrique ou non-paramétrique). Les tests paramétriques peuvent être utilisés lorsque les données proviennent d'une population dont la distribution obéit à une fonction de densité de probabilité connue (ex : loi normale). Dans cette étude, les résultats obtenus ne sont pas distribués normalement. Dans certains cas, il est possible d'appliquer une transformation mathématique afin de normaliser la distribution (ex : logarithme, exponentielle). Cependant, lorsque cette dernière tentative échoue, il faut alors utiliser un test non-paramétrique.

Tous les tests statistiques ont été réalisés avec Sigmastats (2004 Systat software, Inc). Deux tests statistiques ont été utilisés : Analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs et test de Tukey (Siegel-Tukey).

L'ANOVA est utilisée lorsqu'une seule variable continue est mesurée dans différents groupes homogènes, soumis à différentes circonstances (hématocrite, cisaillement et type de sang), et que l'on veut déterminer si ces circonstances affectent cette variable.

Deux hypothèses doivent être respectées : 1) La variable est distribuée normalement à l'intérieur de chaque groupe et 2) La variance est la même dans les différents groupes.

L'ANOVA à plusieurs variables permet de vérifier l'influence de deux facteurs sur une variable dépendante mais aussi de tester l'interaction entre ces deux facteurs, c'est-à-dire l'influence du niveau d'un facteur sur l'effet de l'autre facteur sur la variable dépendante. Pour cela, le test va vérifier si l'hypothèse selon laquelle les moyennes des différentes distributions normales sont identiques est vraie. L'analyse de la variance permet en fait de comparer des moyennes de différents groupes et de dire si, parmi l'ensemble, au moins une d'entre elles diffère des autres. Cependant, il n'est pas possible de déterminer laquelle ni combien d'entre elles. L'ANOVA à plusieurs variables est donc une analyse d'ensemble. Une fois l'analyse ANOVA réalisée, il est possible de déterminer quel groupe a un effet différentiel, c'est-à-dire quel groupe présente une moyenne de la variable étudiée différente des autres. Ces tests associés à l'ANOVA sont dits 'tests de comparaison multiples' (multiple comparison tests). Pour cela, le test de Tukey a été effectué. C'est un test de comparaison de K échantillons indépendants.

Dans ce projet, quatre facteurs sont étudiés : L'agrégabilité érythrocytaire, l'hématocrite, le cisaillement et le côté des parois du rhéomètre.

Les analyses statistiques permettront de vérifier s'il y a :

- 1) Un effet dépendant de l'agrégabilité érythrocytaire sur la migration des microparticules.
- 2) Un effet dépendant de l'hématocrite sur la migration des microparticules.
- 3) Un effet dépendant du cisaillement sur la migration des microparticules.
- 4) Un effet d'interaction entre l'hématocrite et l'agrégabilité.
- 5) Un effet d'interaction entre l'hématocrite et cisaillement.



6) Un effet d'interaction entre le cisaillement et l'agrégabilité.

7) Un effet dépendant des parois du rhéomètre (fixe et mobile) sur la migration des microparticules.

Ceci implique qu'une ANOVA à 3 variables accompagnée d'un test de Tukey devra être considérée pour les deux protocoles expérimentaux décrits à l'annexe B.

## CHAPITRE 5 : RÉSULTATS

Ce chapitre se divise en deux sections. La première partie présente les images des membranes, observées au microscope et avec le Typhoon PhosphorImager, ainsi que les différentes étapes d'analyse et de détection des microparticules. La deuxième partie présente les résultats obtenus lors des deux protocoles expérimentaux ainsi que les valeurs de contrôle. Les figures ont été illustrées avec Sigmaplot 9.0 (2004 Systat Software, Inc) et Matlab 7.0.4 (2005 Mathworks, Inc).

### 6.1. Méthodes d'imagerie des membranes

#### 6.1.1. Contrôle des membranes et des microparticules

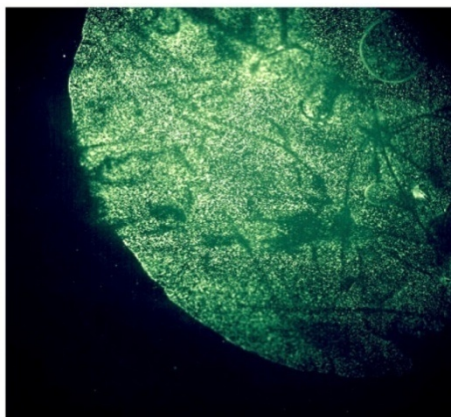
Afin de contrôler la qualité des produits sélectionnés et vérifier que le système biotine/streptavidine fonctionne, 25  $\mu\text{l}$  de solution de microparticules ont été déposés, à l'aide d'une micropipette, directement sur une membrane SAM<sup>2</sup>. La figure 6.1 représente la membrane visualisée à l'aide du microscope Zeiss. L'acquisition de cette image a été faite avec une caméra numérique (1M150 Dalsa) directement branchée sur le microscope. Une lentille de 10X a été utilisée lors de l'acquisition. Cette caméra, rapide et à haute résolution, génère des images de 1024x1024 sur 8 bits. Calibré avec une lame micrométrique, à une résolution de 10X, la taille d'un pixel fait 1.677  $\mu\text{m}$ .

La surface totale de l'image qui est visible à une résolution de 10X peut alors se mesurer :

$$(1024 \times 1.677e^{-6}) \times (1024 \times 1.677e^{-6}) = 2.948e^{-6} \mu\text{m}^2 = 0.3 \text{ cm}^2.$$

Une membrane fait 1.3x1.3  $\text{cm}^2$  en surface, ce qui implique que l'image enregistrée, à une résolution de 10X, représente 18% de la surface de la membrane. Un échantillonnage visuel spatial était donc nécessaire pour cette étape d'analyse qualitative. Il est facile de visualiser sur l'image la forme de la goutte de la solution de microparticules déposée sur la membrane.

Dans ce cas-ci cependant, il y a saturation en intensité. La quantité de microparticules est trop importante pour que la quantification soit possible.

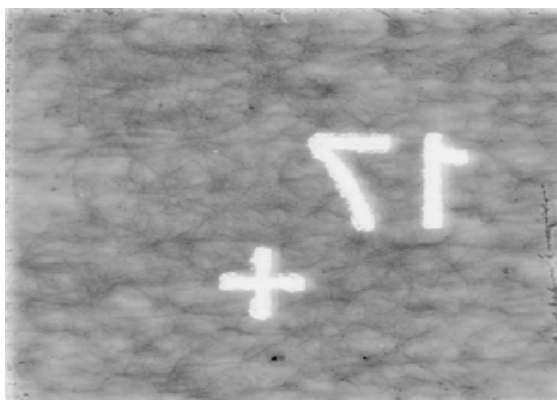


**Figure 5.1 - Visualisation de microparticules fluorescentes fixées sur la membrane SAM2 au travers d'une caméra numérique branchée sur le microscope Zeiss.**

Néanmoins, ce contrôle permet simplement de confirmer la forte affinité qui existe entre les microparticules et la membrane SAM<sup>2</sup>. Il est important de noter que cette image a été prise 24 h après le lavage des membranes.

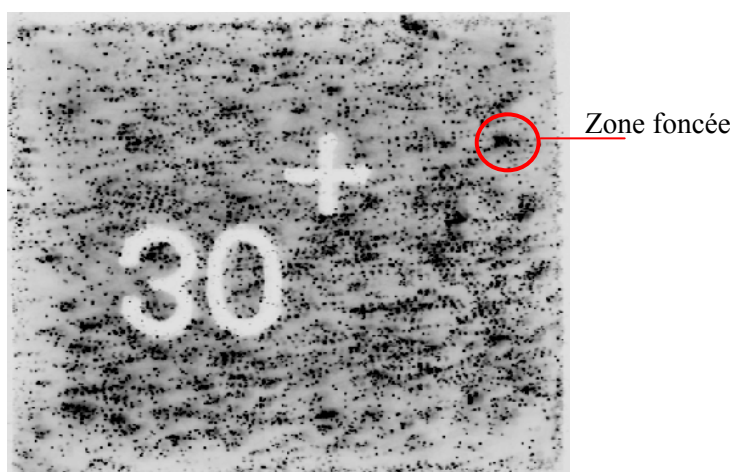
#### 6.1.2. Contrôle qualité du Typhoon PhosphorImager

La membrane 17 (Figure 6.2) est maintenue vierge et sera utilisée comme moyen de référence. Aucune microparticule n'a été déposée dessus. Lorsque la membrane est scannée par le Typhoon PhosphorImager, aucune microparticule ne peut être détectée. Il est aussi intéressant de signaler que les numéros inscrits sur chaque membrane restent visibles sur l'image scannée. Cette caractéristique est très utile pour différencier les membranes entre elles.



**Figure 5.2 - Membrane de référence scannée avec le Typhoon PhosphorImager. Aucune microparticule n'est détectée sur cette membrane.**

La membrane 30 (Figure 6.3) représente une membrane scannée après avoir été utilisée et lavée. Chaque point noir représente une microparticule.

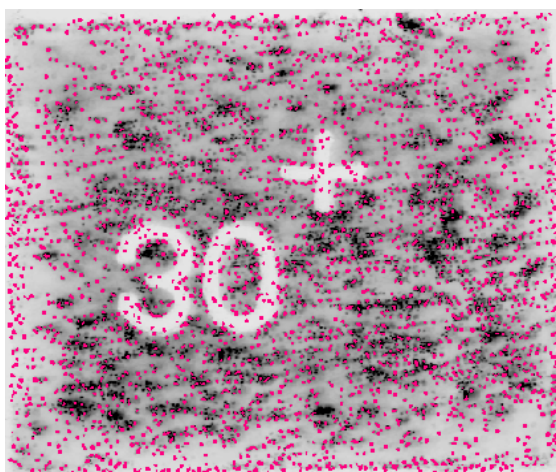


**Figure 5.3 - Membrane scannée par le Typhoon PhosphorImager. La membrane a été utilisée pour du sang hyper agrégant à 40% d'hématocrite et à un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ .**

Les zones foncées visibles à certains endroits de la membrane de la figure 6.3 représentent des régions contrastées. ImageQuant n'utilise pas un format d'image standard pour quantifier les microparticules mais un format particulier (.gel). Cependant, pour que l'utilisateur puisse visualiser le résultat, le logiciel va superposer la lumière fluorescente enregistrée, à une lumière blanche afin de convertir le scan en un format d'image intelligible (.jpg ou .bmp). Ces régions de contrastes sont en fait provoquées par des variations du niveau de gris présent dans l'image. Cependant, bien que l'œil humain puisse avoir certaine difficulté à différencier

une microparticule d'une zone foncée, le logiciel de quantification, quant à lui, ne perçoit pas de contraste.

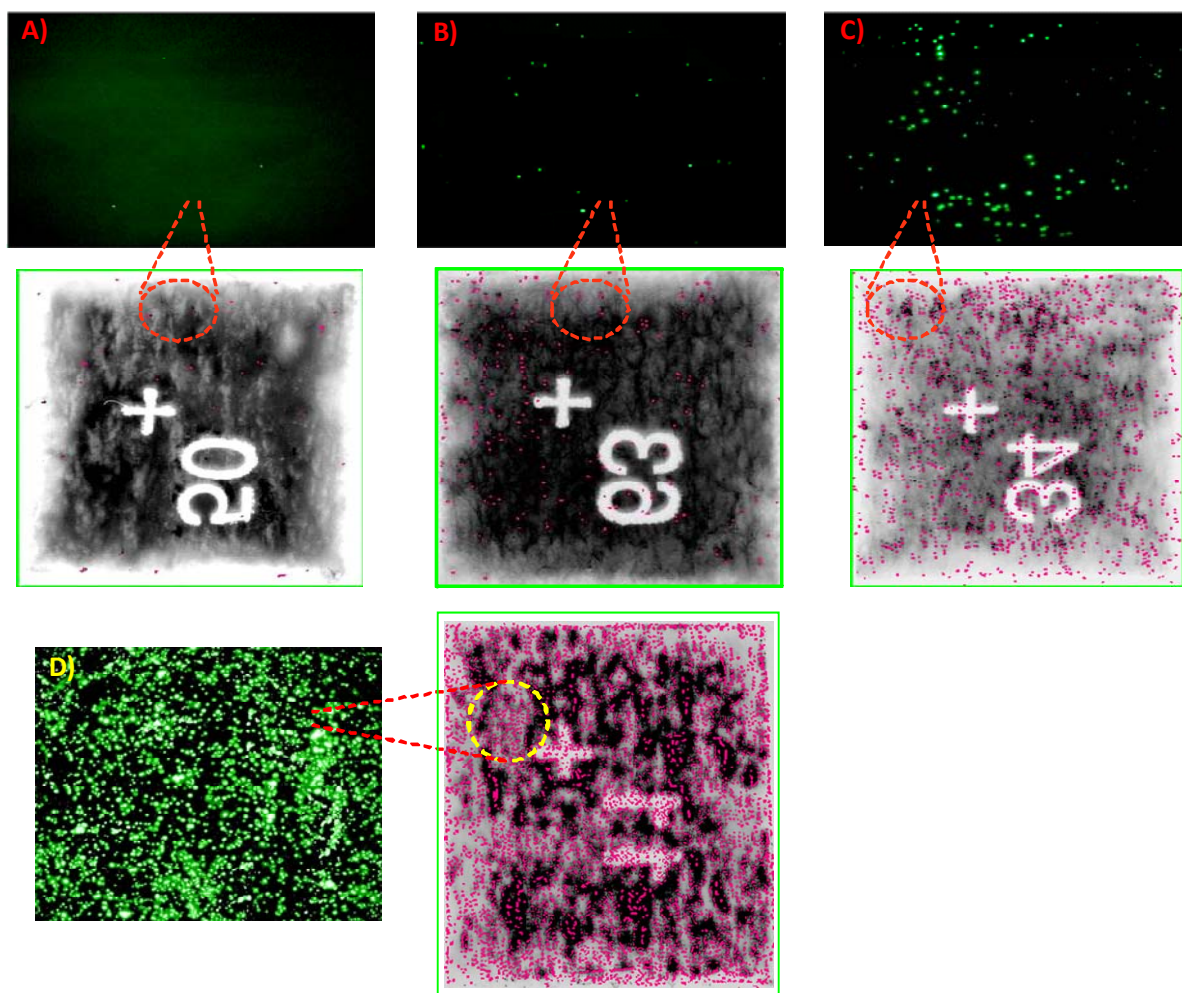
La figure 6.4 représente la membrane 30 quantifiée par le logiciel ImageQuant. Chaque microparticule détectée est marquée d'un point de couleur rose. Sur la membrane scannée (Figure 6.3), très peu de microparticules pouvaient être perçues sur les chiffres. Cependant, le logiciel, qui n'utilise que la lumière fluorescente, en a détecté un certain nombre. De plus, des microparticules ont aussi été détectées sur les zones foncées.



**Figure 5.4 - Membrane quantifiée automatiquement par le logiciel ImageQuant 2005. 1391 microparticules ont été détectées sur cette membrane.**

### 6.1.3. Comparaison entre les images obtenues du microscope Zeiss et du Typhoon PhosphorImager

Au bout d'un certain nombre de membranes quantifiées, quatre grands niveaux de quantification peuvent se distinguer : une quantification faible où le nombre de microparticules est négligeable (200 microparticules maximums sur toute la membrane) (Figure 6.5.a), une quantification moyenne où le nombre de microparticules varie entre 200 et 1000 (Figure 6.5.b), une quantification élevée (> 1000 microparticules sur toute la membrane) (Figure 6.5.c) et enfin une quantification très élevée à la limite de saturation (> 2000 microparticules sur toute la membrane) (Figure 6.5.d).



**Figure 5.5 - Comparaisons entre les images obtenues du microscope Zeiss et du Typhoon PhosphorImager. A- Quantification faible de microparticules (0-200 particules sur toute la membrane) B- Quantification moyenne de microparticules (200-1000 particules sur toute la membrane) C- Quantification élevée de microparticules (> 1000 particules) D- Quantification très élevée de microparticules (> 2000 particules sur toute la membrane). Le nombre exact de microparticules comptés sur chaque membrane est disponible au tableau 8.**

Lorsque le nombre de microparticules fixées sur la membrane est faible ou moyen (< 300 particules), il est facile pour l'utilisateur de les compter à l'œil. Dans ce cas-ci, il est alors possible de confirmer si la quantification faite par le PhosphorImager correspond à celle faite par le microscope. Cette méthode de contrôle est un moyen simple de vérifier la sensibilité du PhosphorImager. Le tableau 8 récapitule le nombre de microparticules comptées à l'œil et de façon automatique. Les valeurs de chaque quantification représentent le nombre total de microparticules comptés sur chaque membrane. Les deux méthodes donnent des résultats très similaires. Le comptage à l'œil se fait de façon intuitive en comptant le nombre de points fluorescents présents sur toute la membrane, ce qui est approximatif. L'intensité de

fluorescence n'est pas identique pour chaque microparticule. Certaines auront une très forte intensité alors que d'autres seront difficilement perçues à l'œil. De ce fait, il est normal que le PhosphorImager, qui détecte tous les niveaux d'intensité de fluorescence, compte plus de microparticules que l'œil humain.

**Tableau 8- Exemple de comparaison entre le nombre de microparticules comptées sur toute la membrane à l'œil en utilisant le microscope Zeiss et comptées automatiquement avec le Typhoon PhosphorImager.**

Membranes	Quantification à l'œil	Quantification automatique
50	20	28
63	200	220
34	NA	1269
11	NA	2979

## 6.2. Résultats concernant la migration de particules

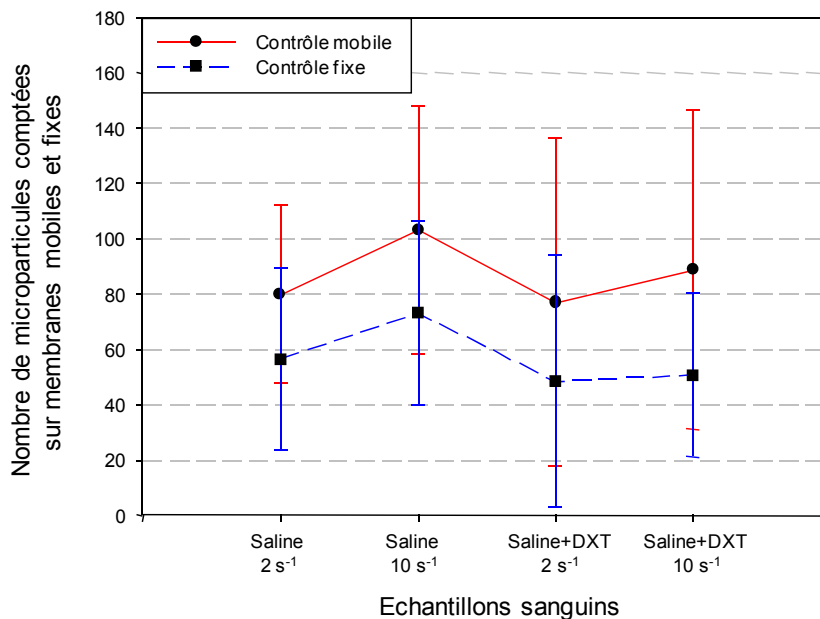
La partie portant sur les résultats expérimentaux se divise en 3 sections. La première section énoncera les résultats obtenus pour valider la méthode expérimentale. Ce sont les résultats contrôles. Les sections 2 et 3 exposeront les résultats obtenus pour chaque protocole de mesure. Chaque section illustrera les résultats sous forme de figure (moyenne et écart-type) et sera accompagnée d'une analyse statistique ANOVA à trois variables ainsi que d'un test de Tukey. Le nombre de microparticules comptées sur chaque membrane individuellement est disponible à l'annexe C.

Certains résultats ont moins de séries expérimentales que d'autres. Ceci est dû au fait que certaines expériences n'ont pas fonctionné correctement (Section 7.2) et ont été retirées.

### 6.2.1. Validation expérimentale

La figure 6.6 illustre le nombre de microparticules capturées par les membranes SAM<sup>2</sup>, fixe et mobile, dans une solution saline et une solution saline + dextran en fonction du cisaillement ( $2 \text{ s}^{-1}$  et  $10 \text{ s}^{-1}$ ). Une solution de dextran est utilisée ici pour voir si une augmentation de viscosité du milieu suspendant peut affecter la migration de particules en absence de globules rouges. Ces échantillons représentent les groupes contrôles et ces tests

permettent de valider la méthode utilisée. Nous pouvons voir sur la figure, que le nombre de microparticules moyen compté sur les membranes mobiles et fixes varie entre 50 et 100.



**Figure 5.6 - Résultats obtenus avec une solution saline et une solution saline + dextran à un cisaillement de 2 s<sup>-1</sup> et de 10 s<sup>-1</sup> sur les membranes mobiles et fixe.**

Résultats de l'analyse ANOVA3 :

- Il n'y a pas de différence significative entre les résultats de la suspension saline et de la suspension saline + dextran ( $P=0.381$ )
- Il n'y a pas d'effet significatif du cisaillement sur le nombre de particules comptées ( $P=0,892$ ).
- Il y a cependant une différence significative entre les résultats obtenus sur la paroi fixe et la paroi mobile ( $P=0.033$ ). Plus de microparticules ont été comptées sur la paroi mobile.
- Il n'y a aucun effet significatif de l'interaction entre les trois variables ( $P < 0.05$ )



### 6.2.2. Résultats du protocole 1 – Quantification de la migration des microparticules en fonction de l'hématocrite et de l'agrégabilité érythrocytaire à un cisaillement de $2 \text{ s}^{-1}$

Les figures 6.7 et 6.8 récapitulent les résultats obtenus lors du premier protocole expérimental et illustrent l'effet de l'interaction entre l'hématocrite et l'agrégabilité érythrocytaire sur la migration des microparticules, à un taux de cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ , sur les membranes mobiles et fixes respectivement. La mesure à 0% correspond aux résultats obtenus avec la suspension saline à  $2 \text{ s}^{-1}$ .

On peut voir que quelle que soit la membrane (fixe ou mobile), la migration des microparticules augmente avec l'hématocrite et l'agrégabilité érythrocytaire.

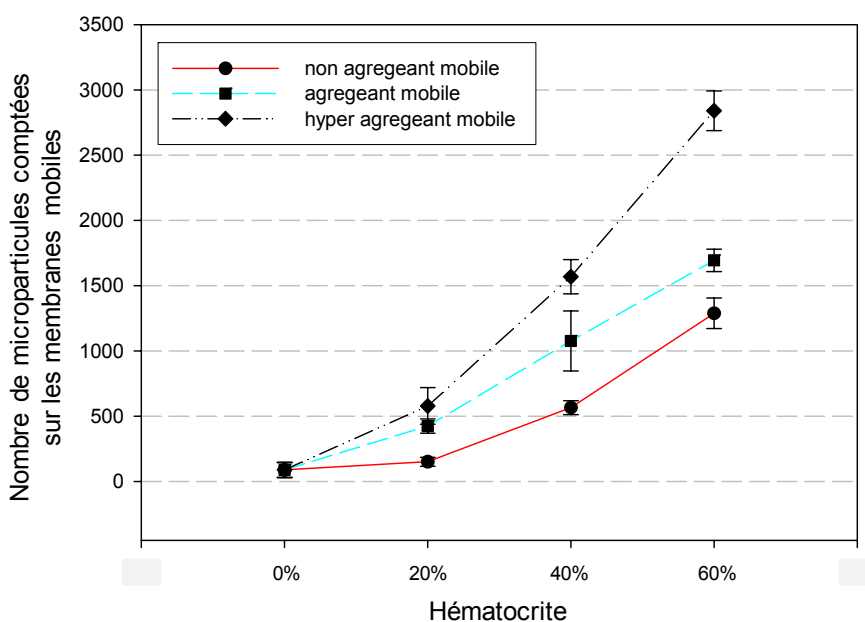
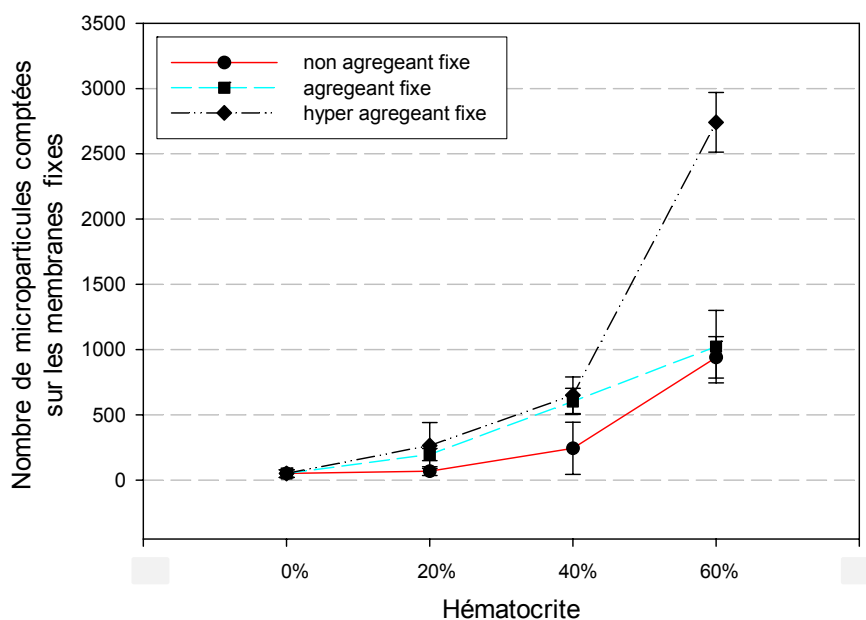


Figure 5.7 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes mobiles en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et de l'hématocrite. Le cisaillement est fixé à  $2 \text{ s}^{-1}$ .



**Figure 5.8 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes fixes en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et de l'hématocrite. Le cisaillement est fixé à  $2 \text{ s}^{-1}$ .**

Bien qu'il soit difficile d'apprécier ce comportement des figures 6.7 et 6.8, nous pouvons aussi remarquer que le nombre de microparticules comptées sur les membranes mobiles est toujours supérieur au nombre de microparticules comptées sur les membranes fixes à l'exception du sang hyper agrégant à 60% d'hématocrite.

L'analyse statistique nous indique qu'à un cisaillement constant de  $2 \text{ s}^{-1}$ , l'agrégabilité érythrocytaire amplifie l'impact de l'hématocrite sur la migration radiale des microparticules.

Résultats de l'analyse ANOVA3 :

- Il y a un effet significatif de l'hématocrite sur le nombre de microparticules comptées ( $P < 0.001$ ).
- Il y a un effet significatif du niveau d'agrégabilité érythrocytaire sur le nombre de microparticules comptées ( $P < 0.001$ ).

- Il y a une différence significative entre les résultats obtenus sur la paroi fixe et la paroi mobile ( $P < 0.001$ ). Plus de microparticules ont été comptées sur les membranes mobiles.
- Il y a une interaction significative entre l'hématocrite et l'agrégabilité érythrocytaire
- L'effet de l'interaction entre les parois du rhéomètre et l'agrégabilité érythrocytaire dépend du niveau d'hématocrite. Il n'y a pas d'effet significatif de l'interaction entre les parois du rhéomètre et l'agrégabilité érythrocytaire à 40% et 60% d'hématocrite.

Résultats de l'analyse de Tukey :

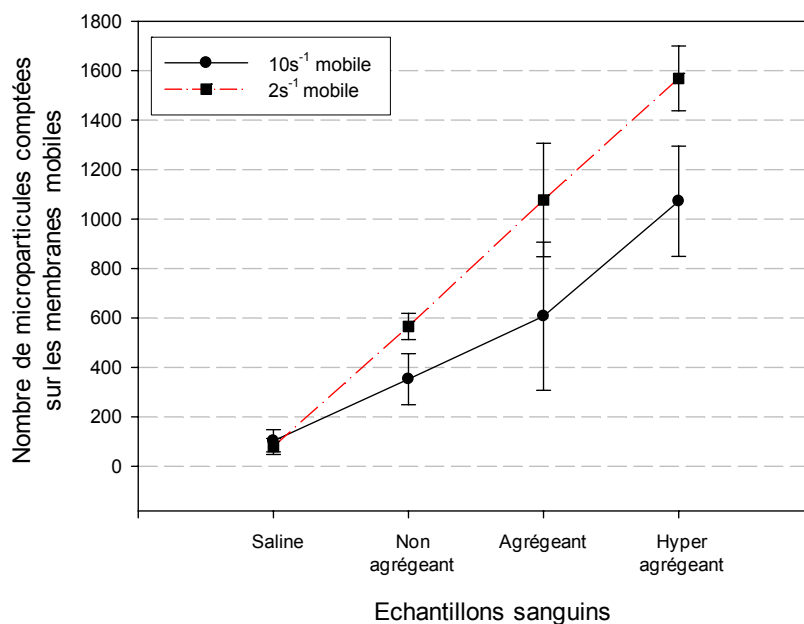
- Il n'y a pas de différence significative entre les groupes contrôles et le groupe non agrégeant à 20% d'hématocrite pour les membranes fixes et mobiles ( $P < 0.001$ ).
- Il n'y a pas de différence significative entre le groupe non agrégeant à 20% et le groupe non agrégeant à 40% sur les membranes fixes.
- Il n'y a pas de différence significative entre les membranes fixes et mobiles pour le groupe hyper agrégeant à 60% d'hématocrite.

### 6.2.3. Résultats du protocole 2 – Quantification de la migration des microparticules en fonction de l'agrégabilité érythrocytaire à un cisaillement de $10 \text{ s}^{-1}$

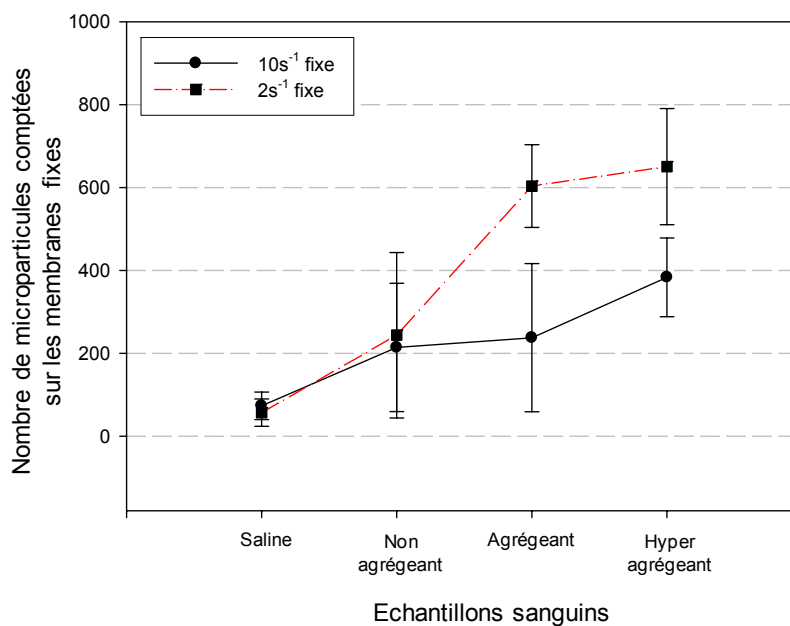
Cette dernière étude a pour but d'évaluer l'effet du cisaillement sur la migration des microparticules, en fonction de l'agrégabilité érythrocytaire pour un hématocrite fixé à 40%. On peut voir sur les figures 6.9 et 6.10 que le nombre de microparticules comptées augmente avec l'agrégabilité érythrocytaire et diminue avec le taux de cisaillement. Une quantification plus importante de microparticule a été obtenue à un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ .

On peut aussi remarquer que le nombre de microparticules comptées sur les membranes mobiles est toujours supérieur au nombre de microparticules comptées sur les membranes fixes à l'exception du groupe contrôle saline.

L'analyse statistique nous indique que pour un hématocrite fixé à 40%, le cisaillement amplifie l'impact de l'agrégabilité érythrocytaire sur la migration radiale des microparticules.



**Figure 5.9 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes mobiles en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et du cisaillement. L'hématocrite est fixé à 40%. Une solution contrôle sans globule rouge (saline) est incluse sur ce graphique.**



**Figure 5.10 - Moyennes et écart-types du nombre de microparticules comptées sur les membranes fixes en fonction du niveau d'agrégabilité érythrocytaire et du cisaillement. L'hématocrite est fixé à 40%. Une solution contrôle sans globule rouge (saline) est incluse sur ce graphique.**

Résultats de l'analyse ANOVA3 :

- Il y a un effet significatif du cisaillement sur le nombre de microparticules comptées ( $P < 0.001$ ).
- Il y a un effet significatif du niveau d'agrégabilité érythrocytaire sur le nombre de microparticules comptées ( $P < 0.001$ ).
- Il y a une différence significative entre les résultats obtenus sur la paroi fixe et la paroi mobile ( $P < 0.001$ ). Plus de microparticules ont été comptées sur les membranes mobiles.
- Il y a une interaction significative entre le choix de la paroi du rhéomètre et l'agrégabilité érythrocytaire. Il n'y a pas d'interaction significative entre les parois du rhéomètre et le cisaillement
- Il y a une interaction significative entre le cisaillement et l'agrégabilité érythrocytaire

Résultats de l'analyse de Tukey :

- Il n'y a pas de différence significative entre le groupe non agrégeant à  $2 \text{ s}^{-1}$  et à  $10 \text{ s}^{-1}$  ( $P > 0.05$ ) pour les membranes fixes et mobiles.
- Il n'y a pas de différence significative entre le groupe non agrégeant et le groupe agrégeant ( $P > 0.05$ ) à  $10 \text{ s}^{-1}$ , pour les membranes fixes et mobiles.

## CHAPITRE 6 : **DISCUSSION**

### 7.1. **Récapitulatif des résultats**

- 1) Sans la présence de globules rouges, la migration de microparticules est négligeable.
- 2) Quelle que soit le choix de la paroi du rhéomètre (fixe ou mobile), la migration des microparticules augmente avec l'hématocrite et l'agrégabilité érythrocytaire.
- 3) Quelle que soit le choix de la paroi du rhéomètre (fixe ou mobile), l'agrégabilité érythrocytaire amplifie l'impact de l'hématocrite sur la migration radiale des microparticules.
- 4) À 40% d'hématocrite, la diminution du cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$  à  $2 \text{ s}^{-1}$  amplifie l'impact de l'agrégabilité érythrocytaire sur la migration radiale des microparticules.

Dans ce chapitre, des clarifications seront faites sur :

- 1) Les problèmes rencontrés lors des mesures expérimentales
- 2) La présence d'un facteur confondant observé lors du deuxième protocole
- 3) La quantification des microparticules faite pour du sang hyper agrégeant à 60% d'hématocrite

La discussion générale portera sur les points suivants:

- 1) La description de ce qui a déjà été fait dans la littérature et comparaison avec nos résultats
- 2) La distribution des globules rouges dans un rhéomètre de Couette et son effet sur la migration des microparticules
- 3) L'effet de l'agrégabilité érythrocytaire sur la migration des plaquettes sanguines
- 4) L'analogie entre un écoulement de Couette et un écoulement de Poiseuille
- 5) L'impact clinique de nos observations

## 7.2. Problèmes rencontrés

Durant les mesures expérimentales, deux problèmes ont été rencontrés :

1) Le nombre de microparticules obtenu avec du sang non agrégeant à 20% d'hématocrite, à un taux de cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ , était autour de 100. Cependant, certains résultats comptaient plus de 2000 particules. Cette erreur est due au fait que les microparticules s'agrègent si elles restent immobilisées pendant une longue période (2 semaines). En effet, leur densité étant de  $\sim 1.06 \text{ g/cm}^3$ , et par mouvement brownien, les microparticules ne restent pas indéfiniment en suspension et finissent par sédimenter. Une fois sédimentées, les microparticules se collent plus facilement entre elles et finissent par s'agréger. Il est donc important de désagréger les microparticules avant chaque série d'expériences. Ceci peut se faire à l'aide d'un vortex ou d'un rotor. La figure 7.1 représente la région d'une membrane, visualisée à l'aide du microscope Zeiss, sur laquelle 25  $\mu\text{l}$  de microparticules diluées dans 300  $\mu\text{l}$  de saline ont été déposés. Sur l'image 7.1.A, les microparticules utilisées ont été, au préalable, laissées immobiles pendant plusieurs semaines. Nous pouvons voir que les microparticules sont difficilement différenciables. Les intensités lumineuses émises par chacune d'entre elles sont impossibles à quantifier. En regardant l'image on ne perçoit qu'une seule intensité. Ceci est dû au fait que les microparticules sont toutes agrégées les unes aux autres.

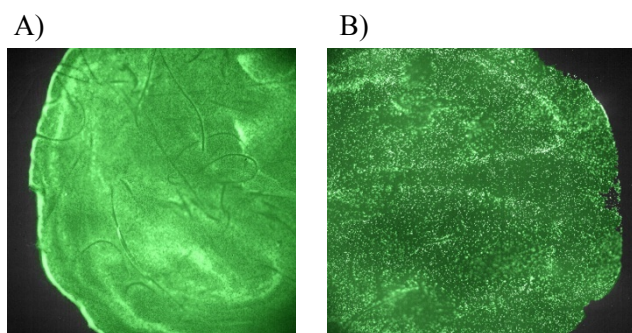
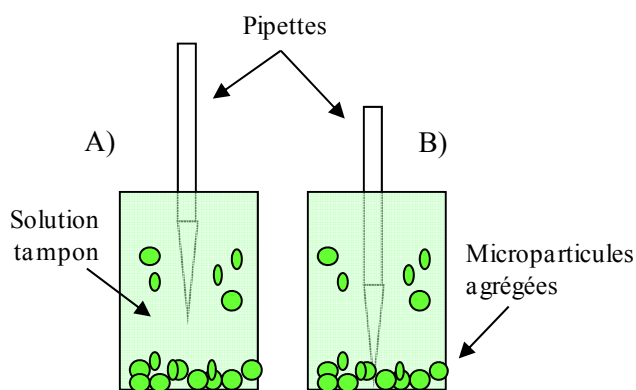


Figure 6.1 - Visualisation de microparticules A, agrégées et B, désagrégées déposées sur une membrane SAM<sup>2</sup>.

Sur l'image 7.1.B, les microparticules ont été, au préalable, dissociées à l'aide d'un vortex. Chaque point lumineux représente une microparticule. Dans ce cas-ci, elles peuvent plus facilement se différencier.

2) Le nombre de microparticules compté sur les différentes membranes avec du sang agrégeant à 40% d'hématocrite et à un taux de cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$  étaient autour de 1000. Cependant, pour certaines expériences, un nombre très inférieur à cette valeur a été obtenu (15-40 microparticules). Ces erreurs peuvent encore s'expliquer par la sédimentation et l'agrégation des microparticules. Si la pipette utilisée pour aspirer  $300 \mu\text{l}$  de solution de microparticules n'est insérée qu'à moitié dans le contenant (Figure 7.2.A), alors la concentration de microparticules récupérées sera très faible puisque la plupart des particules auront sédimentée. C'est ce qui a été observé pour certaines expériences. Si par contre, la pipette est insérée jusqu'au fond du contenant (Figure 7.2.B), alors on récupère une importante concentration de microparticules, ce qui peut être une autre source d'erreur.



**Figure 6.2 - Effet du positionnement de la pipette dans le contenant où les microparticules ont sédimenté et se sont agrégées. A. La pipette est insérée à moitié dans une région du contenant où la concentration en microparticules est très faible. B. La pipette est insérée jusqu'au fond du contenant où la concentration en microparticules est importante. Les deux situations A et B sont problématiques.**

La dissociation des microparticules avant expérimentation est donc un point très important qu'il faut systématiquement accomplir afin d'éviter toute erreur de quantification. Les séries expérimentales suspectes ont été retirées, et ceci explique pourquoi certaines études ont plus de résultats que d'autres.

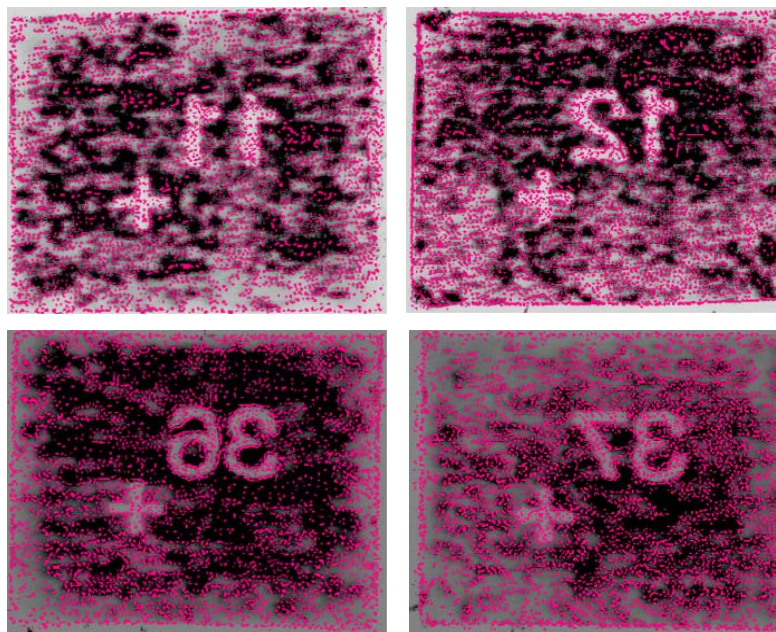


### **7.3. Observation d'un facteur confondant lors du deuxième protocole**

Les résultats obtenus lors du deuxième protocole nous indiquent que le nombre de microparticules comptées sur les membranes, fixes et mobiles, diminue avec le taux de cisaillement. Une quantification plus importante de microparticules a été obtenue avec un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ . Cependant, un facteur confondant peut influencer l'interprétation de ces derniers résultats. En effet, le temps nécessaire pour effectuer une révolution complète à un cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$  est plus rapide qu'à  $2 \text{ s}^{-1}$ . De ce fait, le temps peut s'avérer être un facteur confondant au nombre de tours. Nos résultats indiquent que plus le cisaillement est faible plus la migration des particules est importante. Mais est-ce que cet effet est absolu, ou est-ce le résultat d'un temps de migration plus long à faible cisaillement ? À moins de répéter les expériences précédentes en termes de temps plutôt qu'en termes de révolution du rhéomètre, il est impossible de vérifier cette hypothèse.

### **7.4. Quantification des microparticules pour du sang hyper agrégeant à 60% d'hématocrite**

Nous avons vu à la section 6.2.2, que le nombre de microparticules comptées sur les membranes mobiles était toujours significativement supérieur au nombre de microparticules comptées sur les membranes fixes à l'exception du sang hyper agrégeant à 60% d'hématocrite. Les nombres moyens de microparticules détectées sur les membranes mobiles et fixes étaient de  $2840 \pm 152$  et  $2741 \pm 228$ , respectivement. Ceci est dû à un problème de saturation provoqué par une concentration trop importante de microparticules sur les membranes. On peut voir à la figure 7.3, des membranes mobiles (11 et 36) et fixes (12 et 37) utilisées pour étudier le sang hyper agrégeant à 60% d'hématocrite.



**Figure 6.3 - Quantification automatique faite avec le Typhoon PhosphorImager des membranes mobiles (11 et 36) et fixes (12 et 37) utilisées avec du sang hyper agrégeant à 60% d'hématocrite et à un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ . 2979 microparticules ont été comptées sur la membrane 11, 2851 sur la membrane 12, 2864 sur la membrane 36 et 2894 sur la membrane 37.**

Les zones foncées que l'on peut observer sur chacune des quatre membranes ne sont pas le résultat d'un effet de contraste (Section 6.1.2) mais représentent en fait la fluorescence émise par un très grand nombre de microparticules superposées ou agglutinées ensemble. Il est utile de rappeler ici, l'importance de la linéarité de la détection de la fluorescence (Section 5.1.4) permettant d'assurer une bonne quantification des microparticules. Sur la membrane 11 par exemple, le PhosphorImager indique une quantification de 2979 particules. Cependant, au microscope, il est très facile de voir que cette membrane est saturée en particules. De ce fait, le PhosphorImager sous-évalue le nombre exact de particules puisqu'il repère les colonies de fluorescence présentes sur la membrane. Si une centaine de particules se superposent ou sont collées les unes aux autres, l'instrument ne comptera qu'une seule colonie. Dans cette situation, la détection des particules fluorescentes n'est plus linéaire. Ce phénomène, présent sur la membrane 11, se reproduit pour tous les résultats obtenus avec du sang hyper agrégeant, à 60% d'hématocrite, sur les membranes fixes et mobiles. Cependant, cela ne porte pas préjudice à l'analyse générale de cette étude puisque cette saturation ne se produit qu'avec l'échantillon sanguin où la migration était hypothétiquement la plus forte.

### 7.5. Qu'est ce qui a déjà été réalisé dans la littérature ?

Comme nous l'avons vu à la section 3.5, le rôle que jouent les globules rouges singuliers sur la migration axiale des plaquettes a été le sujet de nombreuses études expérimentales [1, 4, 6-8, 10, 69, 79] et modélisations numériques [9, 80-82]. Si ce phénomène peut s'expliquer par différentes théories, il est communément appelé *margination* [83]. La *margination* était un terme généralement utilisé pour décrire le transport des globules blancs provoqué par les globules rouges. Aujourd'hui ce terme de *margination* peut s'appliquer à toutes cellules du sang dont le déplacement axial est provoqué par la présence de globules rouges. L'équipe de Aarts *et al.* [8, 84] a successivement étudié expérimentalement le mouvement de plaquettes sanguines et de particules rigides (de taille identique à celle des plaquettes) sans, et en présence de globules rouges dans un tube cylindrique. En l'absence de globules rouges, les plaquettes ainsi que les particules rigides migrent vers une position moyenne égale à  $0.6x$  le rayon du vaisseau (Figure 7.4), et cela quel que soit le taux de cisaillement. Cette attitude des plaquettes change complètement en présence de globules rouges qui les forcent à migrer plus près de la paroi. On peut voir à la figure 7.5 que la concentration des plaquettes sanguines en périphérie augmente avec l'hématocrite, et diminue avec le cisaillement. Nos résultats, obtenus dans un écoulement de Couette, indiquent aussi un effet significatif du cisaillement et de l'hématocrite sur la migration des microparticules. À 40% d'hématocrite, sur les membranes mobiles et pour du sang agrégeant, une moyenne de  $607 \pm 238$  microparticules ont été comptées à un cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$  comparativement à  $1077 \pm 230$  à  $2 \text{ s}^{-1}$ . Sur les membranes mobiles et pour du sang non agrégeant, une moyenne de  $151 \pm 34$  particules ont été comptées à 20% d'hématocrite comparativement à  $566 \pm 53$  à 40% et  $1289 \pm 117$  à 60%.

Cette *margination* est due à trois propriétés du globule rouge soit : sa taille, sa déformation et sa concentration.

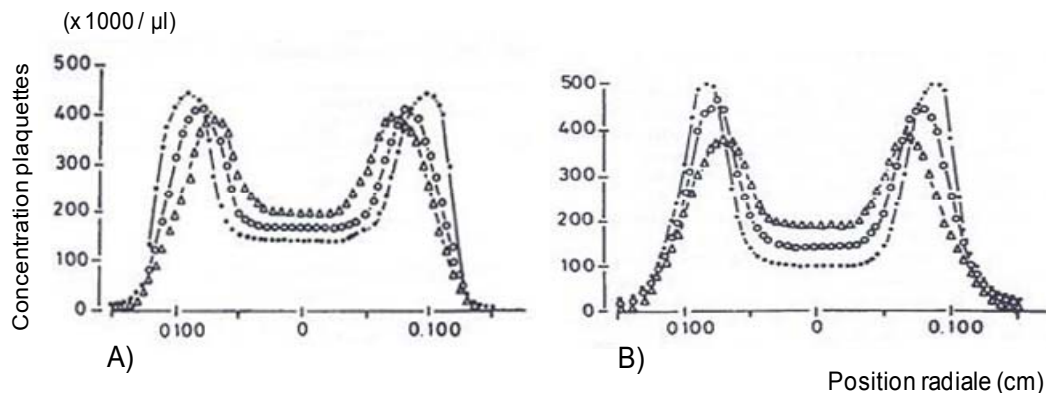


Figure 6.4 - Distribution radiale de la concentration en l'absence de globules rouges à un taux de cisaillement pariétal de  $1200 \text{ s}^{-1}$  ( $\bullet$ ),  $760 \text{ s}^{-1}$  ( $\circ$ ) et  $240 \text{ s}^{-1}$  ( $\Delta$ ). A. de plaquettes. B. de particules rigides (modifiée de [8]).

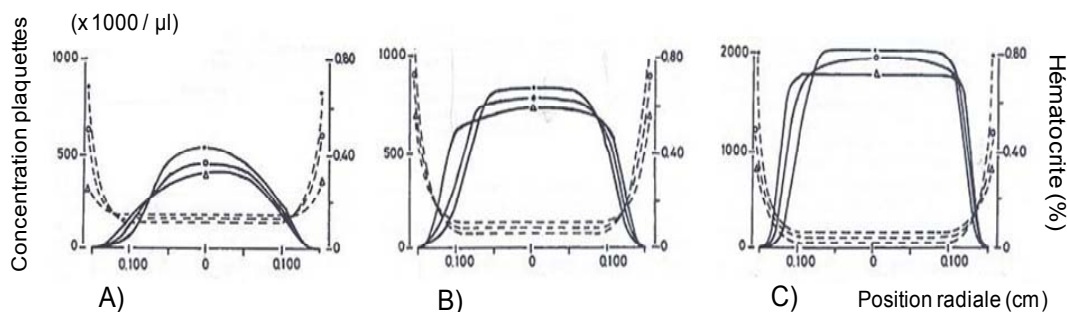


Figure 6.5 - Distribution de la concentration de plaquettes (- -) en présence de globules rouges (—) à 20% d'hématocrite (A), 40% (B) et 60% (C), et à un taux de cisaillement pariétal de  $1200 \text{ s}^{-1}$  ( $\bullet$ ),  $760 \text{ s}^{-1}$  ( $\circ$ ) et  $240 \text{ s}^{-1}$  ( $\Delta$ ) (modifiée de [8]).

### 7.5.1. Taille des globules rouges

Almomani *et al.* [82] ont simulé l'effet des globules rouges sur les plaquettes à l'aide d'un modèle mathématique. Leur analyse a montré que la *margination* des plaquettes observées était principalement provoquée par la différence de taille entre les plaquettes et les globules rouges. En remplaçant, dans leur modèle, les globules rouges par des particules de taille similaire à celle des plaquettes, ces dernières n'exhibaient pas de *margination*. Cette observation a été confirmée expérimentalement par Aarts *et al.* [6] en utilisant du sang provenant de différentes espèces animales (humain, lapin et chèvre). Plus le rapport des

tailles entre globules rouges et plaquettes est grande plus la *margination* sera importante. De ce fait, la taille des agrégats de globules rouges étant plus conséquente qu'un globule rouge singulier, le phénomène de *margination* devrait être amplifié. Ceci ce confirme dans nos résultats puisque l'analyse statistique indique que l'agrégabilité érythrocytaire a un effet significatif, indépendamment de l'hématocrite, sur la migration des microparticules.

### 7.5.2. Déformabilité des globules rouges

Une conséquence majeure de l'aptitude des globules rouges à se déformer est leur migration latérale vers le centre du vaisseau sanguin. Une telle migration est provoquée par le gradient de vitesse présent dans le vaisseau qui entraîne une distribution des contraintes du fluide. Ainsi, le globule rouge sera graduellement entraîné vers une position où la vitesse d'écoulement est maximale, et les contraintes de cisaillements sont minimales, c'est-à-dire au centre du vaisseau [44]. Une particule rigide, par contre, ne migrera que très légèrement vers le centre du conduit [2]. Les plaquettes sont bien moins déformables que les globules rouges car elles ont une structure interne (elles possèdent de nombreuses granulations) et sont aussi de plus petite taille. De ce fait, leur migration vers le centre du conduit est moins importante. Cependant, comme il a été expliqué précédemment, en l'absence de globules rouges, les plaquettes migrent à une position d'équilibre égale à  $0.6x$  le rayon du vaisseau [8].

L'effet migratoire des globules rouges vers le centre du conduit a pour effet d'augmenter la concentration en plaquettes sanguines au voisinage des parois vasculaires. Lorsque la concentration en globules rouges est supérieure à 20%, la région au centre du conduit est occupée par une forte concentration en érythrocytes qui avancent tous à une vitesse maximale identique. Un écoulement bouchon partiel (*partial plug flow*) se forme alors [2]. Cet écoulement bi-phasique a pour effet d'augmenter le taux de cisaillement pariétal (Section 3.2.4). Le transport par diffusion des particules en suspension à proximité des parois vasculaire est alors amplifié et un nombre plus important de plaquettes migre et s'adhère aux parois. Nous verrons plus loin que plus cet écoulement bouchon est large plus la concentration de plaquettes à proximité des parois augmente.

Goldsmith a démontré que la déformation des globules rouges dans le sang n'était pas seulement limitée aux régions de cisaillement élevé, mais était aussi présente dans la circulation normale, à des taux d'hématocrite physiologique [3]. Ce qui veut dire que l'effet de la déformabilité des globules rouges sur la *margination* des plaquettes intervient partout dans la circulation.

### 7.5.3. Concentration des globules rouges

Plusieurs études ont démontré que l'hématocrite était un paramètre important de l'adhésion plaquettaire lors de la formation de caillot hémostatique ou de thrombose [4, 22, 85]. Dans la circulation sanguine, à hématocrite normal, pour un ensemble de 600 globules rouges, on dénombre 40 plaquettes et un seul globule blanc. La *margination* des plaquettes est le résultat d'une collision continue avec les globules rouges se situant en dehors de l'écoulement bouchon partiel (*partial plug flow*), et l'amplitude de cette migration augmente avec l'hématocrite. En fait, cet écoulement bouchon provoque une dispersion radiale plus importante des globules rouges se situant en périphérie de l'écoulement, et une augmentation de la fréquence de contacts des particules en suspension dans le sang avec les parois vasculaires. Dans le cas des plaquettes, il y a une nette augmentation d'adhésion au sous-endothélium lorsque l'hématocrite augmente [1, 2]. Nos résultats confirment cette hypothèse puisque notre analyse statistique indique un effet significatif de l'hématocrite sur la migration des microparticules. De plus, Turitto et Weiss [4], de même que Goldsmith *et al.* [1] et Tilles et Eckstein [69] ont observé, par des mesures expérimentales, que le transport des plaquettes était de quelques centaines de fois plus rapide en présence d'une concentration de globules rouges supérieure à 10%. Afin de pouvoir observer un excès en concentration de plaquettes à proximité des parois, il faut donc un hématocrite suffisamment élevé [86]. Nos résultats sont en accord avec ce dernier point puisque du sang non agrégeant à 20% d'hématocrite n'a produit aucun effet significatif sur la migration des microparticules.

## 7.6. Distribution des globules rouges dans un rhéomètre de Couette.

Nous avons vu à la section 5.1.3.1, que lorsque les rayons de courbure des deux cylindres du rhéomètre étaient suffisamment grands devant l'épaisseur de l'entrefer, c'est-à-dire si le rapport  $e = (R_2 - R_1)/R_1 \ll 1$ , le taux de cisaillement pouvait être considéré comme constant dans l'entrefer. C'est ce que l'on appelle un rhéomètre à entrefer restreint et c'est le cas de notre appareil. Un rhéomètre est considéré à entrefer large lorsque le rapport  $e \gg 1$ . Dans ce cas le taux de cisaillement au travers de l'entrefer n'est plus constant.

Nous avons aussi vu à la section 5.1.3 que même si la variation du taux de cisaillement dans l'entrefer du rhéomètre de Couette utilisé était considérée comme négligeable, celle-ci pouvait tout de même varier en fonction du type de sang étudié (la variation maximale du cisaillement étant de 20%). La figure 7.6 présente la variation du taux de cisaillement, dans un rhéomètre de Couette à entrefer large utilisé par Cokelet *et al.* [87], obtenue pour trois types de sang : du sang non agrégeant (soit 40% de globules rouges dans une solution saline (■)), du sang agrégeant (soit 40% de globules rouges dans du plasma (△)) et du sang hyper agrégeant (soit 40% de globules rouges dans une solution saline avec du dextran à poids moléculaire élevé (◆)). Les résultats de cette figure ont été obtenus par IRM [87]. Il est important de noter que les valeurs de l'ordonnée sont inversées et correspondent à un taux de cisaillement projeté de  $2 \text{ s}^{-1}$ .

Nous pouvons tout d'abord remarquer que le taux de cisaillement n'est pas constant et qu'il varie différemment selon le type de sang utilisé. Pour du sang non agrégeant, le taux de cisaillement varie entre  $-2.97 \text{ s}^{-1}$  sur le cylindre en rotation ( $r = 0.0$ ) et  $-1.69 \text{ s}^{-1}$  sur le cylindre maintenu fixe ( $r = 1.1$ ). La suspension des globules rouges pour ce type de sang réagit presque comme un fluide Newtonien et ces derniers agissent comme des particules indépendantes. La variation du taux de cisaillement au travers de l'entrefer est la plus faible pour ce type de sang. Dans le cas du sang agrégeant et hyper agrégeant, les suspensions de globules rouges réagissent différemment. À proximité du cylindre interne (en rotation), le gradient de vitesse (le cisaillement) est plus pentu que pour du sang non agrégeant, la pente étant plus raide pour du sang hyper agrégeant qu'agrégeant. Près du cylindre externe (maintenu fixe), le gradient de vitesse augmente aussi avec l'agrégabilité érythrocytaire.

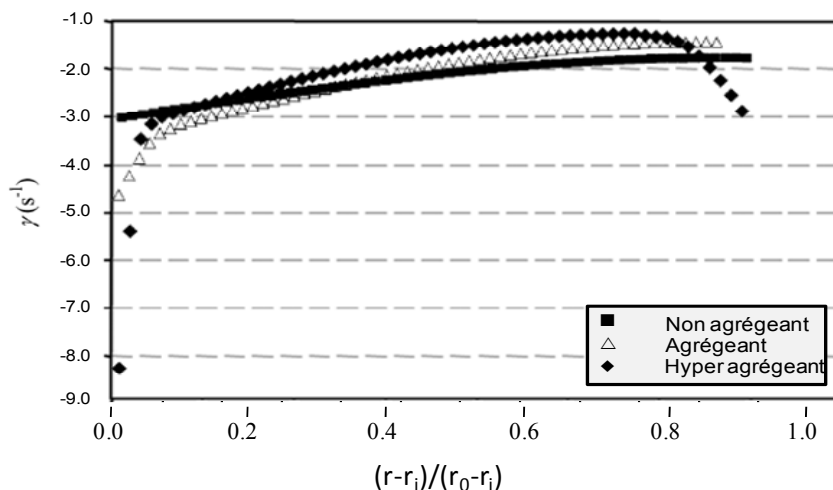


Figure 6.6 - Variation du taux de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ) dans un rhéomètre de Couette à entrefer large, en fonction de la position radiale ( $r$ ) normalisée pour trois types de sang utilisés; non agrégant (■), agrégant (△) et hyper agrégant (◆). Le cylindre en rotation est à  $(r-r_i)/(r_o-r_i) = 0$  tandis que le cylindre fixe est à 1 (modifiée de [87]).

Dans les trois types de sang étudiés, le cisaillement, fonction du niveau d'agrégation, a tendance à augmenter de chaque côté de l'entrefer pour atteindre des maximums (les valeurs de l'ordonnée sont inversées). La figure 7.7 représente le profil des hémocrites correspondant aux cisaillements de la figure 7.6.

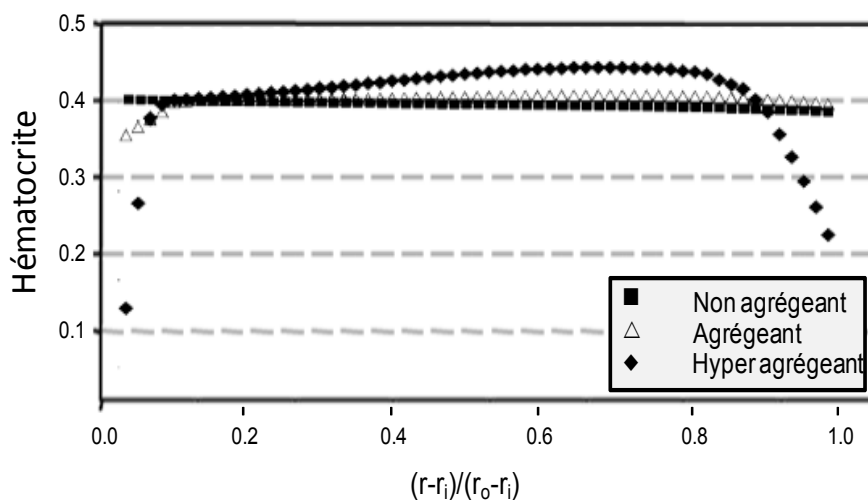


Figure 6.7 - Distribution de l'hématocrite dans un rhéomètre de Couette à entrefer large, en fonction de la position radiale ( $r$ ) normalisée pour trois types de sang utilisés; non agrégant (■), agrégant (△) et hyper agrégant (◆). Le cylindre en rotation est à  $(r-r_i)/(r_o-r_i) = 0$  tandis que le cylindre fixe est à 1 (modifiée de [87]).



Pour le sang non agrégeant, l'hématocrite est relativement constant dans tout l'entrefer. Il n'y a aucune évidence d'une déplétion de globules rouges à proximité des parois de l'entrefer. Pour le sang agrégeant où les amas de globules rouges se forment à faible cisaillement, on peut observer une région proche de la paroi interne (mobile) où l'hématocrite est en dessous de la valeur moyenne. En comparaison à cela, à proximité de la paroi externe (maintenue fixe) l'hématocrite ne diminue que très légèrement. Cette observation est d'autant plus marquée pour du sang hyper agrégeant où le profil de l'hématocrite est plus arrondi. A proximité des deux bords de l'entrefer, l'hématocrite est très faible, ce qui indique une importante déplétion de globules rouges. À une distance radiale normalisée de 0.8 mm, l'hématocrite atteint sa concentration maximale avec une valeur supérieure à la valeur moyenne de l'hématocrite, qui est de 40%.

On peut remarquer que les profils d'hématocrite sont directement reliés aux profils de cisaillement correspondant (Figure 7.6). Pour du sang agrégeant, la concentration de l'hématocrite est maximum là où le taux de cisaillement est le plus faible. Cette observation est similaire mais plus marquée pour du sang hyper agrégeant. Dans les deux cas (agrégeant et hyper agrégeant), le cisaillement atteint une valeur minimale dans une région proche de la paroi fixe de l'entrefer où la concentration d'hématocrite est maximale.

#### 7.6.1. Explication de la distribution des globules rouges dans un rhéomètre

Ces observations de Cokelet *et al.* [87], peuvent s'expliquer par la migration radiale des globules rouges, et agrégats de globules rouges, dans l'entrefer. De nombreux groupes [87-96] se sont penchés sur l'étude de la migration de particules, de même taille, en suspension dans un fluide non Newtonien pour un écoulement de Couette. Les conclusions suggèrent que ces particules migrent d'une région où le cisaillement est le plus élevé (c'est-à-dire les parois de l'entrefer) vers une région où le cisaillement est le plus faible (c'est-à-dire une région d'équilibre localisée à l'intérieur de l'entrefer). Ces observations furent confirmées expérimentalement par Chow *et al.* [92], Tetlow *et al.* [97], Abbot *et al.* [90] et analytiquement par Ingber *et al.* [94] et Phillips *et al.* [88]. Ce phénomène se produit aussi dans des Couettes à entrefer restreint mais à une échelle temporelle plus longue.

L'hypothèse suggérée pour expliquer ce phénomène est la suivante : À proximité des parois du rhéomètre, les collisions inter-globules rouges sont plus fréquentes vers le centre de l'entrefer que vers les bords (Figure 7.8). La raison étant que la probabilité pour un globule rouge de rencontrer un autre globule rouge situé plus près des parois est faible. Dans la région centrale de l'entrefer, la probabilité de collision entre deux globules rouges est identique, quelles que soient leurs positions. De ce fait, les globules rouges migrent vers une position d'équilibre où la distribution radiale des forces de collision est homogène. Cette hypothèse de diffusion hydrodynamique des globules rouges a été proposée par Leighton et Acrivos [96] et confirmée par Cokelet *et al.* [87]. Cette diffusion entraîne alors une distribution non homogène des globules rouges et un gradient de vitesse plus importante aux parois du rhéomètre de Couette qui amènent des phénomènes migratoires des globules rouges similaires à ceux dans un tube cylindrique (Section 3.4).

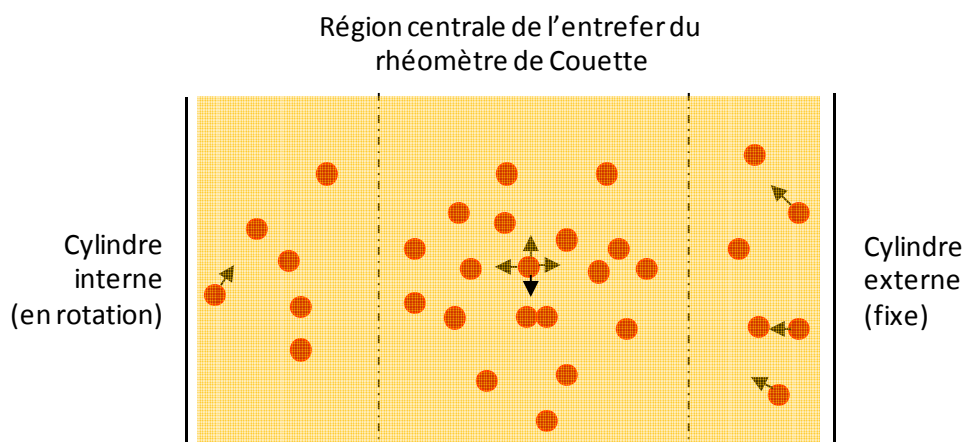


Figure 6.8 - Fréquence de collisions inter-globules rouges. Les flèches indiquent la direction pour laquelle un globule rouge aura le plus de probabilités d'entrer en collision avec un autre globule rouge.

### 7.7. Explication des résultats obtenus dans cette étude et particulièrement ceux sur l'impact de l'agrégation érythrocytaire sur la migration de particules

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent maintenant s'expliquer. L'accroissement de l'agrégation érythrocytaire a pour effet d'augmenter la concentration des globules rouges à une position d'équilibre située à l'intérieur de l'entrefer. Il se produit alors une déplétion de

globules rouges à proximité des cylindres du rhéomètre. Par conséquent, plus de microparticules sont déplacées vers les parois du rhéomètre libres en globules rouges. À la figure 7.7, on a pu observer que la concentration de globules rouges à proximité des parois diminue avec l'agrégabilité érythrocytaire. Ceci se confirme avec nos résultats. À 40% d'hématocrite, pour du sang non agrégeant, une moyenne de  $566 \pm 53$  microparticules ont été comptées sur la membrane mobile comparativement à  $1077 \pm 230$  avec du sang agrégeant, et à  $1569 \pm 131$  avec du sang hyper agrégeant.

Le raisonnement est similaire lorsque l'hématocrite varie pour un même niveau d'agrégabilité érythrocytaire. Plus l'hématocrite est important plus les collisions inter globules rouges augmentent, ce qui entraîne d'avantage de globule rouges à migrer vers une position d'équilibre. Pour du sang hyper agrégeant, à 20% d'hématocrite, une moyenne de  $579 \pm 140$  microparticules ont été comptées sur les membranes mobiles comparativement à  $1569 \pm 131$  à 40% d'hématocrite, et  $2840 \pm 152$  à 60%. En fait la présence d'un niveau d'agrégabilité érythrocytaire a pour effet d'amplifier ce mécanisme.

Un autre point qui peut maintenant s'expliquer est le fait que dans chaque étude réalisée, nos résultats indiquent qu'il y a une différence significative d'adhésion entre les parois du rhéomètre. Il y a une distribution plus importante de microparticules à proximité du cylindre en rotation que vers le cylindre maintenu fixe, peu importe le niveau d'agrégabilité érythrocytaire, l'hématocrite ou encore le taux de cisaillement utilisé. À la figure 7.7, il avait été observé que la concentration de globules rouges est plus faible à proximité de la paroi mobile qu'à proximité de la paroi maintenue fixe. Cet écart est plus marqué pour du sang agrégeant et hyper agrégeant.

### **7.8. Analogie entre un écoulement de Couette et un écoulement de Poiseuille**

L'interprétation de nos résultats couplée avec ce qui a déjà été observé dans la littérature nous permet de faire une analogie entre les interactions et le transport de particules en suspension, pour un écoulement de Couette et un écoulement de Poiseuille. À première vue, on pourrait penser que dans un rhéomètre, influencées par la force centrifuge, les particules

migraient vers le cylindre maintenu fixe. Cependant nous avons vu que les globules rouges migraient vers une position d'équilibre dans l'entrefer et que les plaquettes étaient expulsées vers les parois du rhéomètre, plus particulièrement vers celle mobile. Ces observations sont très similaires aux interactions globules rouges-plaquettes présentes dans un écoulement de Poiseuille. En effet, les travaux réalisés par Uijttewaal *et al.* [98], Aarts *et al.* [8], et Tilles et Eckstein [69] confirment cette interaction. Dans chaque étude, ils observent une augmentation de la concentration de plaquettes sanguines à proximité des parois de petits tubes cylindriques en fonction de l'hématocrite et du cisaillement. Nous avons également montré l'impact de l'hématocrite et du cisaillement dans notre étude. Nos résultats indiquaient aussi un effet significatif de l'agrégabilité érythrocytaire sur la migration des microparticules. On peut alors faire l'hypothèse que dans un écoulement de Poiseuille, bien qu'inexploré jusqu'à maintenant expérimentalement, l'agrégabilité érythrocytaire a aussi un effet sur la migration des plaquettes sanguines.

### **7.9. Effet potentiel de l'agrégation érythrocytaire sur la migration des plaquettes dans la circulation sanguine humaine**

Les discussions précédentes nous laissent penser que l'agrégation érythrocytaire n'est pas nécessaire à la migration axiale des plaquettes qui augmente avec l'hématocrite. Néanmoins, on peut tout de même affirmer qu'elle y contribue et, selon l'hématocrite, peut s'avérer indispensable. Les résultats de notre étude indiquent un effet significatif et additif de l'agrégation érythrocytaire sur la migration des microparticules. Nash *et al.* [11] suggèrent que dans un tube cylindrique, l'agrégation érythrocytaire et le développement d'un écoulement bouchon devraient accroître la vitesse des cellules à proximité des parois et augmenter le cisaillement pariétal, ce qui aurait pour effet d'augmenter l'adhésion plaquettaire. La caractéristique non Newtonienne du sang dans un écoulement tubulaire a pour effet d'aplatir davantage le profil de vitesse. Le degré d'aplatissement est fonction du débit de la longueur d'entrée du vaisseau, de l'hématocrite et de l'agrégabilité érythrocytaire.

La figure 7.9 illustre l'effet hypothétique que l'écoulement bouchon peut avoir sur la distribution des différents éléments du sang. En l'absence d'un noyau d'agrégats, les globules rouges singuliers ou petits agrégats occupent la partie centrale du vaisseau où le cisaillement est faible ou nul. L'expulsion des plaquettes et leucocytes en périphérie (Figure 7.9.A) est alors limitée par la taille du vaisseau et ne dépend que de la concentration en hémocrite. Dans un vaisseau sanguin, si l'hématocrite est trop bas, le phénomène de *margination* sera insuffisant pour expulser les plaquettes suffisamment proches des parois vasculaires.

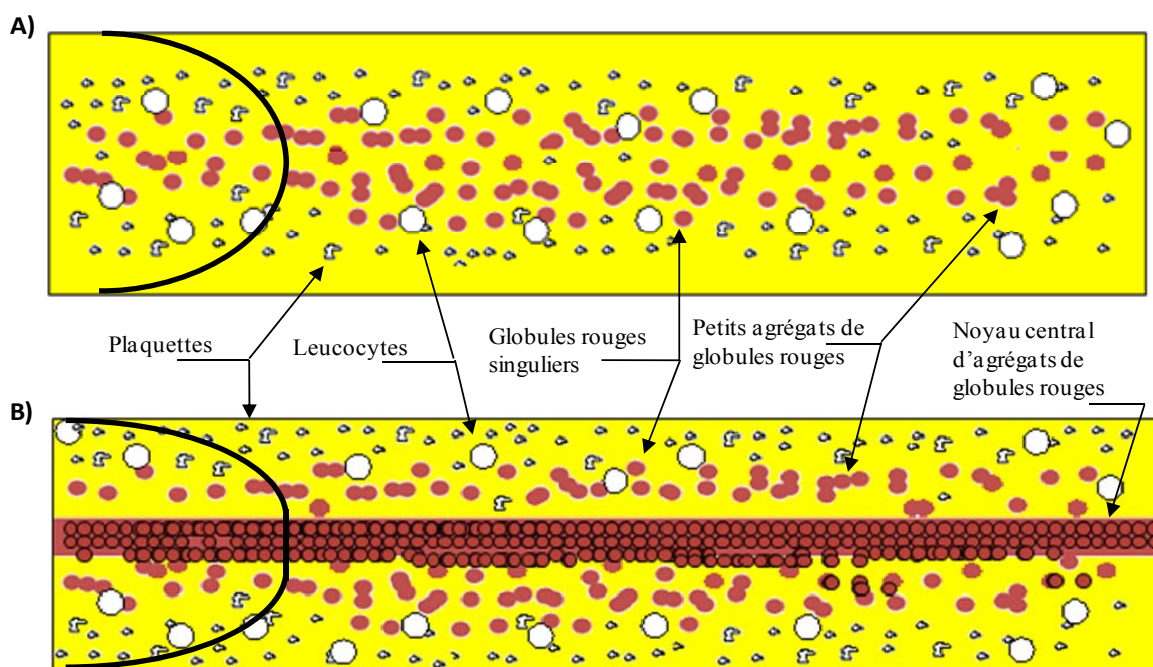


Figure 6.9 - Distribution des différents éléments du sang en l'absence (A) et en présence (B) d'un noyau central d'agrégats de globules rouges.

En cas d'anémie, la présence d'un noyau central d'agrégats (particulièrement dans les veines) peut alors être un facteur utile et nécessaire puisque celui-ci assure une distribution des globules rouges singuliers et petit agrégats plus importante en périphérie du vaisseau (Figure 7.9.B). La *margination* des plaquettes est alors amplifiée. Cette hypothèse se confirme par notre analyse statistique qui indique que l'agrégation érythrocytaire amplifie l'impact de l'hématocrite sur la migration des microparticules.

Ainsi, les plaquettes se rapprochent des parois où le cisaillement pariétal est plus fort, ce qui favorise les interactions plaquettes-endothélium. À un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ , à 20%

d'hématocrite, sur les membranes mobiles, une moyenne de  $151 \pm 34$  microparticules ont été comptées pour du sang non agrégeant comparativement à  $424 \pm 55$  pour du sang agrégeant, et  $579 \pm 140$  pour du sang hyper agrégeant. Comparé au groupe contrôle, le sang non agrégeant à 20% d'hématocrite, n'a pas d'effet significatif alors que du sang agrégeant et hyper agrégeant en ont un. Ces résultats indiquent qu'à faible hématocrite, l'agrégation érythrocytaire est nécessaire pour assurer l'adhésion plaquettaire alors qu'à un hématocrite élevé, l'adhésion plaquettaire peut se faire sans la participation de l'agrégation érythrocytaire. L'agrégation érythrocytaire aurait alors un rôle bénéfique. Par contre, comme nous allons le voir dans la section suivante, la présence simultanée d'un hématocrite élevé et d'un sang hyper agrégeant peut entraîner des réponses pathologiques sévères. Cependant, ces hypothèses ne peuvent être confirmées puisqu'à ce jour, aucune autre étude, n'a été réalisée pour étudier l'effet de l'agrégation sur la migration des plaquettes (ou microparticules simulant des plaquettes sanguines).

### **7.10. Effets physiologiques de l'agrégation érythrocytaire**

L'adhésion incontrôlée de plaquettes est pathologique dans les maladies chroniques inflammatoires et thrombotiques et il se trouve que l'agrégation érythrocytaire est souvent élevée dans ces conditions. De ce fait, il est raisonnable d'affirmer que l'interaction entre l'agrégation érythrocytaire et l'adhésion plaquettaire est pertinente pour avoir une meilleure compréhension de ces réponses pathologiques.

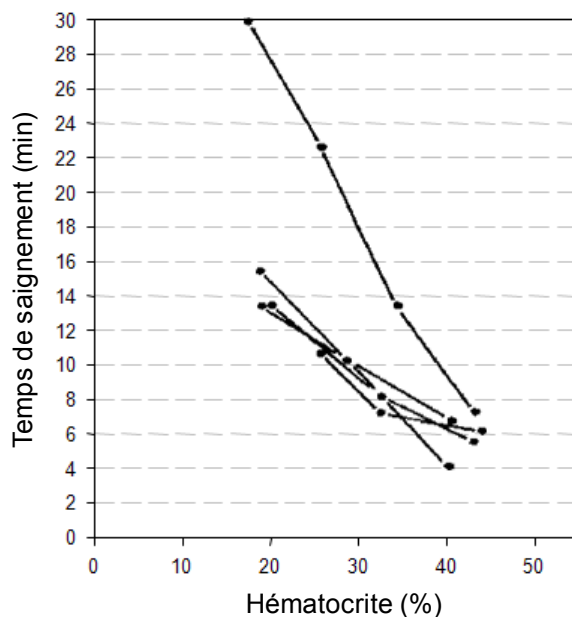
Nous avons vu au chapitre 2 que le processus d'hémostase se déclenchait lors de perte de sang au travers d'une paroi vasculaire endommagée, et que les plaquettes sanguines devaient adhérer aux parois afin de remplir leur fonction réparatrice. Pour adhérer aux parois, les plaquettes doivent d'abord y être transportées. Nous savons aussi que lors d'une inflammation vasculaire, la balance hémostatique se dérègle, résultant en une augmentation de la production de facteur pro-coagulant favorisant la formation de thrombose. Dans les deux cas, ce sont les globules rouges et agrégats de globules rouges qui contribuent au mécanisme migratoire des plaquettes sanguines afin qu'elles jouent leur rôle réparateur ou

pathologique. En plus de leur effet hémodynamique, les globules rouges jouent aussi un rôle dans l'activation plaquettaire par relargage d'ADP [99, 100].

Les résultats de notre étude nous confirment que l'hématocrite, ainsi que le niveau d'agrégation érythrocytaire, ont un effet significatif sur la migration de microparticules. Cependant, quelles sont les conséquences physiologiques d'une concentration en hématies trop faible ou trop élevée sur la migration des plaquettes sanguines ? Cette question est abordée aux sous-sections suivantes.

#### 7.10.1. L'anémie

L'anémie se définit comme une diminution de l'habilité du sang à transporter de l'oxygène, entraînant une diminution de la masse d'hémoglobine circulante. Ceci est provoqué par une baisse de l'hématocrite ou par une diminution de la concentration d'hémoglobine par globule rouge. *In vitro*, l'adhésion des plaquettes aux parois est virtuellement abolie en l'absence de globules rouges ([8] et Figure 6.6). Les patients anémiques peuvent exhiber un temps de saignement prolongé qui se normalise lorsque l'hématocrite dépasse 30%. Ceci peut alors entraîner une hémorragie dont la sévérité dépend du degré d'anémie. Des études faites par Duke [101] et Hellem *et al.* [102] ont montré que le temps de saignement chez des patients anémiques pouvait être corrigé par transfusion sanguine, c'est-à-dire par l'apport en globules rouges supplémentaires. Cet effet a été attribué aux variations rhéologiques du sang. Lorsque les globules rouges sont présents, il y a une augmentation de la diffusion des plaquettes. Plusieurs études [99, 103-105] ont démontré que l'hématocrite était inversement corrélé avec le temps de saignement. Plus l'hématocrite est faible, plus le temps de saignement est important et inversement. Les études réalisées par Hellem *et al.* [102] indiquent que le temps de saignement chez un sujet normal est en moyenne de 6 minutes alors que chez un patient anémique, le temps de saignement peut se prolonger jusqu'à 30 minutes. La figure 7.10.A expose la relation entre le temps de saignement et l'hématocrite, avant, durant et après transfusion sanguine, chez cinq patients anémiques.



**Figure 6.10 - A. Relation entre le temps de saignement et l'hématocrite avant, pendant et après transfusion sanguine chez cinq patients anémiques (modifiée de [102]).**

On peut observer sur cette figure que le temps de saignement devient normal lorsque l'hématocrite atteint 40%.

Harker et Slichter ainsi que Valeri *et al.*, ont rapporté que le temps de saignement pouvait être utilisé comme indice pour déterminer le nombre de plaquettes sanguines présentes dans la circulation [104, 106]. Cependant, cette affirmation n'est pas toujours acceptée [107, 108]. Hellem *et al.* stipulent que le temps de saignement n'est pas dépendant de la concentration de plaquettes sanguines, mais du nombre de plaquettes activées qui ont adhéré localement au site endommagé [102]. En effet, pour qu'un nombre important de plaquettes puissent adhérer au site endommagé, la concentration en hématies doit être suffisamment importante pour les expulser du centre du vaisseau sanguin. Ce phénomène est confirmé *in vitro* par AArts *et al.* [8] où, en l'absence de globules rouges, les plaquettes sanguines circulant dans un tube cylindrique sont concentrées à une position d'équilibre égale à  $0.6xR$  ( $R$  = rayon du conduit).



### 7.10.2. La polycythémie

À l'inverse de l'anémie, la polycythémie primaire se définit comme un accroissement de la masse érythrocytaire dans la circulation sanguine sans qu'il n'y ait d'accroissement du volume plasmatique. Ce niveau d'hématocrite élevé a pour effet d'accroître la viscosité du sang rendant plus difficile l'écoulement sanguin à travers les vaisseaux. Dans une artériole, à un taux de cisaillement de  $12 \text{ s}^{-1}$ , la viscosité du sang double lorsque l'hématocrite passe de 40% à 60% [109]. Les complications vasculaires chez les patients atteints de polycythémie sont cliniquement corrélées avec l'hématocrite et la viscosité. De plus, le nombre de plaquettes comptées est supérieur à  $400 \times 10^9 / \text{L}$  (chez un sujet normal, on compte entre  $150\text{-}400 \times 10^9$  plaquettes/L) [110], ce qui peut également amplifier le risque de thrombose.

La polycythémie est donc caractérisée par un hématocrite supérieur à 50% chez la femme et à 53% chez l'homme. De ce fait, les interactions plaquettes-globules rouges et plaquettes-agrégats de globules rouges sont plus fréquentes. Le mouvement chaotique des plaquettes sanguines est alors d'un ordre de grandeur plus important, et un nombre plus important de globules rouges migrent vers le noyau central d'écoulement. Par conséquent, plus de plaquettes sont expulsées en périphérie, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration plaquettaire à proximité des parois vasculaires, le temps de contact plaquettes-endothélium et ainsi l'adhésion plaquettaire [111]. Cet effet se confirme par nos résultats puisque à 60% d'hématocrite, pour du sang non agrégé, 1298 microparticules ont été comptées, sur les membranes mobiles alors que seulement 151 microparticules ont été dénombrées à 20% d'hématocrite.

En plus d'une augmentation de collisions entre globules rouges et plaquettes provoquée par une hausse de l'hématocrite, l'écoulement sanguin est aussi altéré par une propriété anormale des globules rouges qui est l'hyper agrégation. Les agrégats de globules rouges observés en périphérie d'un vaisseau sanguin sont généralement sous forme de rouleaux. Ces agrégats se dissocient facilement et ne bloquent aucunement la microcirculation. Les agrégats de taille plus importante observés dans des pathologies d'hyperviscosités, ont une structure plus complexe (réseau 3D de rouleaux de globules rouges). Ces agrégats se désagrègent plus difficilement, et contribuent à l'altération et au ralentissement de la circulation sanguine. Un

hématocrite supérieur à 50% est donc généralement accompagné par une hyperviscosité importante. L'écoulement est alors ralenti, et afin de maintenir un débit sanguin physiologique, les contraintes de cisaillement doivent augmenter afin de contrer l'effet de cette hyperviscosité. Les contraintes mécaniques imposées sur les plaquettes sanguines sont alors plus importantes. De ce fait, elles s'activent plus facilement et leur transport par diffusion à proximité des parois vasculaires est aussi amplifié. De plus, les globules rouges relarguent de l'ADP sous l'effet des contraintes de cisaillement importantes, ce qui a pour effet d'activer chimiquement les plaquettes sanguines.

Un taux d'hématocrite important entraîne une augmentation de la migration axiale des globules rouges, alors que la zone plasmatique périphérique diminue. Ceci augmente le taux de cisaillement à la paroi et les interactions entre les plaquettes et les cellules endothéliales [112]. Chez les patients atteints de polycythémie, la thrombose est la cause de mortalité la plus importante (29%) [113]. Comme nous venons de le voir, ceci est provoqué par plusieurs facteurs incluant notamment une augmentation de l'hématocrite, de l'activation plaquettaire, d'endommagement endothélial, de l'interaction plaquette-endothélium et de la viscosité sanguine [114]. De tous ces facteurs, l'hyperviscosité du sang, provoquée par un accroissement important de l'hématocrite, est le facteur pro-thrombotique le plus important.

## CHAPITRE 7 : CONCLUSIONS

Le travail réalisé dans ce mémoire avait pour objectif de quantifier, *in vitro*, la migration de microparticules simulant des plaquettes sanguines en fonction du niveau d'agrégation érythrocytaire présent, en faisant varier l'hématocrite et le taux de cisaillement. Le peu d'études *in vitro* consacrées à cet objectif ont toujours été réalisées dans des conduits cylindriques afin de reproduire des écoulements physiologiques. Cependant, cette approche n'est pas une bonne solution car le comportement non Newtonien du sang dans un écoulement tubulaire est un obstacle au contrôle de l'organisation spatiale des agrégats de globules rouges. Le montage expérimental élaboré dans cette étude a été réalisé en utilisant un appareil permettant de moduler, de façon homogène, la taille et la structure de ces agrégats et de quantifier ainsi leur effet sur la migration axiale des plaquettes. De ce fait, les conclusions obtenues sont plus justes et pertinentes, bien qu'en accord avec les résultats présentés dans la littérature. De manière générale, nous pouvons affirmer que l'hématocrite, l'agrégabilité érythrocytaire ainsi que l'interaction hématocrite-agrégabilité érythrocytaire ont un effet statistiquement significatif sur la migration des fantômes de plaquettes sanguines. Telle qu'elle a été présentée, la migration des microparticules augmente avec l'hématocrite et le niveau d'agrégation. Grâce à cette étude, nous avons acquis une meilleure compréhension sur le rôle que l'agrégation érythrocytaire peut avoir sur la migration des plaquettes, et ceci dans différentes situations pathologiques et physiologiques.

Il serait maintenant, intéressant de confirmer ces résultats expérimentaux à l'aide d'un modèle numérique. Ceci pourrait faire l'objet d'une thèse ou d'un mémoire. Nous avons aussi remarqué que le temps de rotation du rhéomètre était un facteur confondant pouvant injustement influencer l'interprétation de l'effet du cisaillement sur la migration des microparticules. Il serait donc pertinent de répéter cette étude en termes de temps plutôt qu'en termes de nombre de révolution du rhéomètre.

## Références

- [1] H. L. Goldsmith, D. N. Bell, S. Spain, and F. A. McIntosh, "Effect of red blood cells and their aggregates on platelets and white cells in flowing blood," *Biorheology*, vol. 36, pp. 461-8, 1999.
- [2] H. L. Goldsmith and V. T. Turitto, "Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis," *Thromb Haemost*, vol. 55, pp. 415-35, Jun 30 1986.
- [3] H. L. Goldsmith, "Deformation of human red cells in tube flow," *Biorheology*, vol. 7, pp. 235-42, May 1971.
- [4] V. T. Turitto and H. J. Weiss, "Red blood cells: their dual role in thrombus formation," *Science*, vol. 207, pp. 541-3, Feb 1 1980.
- [5] V. T. Turitto and C. L. Hall, "Mechanical factors affecting hemostasis and thrombosis," *Thromb Res*, vol. 92, pp. S25-31, Dec 15 1998.
- [6] P. A. Aarts, P. A. Bolhuis, K. S. Sakariassen, R. M. Heethaar, and J. J. Sixma, "Red blood cell size is important for adherence of blood platelets to artery subendothelium," *Blood*, vol. 62, pp. 214-7, Jul 1983.
- [7] P. A. Aarts, R. M. Heethaar, and J. J. Sixma, "Red blood cell deformability influences platelets--vessel wall interaction in flowing blood," *Blood*, vol. 64, pp. 1228-33, Dec 1984.
- [8] P. A. Aarts, S. A. van den Broek, G. W. Prins, G. D. Kuiken, J. J. Sixma, and R. M. Heethaar, "Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood," *Arteriosclerosis*, vol. 8, pp. 819-24, Nov-Dec 1988.
- [9] E. C. Eckstein and F. Belgacem, "Model of platelet transport in flowing blood with drift and diffusion terms," *Biophys J*, vol. 60, pp. 53-69, Jul 1991.
- [10] E. C. Eckstein, A. W. Tilles, and F. J. Millero, 3rd, "Conditions for the occurrence of large near-wall excesses of small particles during blood flow," *Microvasc Res*, vol. 36, pp. 31-9, Jul 1988.

- [11] G. B. Nash, T. Watts, C. Thornton, and M. Barigou, "Red cell aggregation as a factor influencing margination and adhesion of leukocytes and platelets," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 39, pp. 303-10, 2008.
- [12] S. J. a. L. D. Vander AJ, *The mechanisms of body function*, 1997.
- [13] J. J. Hathcock, "Flow effects on coagulation and thrombosis," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 26, pp. 1729-37, Aug 2006.
- [14] E. A. Beck, "The chemistry of blood coagulation: a summary by Paul Morawitz (1905)," *Thromb Haemost*, vol. 37, pp. 376-9, Jun 30 1977.
- [15] <http://www.irvingcrowley.com/cls/clotting.gif>.
- [16] J. Corver, F. Van der Mark, G. Kulken, and T. Jansen, "The response to pulsatile flow of a miniature electromagnetic blood flow sensor studied by means of a laser doppler," *Med Biol Eng Comp*, vol. 21, pp. 430-434, 1983.
- [17] H. R. Baumgartner and C. Haudenschild, "Adhesion of Platelets to Subendothelium," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 201, pp. 22-36, 1972.
- [18] V. T. Turitto and H. R. Baumgartner, "Platelet interaction with subendothelium in flowing rabbit blood: effect of blood shear rate," *Microvasc Res*, vol. 17, pp. 38-54, Jan 1979.
- [19] V. T. Turitto and H. R. Baumgartner, "Platelet interaction with subendothelium in a perfusion system: physical role of red blood cells," *Microvasc Res*, vol. 9, pp. 335-44, May 1975.
- [20] P. D. Dee KC, Bizios R, *An introduction to tissue-biomaterial interactions*, 2002.
- [21] D. D'Andrea, M. Ravera, P. Golino, A. Rosica, M. De Felice, M. Ragni, P. Cirillo, F. Vigorito, N. Corcione, P. Tommasini, A. Gargiulo, O. Piro, P. Calabro, and M. Chiariello, "Induction of tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 23, pp. 1684-9, Sep 1 2003.
- [22] Y. Cadroy and S. R. Hanson, "Effects of red blood cell concentration on hemostasis and thrombus formation in a primate model," *Blood*, vol. 75, pp. 2185-93, Jun 1 1990.

- [23] S. Sevitt, "The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins," *J Clin Pathol*, vol. 27, pp. 517-28, Jul 1974.
- [24] J. P. Miletich, S. M. Prescott, R. White, P. W. Majerus, and E. G. Bovill, "Inherited predisposition to thrombosis," *Cell*, vol. 72, pp. 477-80, Feb 26 1993.
- [25] N. von Ahsen, P. Lewczuk, E. Schutz, M. Oellerich, and H. Ehrenreich, "Prothrombin activity and concentration in healthy subjects with and without the prothrombin G20210A mutation," *Thromb Res*, vol. 99, pp. 549-56, Sep 15 2000.
- [26] S. R. Poort, F. R. Rosendaal, P. H. Reitsma, and R. M. Bertina, "A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis," *Blood*, vol. 88, pp. 3698-703, Nov 15 1996.
- [27] L. Fåhræus, "The viscosity of blood in narrow capillary tubes," *Am J Physiol* vol. 96, p. 6, 1931.
- [28] F. Harding and M. H. Knisely, "Settling of sludge in human patients; a contribution to be biophysics of disease," *Angiology*, vol. 9, pp. 317-41, Dec 1958.
- [29] M. Cabel, H. J. Meiselman, A. S. Popel, and P. C. Johnson, "Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle," *Am J Physiol*, vol. 272, pp. H1020-32, Feb 1997.
- [30] S. Chien, "Blood rheology and its relation to flow resistance and transcapillary exchange, with special reference to shock," *Adv Microcirc*, vol. 89, 1969
- [31] H. Demiroglu, A. Gurlek, and I. Barista, "Enhanced erythrocyte aggregation in type 2 diabetes with late complications," *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, vol. 107, pp. 35-9, 1999.
- [32] G. Ruhenstroth-Bauer, P. Porz, N. Boss, W. Lehmacher, and D. Stamm, "The erythrocyte aggregation value as a measure of the risk of myocardial infarction and arteriosclerosis of peripheral arteries," *Clin Cardiol*, vol. 8, pp. 529-34, Oct 1985.
- [33] D. Samocha-Bonet, R. Ben-Ami, I. Shapira, G. Shenkerman, S. Abu-Abeid, N. Stern, T. Mardi, T. Tulchinski, V. Deutsch, S. Yedgar, G. Barshtein, and S. Berliner, "Flow-resistant red blood cell aggregation in morbid obesity," *Int J Obes Relat Metab Disord*, vol. 28, pp. 1528-34, Dec 2004.

- [34] S. M. Razavian, M. Del Pino, A. Simon, and J. Levenson, "Increase in erythrocyte disaggregation shear stress in hypertension," *Hypertension*, vol. 20, pp. 247-52, Aug 1992.
- [35] S. Chien, S. Usami, R. J. Dellenback, and C. A. Bryant, "Comparative hemorheology--hematological implications of species differences in blood viscosity," *Biorheology*, vol. 8, pp. 35-57, Jun 1971.
- [36] S. Bygdeman and R. Eliasson, "Effect of dextrans on platelet adhesiveness and aggregation," *Scand J Clin Lab Invest*, vol. 20, pp. 17-23, 1967.
- [37] S. Chien, "Aggregation of red blood cells: An electrochemical and colloid chemical problem," *Adv. Chem. Sci.*, vol. 188, pp. 3-38, 1980.
- [38] C. Pfafferoth, G. B. Nash, and H. J. Meiselman, "Red blood cell deformation in shear flow. Effects of internal and external phase viscosity and of in vivo aging," *Biophys J*, vol. 47, pp. 695-704, May 1985.
- [39] H. L. Goldsmith, D. N. Bell, S. Braovac, A. Steinberg, and F. McIntosh, "Physical and chemical effects of red cells in the shear-induced aggregation of human platelets," *Biophys J*, vol. 69, pp. 1584-95, Oct 1995.
- [40] S. R. Kellar and R. Skalak, "Motion of a tank-treading ellipsoidal particle in a shear flow," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 120, pp. 27-47, 1982.
- [41] D. Barthes-Biesel and H. Sgaier, "Role of membrane viscosity in the orientation and deformation of a spherical capsule suspended in shear flow," *Journal of Fluid Mechanics*, vol. 160, pp. 119-135, 1985.
- [42] K. H. Keller, "Effect of fluid shear on mass transport in flowing blood," *Fed Proc*, vol. 30, pp. 1591-9, Sep-Oct 1971.
- [43] S. Chien, "Biophysical behaviour of red cells in suspension, in surgenor," 2 ed Orlando, 1975.
- [44] H. L. Goldsmith, "The flow of model particles and blood cells and its relation to thrombogenesis," *Prog Hemost Thromb*, vol. 1, pp. 97-127, 1972.
- [45] B. Woldhuis, G. J. Tangelder, D. W. Slaaf, and R. S. Reneman, "Influence of dextrans on platelet distribution in arterioles and venules," *Pflugers Arch*, vol. 425, pp. 191-8, Nov 1993.

- [46] G. C. White, 2nd, D. E. Scarborough, and K. M. Brinkhous, "Morphological study of early phases of platelet adhesion to foreign surfaces: effect of calcium," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 416, pp. 351-62, 1983.
- [47] E. P. Diamandis and T. K. Christopoulos, "The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology," *Clin Chem*, vol. 37, pp. 625-36, May 1991.
- [48] S. C. Kuo and D. A. Lauffenburger, "Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength," *Biophys J*, vol. 65, pp. 2191-200, Nov 1993.
- [49] R. J. DeLange, "Egg white avidin. I. Amino acid composition; sequence of the amino- and carboxyl-terminal cyanogen bromide peptides," *J Biol Chem*, vol. 245, pp. 907-16, Mar 10 1970.
- [50] R. J. DeLange and T. S. Huang, "Egg white avidin. 3. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit," *J Biol Chem*, vol. 246, pp. 698-709, Feb 10 1971.
- [51] T. S. Huang and R. J. DeLange, "Egg white avidin. II. Isolation, composition, and amino acid sequences of the tryptic peptides," *J Biol Chem*, vol. 246, pp. 686-97, Feb 10 1971.
- [52] E. A. Bayer and M. Wilchek, "Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations," *J Chromatogr*, vol. 510, pp. 3-11, Jun 27 1990.
- [53] D. Savage, *Avidin biotin chemistry : a handbook.* : Pierce Chemical, 1992.
- [54] S. M. Hsu, L. Raine, and H. Fanger, "The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics," *Am J Clin Pathol*, vol. 75, pp. 816-21, Jun 1981.
- [55] Bangslabs, "TechNote 101 - ProActive microspheres," <http://www.bangslabs.com/technotes/101.pdf>, 2008.
- [56] N. S. White and R. J. Errington, "Fluorescence techniques for drug delivery research: theory and practice," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 57, pp. 17-42, Jan 2 2005.
- [57] F. Iurcat, *Niels Bohr et la physique quantique*, seuil ed.: points, 2001.



- [58] A. Bohr and B. R. Mottelson, *Nuclear structure. Vol.1 single-particle motion*. Copenhagen: W. A. Benjamin, 1969.
- [59] D. B. Shear, "The generalized Boltzmann distribution," *J Theor Biol*, vol. 39, pp. 165-9, Apr 1973.
- [60] Bangslabs, "TechNote 103 - Fluorescent/dyed microspheres," <http://www.bangslabs.com/technotes/103.pdf>, 2008.
- [61] F. S. Foster, H. Obara, T. Bloomfield, L. K. Ryan, and G. R. Lockwood, "ultrasound backscatter from blood in the 30 to 70Mhz frequency range," *IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings*, pp. 1599-1602, 1994.
- [62] M. G. De kroon, "Acoustic backscatter in arteries, measurements and modelling of arterial wall and blood," Rotterdam: Erasmus University, 1993, p. 144.
- [63] M. A. Hussain and S. Kar, "Relationship Between Power Law Coefficients and Major Blood Constituents Affecting the Whole Blood Viscosity," *J. Biosciences*, vol. 22, pp. 251-264, 1999.
- [64] G. M. Lanza and S. A. Wickline, "Targeted ultrasonic contrast agents for molecular imaging and therapy," *Curr Probl Cardiol*, vol. 28, pp. 625-53, Dec 2003.
- [65] R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T. M. Aminabhavi, "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives," *J Control Release*, vol. 125, pp. 193-209, Feb 11 2008.
- [66] A. K. Enjeti, L. F. Lincz, and M. Seldon, "Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology," *Semin Thromb Hemost*, vol. 33, pp. 771-9, Nov 2007.
- [67] E. M. Schaefer and S. Guimond, "Detection of protein tyrosine kinase activity using a high-capacity streptavidin-coated membrane and optimized biotinylated peptide substrates," *Anal Biochem*, vol. 261, pp. 100-12, Jul 15 1998.
- [68] X. Jiang, D. Li, X. Xu, Y. Ying, Y. Li, Z. Ye, and J. Wang, "Immunosensors for detection of pesticide residues," *Biosens Bioelectron*, vol. 23, pp. 1577-87, Jun 15 2008.

- [69] A. W. Tilles and E. C. Eckstein, "The near-wall excess of platelet-sized particles in blood flow: its dependence on hematocrit and wall shear rate," *Microvasc Res*, vol. 33, pp. 211-23, Mar 1987.
- [70] R. Arshady, "Microspheres for biomedical applications: preparation of reactive and labelled microspheres," *Biomaterials*, vol. 14, pp. 5-15, 1993.
- [71] Promega, "SAM<sup>2</sup> biotin capture membrane, instructions for use of products," Madison: <http://www.promega.com/tbs/tb547/tb547.pdf>, 2008.
- [72] B. Savage, P. R. McFadden, S. R. Hanson, and L. A. Harker, "The relation of platelet density to platelet age: survival of low- and high-density 111indium-labeled platelets in baboons," *Blood*, vol. 68, pp. 386-93, Aug 1986.
- [73] J. Cho, I. S. Kim, J. Moon, and B. Kwon, "Determining brownian and shear-induced diffusivity of nano- and micro-particles for sustainable membrane filtration," *Desalination*, vol. 188, pp. 213-216, 2006.
- [74] P. McNamara, W. Lew, and L. Han, "Fluorescent imaging and analysis with Typhoon 8600," *Electrophoresis*, vol. 22, pp. 837-42, Mar 2001.
- [75] Molecular dynamics, "Typhoon User's guide for microsoft windows NT and Apple Mac OS," Amersham: [http://imagers.salk.edu/typhoon/guides/Typhoon\\_UserGd.pdf](http://imagers.salk.edu/typhoon/guides/Typhoon_UserGd.pdf), 2008.
- [76] Amersham Biosciences, "ImageQuant TL User guide," Amersham: [http://www.chemistry.ohio-state.edu/shop\\_statements/Imager.pdf](http://www.chemistry.ohio-state.edu/shop_statements/Imager.pdf), 2008.
- [77] X. Weng, G. Cloutier, P. Pibarot, and L. G. Durand, "Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf, and normal human blood," *Biorheology*, vol. 33, pp. 365-77, Jul-Oct 1996.
- [78] M. Boynard and J. C. Lelievre, "Size determination of red blood cell aggregates induced by dextran using ultrasound backscattering phenomenon," *Biorheology*, vol. 27, pp. 39-46, 1990.
- [79] R. Zhao, J. N. Marhefka, F. Shu, S. J. Hund, M. V. Kameneva, and J. F. Antaki, "Micro-flow visualization of red blood cell-enhanced platelet concentration at sudden expansion," *Ann Biomed Eng*, vol. 36, pp. 1130-41, Jul 2008.
- [80] F. Gentile, C. Chiappini, D. Fine, R. C. Bhavane, M. S. Peluccio, M. M. Cheng, X. Liu, M. Ferrari, and P. Decuzzi, "The effect of shape on the margination

- dynamics of non-neutrally buoyant particles in two-dimensional shear flows," *J Biomech*, vol. 41, pp. 2312-8, Jul 19 2008.
- [81] L. L. Munn and M. M. Dupin, "Blood cell interactions and segregation in flow," *Ann Biomed Eng*, vol. 36, pp. 534-44, Apr 2008.
- [82] T. AlMomani, H. S. Udaykumar, J. S. Marshall, and K. B. Chandran, "Micro-scale dynamic simulation of erythrocyte-platelet interaction in blood flow," *Ann Biomed Eng*, vol. 36, pp. 905-20, Jun 2008.
- [83] H. L. Goldsmith and S. Spain, "Margination of leukocytes in blood flow through small tubes," *Microvasc Res*, vol. 27, pp. 204-22, Mar 1984.
- [84] P. A. Aarts, P. Steendijk, J. J. Sixma, and R. M. Heethaar, "Fluid shear as a possible mechanism for platelet diffusivity in flowing blood," *J Biomech*, vol. 19, pp. 799-805, 1986.
- [85] M. Eugster and W. H. Reinhart, "The influence of the haematocrit on primary haemostasis in vitro," *Thromb Haemost*, vol. 94, pp. 1213-8, Dec 2005.
- [86] C. Yeh and E. C. Eckstein, "Transient lateral transport of platelet-sized particles in flowing blood suspensions," *Biophys J*, vol. 66, pp. 1706-16, May 1994.
- [87] G. R. Cokelet, J. R. Brown, S. L. Codd, and J. D. Seymour, "Magnetic resonance microscopy determined velocity and hematocrit distributions in a Couette viscometer," *Biorheology*, vol. 42, pp. 385-99, 2005.
- [88] R. J. Phillips, R. C. Armstrong, R. A. Brown, A. L. Graham, and J. R. Abbott, "A constitutive equation for concentrated suspensions that accounts for shear-induced particle migration," *Phys. Fluids A*, vol. 4, pp. 30-40, 1992.
- [89] P. C.-H. Chan and L. G. Leal, "The motion of a deformable drop in a second order fluid," *J. Fluid Mech.*, vol. 92, pp. 131-170, 1979.
- [90] J. R. Abbott, N. Tetlow, and A. L. Graham, "Experimental observations of particule migration in concentrated suspensions : Couette flow," *J. Rheology*, vol. 35, pp. 773-95, Jul 1991.
- [91] A. L. Graham, "NMR imaging of shear-induced diffusion and structure in concentrated suspensions undergoing Couette flow," *J. Rheology*, vol. 35, pp. 191-201, Jan 1991.

- [92] A. W. Chow, S. W. Sinton, and I. J.H., "Shear-induced particle migration in Couette and parallel-plate viscometers: NMR imaging and stress measurements," *Phys. Fluids A*, vol. 6, pp. 2561-2576, 1997.
- [93] F. Gadala-Maria and A. Acrivos, "Shear-induced structure in a concentrated suspension of solid spheres," *J. Rheology*, vol. 24, pp. 799-811, 1980.
- [94] M. S. Ingber, A. L. Graham, L. A. Mondy, and Z. Fang, "An improved constitutive model for concentrated suspensions accounting for the shear-induced particle migration rate dependence on particle radius," *Int. J. Mult. flow*, vol. 35, pp. 270-276, 2009.
- [95] A. Karnis and S. G. Mason, "Particule motions in sheared suspensions. XXIII. Wall migration of fluid drops.," *J. Colloid interface Sci.*, vol. 24, pp. 167-169, 1967.
- [96] D. Leighton and A. Acrivos, "The shear-induced migration of particles in concentrated suspensions," *J. Fluid Mech.*, vol. 181, pp. 415-39, 1987.
- [97] N. Tetlow and A. L. Graham, "Particle migration in a Couette apparatus: Experiment and modeling," *J. Rheology*, vol. 42, pp. 307-27, 1998.
- [98] W. S. Uijttewaal, E. J. Nijhof, P. J. Bronkhorst, E. Den Hartog, and R. M. Heethaar, "Near-wall excess of platelets induced by lateral migration of erythrocytes in flowing blood," *Am J Physiol*, vol. 264, pp. H1239-44, Apr 1993.
- [99] C. R. Valeri, H. MacGregor, G. Cassidy, R. Tinney, and F. Pompei, "Effects of temperature on bleeding time and clotting time in normal male and female volunteers," *Crit Care Med*, vol. 23, pp. 698-704, Apr 1995.
- [100] J. Valles, M. T. Santos, J. Aznar, A. J. Marcus, V. Martinez-Sales, M. Portoles, M. J. Broekman, and L. B. Safier, "Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment," *Blood*, vol. 78, pp. 154-62, Jul 1 1991.
- [101] W. W. Duke, "The relation of blood platelets to hemorrhagic disease. By W.W. Duke," *JAMA*, vol. 250, pp. 1201-9, Sep 2 1983.
- [102] A. J. Hellem, C. F. Borchgrevink, and S. B. Ames, "The role of red cells in haemostasis: the relation between haematocrit, bleeding time and platelet adhesiveness," *Br J Haematol*, vol. 7, pp. 42-50, Jan 1961.

- [103] J. M. Gerrard, J. C. Docherty, S. J. Israels, M. S. Cheang, A. J. Bishop, N. L. Kobrinsky, M. L. Schroeder, and E. D. Israels, "A reassessment of the bleeding time: association of age, hematocrit, platelet function, von Willebrand factor, and bleeding time thromboxane B2 with the length of the bleeding time," *Clin Invest Med*, vol. 12, pp. 165-71, Jun 1989.
- [104] L. A. Harker and S. J. Slichter, "The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function," *N Engl J Med*, vol. 287, pp. 155-9, Jul 27 1972.
- [105] F. Fernandez, C. Goudable, P. Sie, H. Ton-That, D. Durand, J. M. Suc, and B. Boneu, "Low haematocrit and prolonged bleeding time in uraemic patients: effect of red cell transfusions," *Br J Haematol*, vol. 59, pp. 139-48, Jan 1985.
- [106] C. R. Valeri, G. Cassidy, L. E. Pivacek, G. Ragno, W. Lieberthal, J. P. Crowley, S. F. Khuri, and J. Loscalzo, "Anemia-induced increase in the bleeding time: implications for treatment of nonsurgical blood loss," *Transfusion*, vol. 41, pp. 977-83, Aug 2001.
- [107] R. P. Rodgers and J. Levin, "A critical reappraisal of the bleeding time," *Semin Thromb Hemost*, vol. 16, pp. 1-20, Jan 1990.
- [108] J. G. Kelton, D. J. Hunter, and P. B. Neame, "A platelet function defect in preeclampsia," *Obstet Gynecol*, vol. 65, pp. 107-9, Jan 1985.
- [109] R. E. Wells, Jr. and E. W. Merrill, "The variability of blood viscosity," *Am J Med*, vol. 31, pp. 505-9, Oct 1961.
- [110] J. J. Michiels, "Erythromelalgia and vascular complications in polycythemia vera," *Semin Thromb Hemost*, vol. 23, pp. 441-54, 1997.
- [111] G. D. O. Lowe, "agents lowering blood viscosity, including defibrinogenating agents," in *Cardiovascular thrombosis - Thrombocardiology and thromboneurology*, 2nd ed, V. Verstraete, V. Fuster, and E. Topol, Eds. Philadelphia: Lippincott-raven, 1998, pp. 321-333.
- [112] H. C. Kwaan and A. Bongu, "The hyperviscosity syndromes," *Semin Thromb Hemost*, vol. 25, pp. 199-208, 1999.
- [113] "Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia," *Ann Intern Med*, vol. 123, pp. 656-64, Nov 1 1995.

- [114] H. C. Kwaan and J. Wang, "Hyperviscosity in polycythemia vera and other red cell abnormalities," *Semin Thromb Hemost*, vol. 29, pp. 451-8, Oct 2003.

## Annexes A

Équations de Navier-Stokes en coordonnée polaire pour un fluide non Newtonien:

$$\rho \left( \frac{\partial v_r}{\partial t} + v_r \frac{\partial v_r}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r} \frac{\partial v_r}{\partial \theta} - \frac{v_\theta^2}{r} + v_z \frac{\partial v_r}{\partial z} \right) = - \left[ \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r \tau_{rr}) + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta} \tau_{\theta r} + \frac{\partial}{\partial z} \tau_{zr} - \frac{\tau_{\theta\theta}}{r} \right] - \frac{\partial p}{\partial r} + \rho g_r$$

$$\rho \left( \frac{\partial v_\theta}{\partial t} + v_r \frac{\partial v_\theta}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r} \frac{\partial v_\theta}{\partial \theta} - \frac{v_r v_\theta}{r} + v_z \frac{\partial v_\theta}{\partial z} \right) = - \left[ \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \tau_{r\theta}) + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta} \tau_{\theta\theta} + \frac{\partial}{\partial z} \tau_{z\theta} + \frac{\tau_{\theta r} - \tau_{r\theta}}{r} \right] - \frac{1}{r} \frac{\partial p}{\partial \theta} + \rho g_\theta$$

$$\rho \left( \frac{\partial v_z}{\partial t} + v_r \frac{\partial v_z}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r} \frac{\partial v_z}{\partial \theta} + v_z \frac{\partial v_z}{\partial z} \right) = - \left[ \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} (r \tau_{rz}) + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial \theta} \tau_{\theta z} + \frac{\partial}{\partial z} \tau_{zz} \right] - \frac{\partial p}{\partial z} + \rho g_z$$

La seule contrainte qui varie dans un rhéomètre de Couette est la contrainte de  $\theta$  selon  $r$ , soit  $\tau_{r\theta}$ .

De plus, les forces de gravité sont considérées comme négligeables dans le fluide.

Conditions limites d'un écoulement de Couette :

La vitesse selon  $r$ ,  $V_r=0$

La vitesse selon  $z$ ,  $V_z=0$

Le déplacement selon  $\theta$  est constant :  $\frac{\partial v_\theta}{\partial \theta} = 0$

Le déplacement selon  $z$  est constant :  $\frac{\partial v_\theta}{\partial z} = 0$

La pression selon  $\theta$  est constante :  $\frac{\partial p}{\partial \theta} = 0$

La vitesse est constante dans le temps :  $\frac{\partial v_\theta}{\partial t} = 0$

Après simplification on obtient : 
$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \tau_{r\theta}) = 0 \quad (1)$$

La viscosité peut s'exprimer en fonction du cisaillement par le modèle de puissance:

$$\mu = \mu_0 |\dot{\gamma}|^{n-1}$$

La composante  $\tau_{r\theta}$  de la contrainte s'écrit :  $\tau_{r\theta} = \mu \dot{\lambda}_{r\theta}$

La composante  $\dot{\gamma}_{r\theta}$  du tenseur de cisaillement, en coordonnée polaire, s'écrit :

$$\frac{1}{r} \frac{\partial v_r}{\partial \theta} + r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right)$$

La composante de la vitesse de  $r$  selon  $\theta$  est nulle de ce fait :  $\dot{\gamma}_{r\theta} = r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right)$

On obtient alors :

$$\begin{aligned} \tau_{r\theta} &= \mu_0 |\dot{\gamma}_{r\theta}|^{n-1} \cdot \dot{\gamma}_{r\theta} \\ \tau_{r\theta} &= \mu_0 \dot{\gamma}_{r\theta}^n \end{aligned} \quad (2)$$

On insère (2) dans (1) et on réarrange l'équation pour déterminer  $V_\theta$ :



$$\begin{aligned}
-\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \mu_0 \dot{\gamma}_{r\theta}^n) &= \frac{\partial}{\partial r} (r^2 \mu_0 \dot{\gamma}_{r\theta}^n) = 0 \\
(r^2 \mu_0 \dot{\gamma}_{r\theta}^n) &= cst = \alpha \\
(\dot{\gamma}_{r\theta})^n &= \frac{\alpha}{r^2} \\
\dot{\gamma}_{r\theta} &= \frac{\alpha}{r^{2/n}} \\
\dot{\gamma}_{r\theta} &= r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right) = \frac{\alpha}{r^{2/n}} \\
\frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right) &= \frac{\alpha}{r^{2/n+1}} = \alpha r^{-(2/n+1)} \\
\frac{v_\theta}{r} &= \alpha \left( -\frac{2}{n} - 1 + 1 \right) r^{-(2/n+1)} = \frac{\alpha}{r^{2/n}} + \beta \quad , \text{ noter que } -2/n \text{ est int\egr}e \text{ dans la} \\
v_\theta &= r \left( \frac{\alpha}{r^{2/n}} + \beta \right)
\end{aligned} \tag{3}$$

Pour r\esoudre l'\e'quation (3) et d\eterminer  $\alpha$  et  $\beta$ , on d\efinit les conditions aux limites :

$v_\theta$  repr\esente la vitesse angulaire que l'on d\efinira par  $w$

Les deux cylindres du rh\eam\etre sont de diam\etre  $R_1$  (interne) et  $R_2$  (externe) et la vitesse angulaire au bord de :

$$R_1 = w_1 \text{ et } R_2 = w_2$$

On obtient alors deux \e'quations \a deux inconnues :

$$\begin{aligned}
R_1 w_1 &= R_1 \left( \frac{\alpha}{R_1^{2/n}} + \beta \right) \\
R_2 w_2 &= R_2 \left( \frac{\alpha}{R_2^{2/n}} + \beta \right)
\end{aligned}$$

Détermination de  $\beta$  :

$$\left. \begin{aligned} (w_1 - \beta)R_1^{2/n} &= \alpha \\ (w_2 - \beta)R_2^{2/n} &= \alpha \end{aligned} \right\} \quad \left( \frac{w_1 - \beta}{w_2 - \beta} \right) = \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n}$$

$$(w_1 - \beta) = (w_2 - \beta) \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n}$$

$$(w_1 - \beta) = w_2 \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - \beta \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n}$$

$$w_1 + \beta \left( \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - 1 \right) = w_2 \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n}$$

$$\beta = \frac{w_2 \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - w_1}{\left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - 1} \quad (4)$$

Détermination de  $\alpha$  :

$$(w_1 - \beta)R_1^{2/n} = \alpha$$

$$\left[ w_1 - \frac{w_2 \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - w_1}{\left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - 1} \right] R_1^{2/n} = \alpha$$

$$\frac{\left( w_1 \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - w_1 - w_2 \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} + w_1 \right) R_1^{2/n}}{\left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - 1} = \alpha$$

$$\frac{R_2^{2/n} (w_1 - w_2)}{\left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - 1} = \frac{w_1 - w_2}{\left( \frac{R_2^{2/n} - R_1^{2/n}}{R_1^{2/n}} \right) R_2^{-2/n}} = \frac{w_1 - w_2}{\frac{1 - R_1^{2/n} R_2^{-2/n}}{R_1^{2/n}}} = \frac{w_1 - w_2}{\frac{1}{R_1^{2/n}} - \frac{1}{R_2^{2/n}}} = \alpha$$

$$\alpha = \frac{\frac{w_1 - w_2}{R_2^{2/n} - R_1^{2/n}}}{(R_1 R_2)^{2/n}} \quad (5)$$

On réinjecte (4) et (5) dans (3) :

$$v_\theta(r) = r \left( \frac{\frac{w_1 - w_2}{R_2^{2/n} - R_1^{2/n}}}{(R_1 R_2)^{2/n}} + \frac{w_2 \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - w_1}{\left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} - 1} \right)$$

En ce qui concerne les vitesses angulaires aux limites du rhéomètre de Couette (i.e. aux parois) :

Cylindre interne  $R_1$  est mobile  $\Rightarrow w_1 = w_{\max}$  soit  $\boxed{v_\theta(R_1) = R_1 w_1}$

Cylindre externe  $R_2$  est fixe  $\Rightarrow w_2 = 0$  soit  $\boxed{v_\theta(R_2) = 0}$

La solution de l'équation est alors :

$$v_\theta(r) = r w_1 \left( \frac{1 - \left( \frac{R_2}{r} \right)^{2/n}}{1 - \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n}} \right) \quad (6)$$

Comme  $v_\theta(r) = r w$ , on peut alors exprimer  $w(r)$  :

$$w(r) = w_1 \left( \frac{1 - \left(\frac{R_2}{r}\right)^{2/n}}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \right) \quad (7)$$

Cela va nous permettre de déterminer le cisaillement puisque nous savons que :

$$\dot{\gamma} = r \frac{\partial w}{\partial r} = r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right)$$

Soit :

$$\begin{aligned} r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right) &= r \frac{\partial}{\partial r} \left[ w_1 \left( \frac{1 - \left(\frac{R_2}{r}\right)^{2/n}}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \right) \right] \\ r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right) &= r \left( \frac{w_1}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \cdot \left( - \left( -\frac{2}{n} \right) \frac{R_2^{2/n}}{r^{2/n+1}} \right) \right) \\ r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right) &= r \frac{2}{n} \frac{w_1}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \cdot \left( \frac{R_2^{2/n}}{r^{2/n+1}} \right) \end{aligned}$$

Le cisaillement s'écrit alors :

$$\dot{\gamma} = r \frac{\partial}{\partial r} \left( \frac{v_\theta}{r} \right) = \frac{2}{n} \frac{w_1}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \cdot \left( \frac{R_2^{2/n}}{r^{2/n}} \right) \quad (8)$$

Pour un fluide Newtonien, c'est-à-dire pour  $n = 1$  nous obtenons alors;

$$\begin{aligned}
w(r) &= w_1 \left( \frac{1 - \left(\frac{R_2}{r}\right)^{2/n}}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \right) \\
w(r) &= w_1 \frac{r^2 - R_2^2}{R_1^2 - R_2^2} \\
w(r) &= w_1 \frac{r^2}{R_1^2} \\
w(r) &= w_1 \frac{(r^2 - R_2^2)R_1^2}{(R_1^2 - R_2^2)r^2} \tag{9}
\end{aligned}$$

et

$$\begin{aligned}
\dot{\gamma}(n=1) &= 2 \frac{rw_1}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^2} * \left(\frac{R_2^2}{r^{2+1}}\right) \\
\dot{\gamma}(n=1) &= \frac{2rw_1}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^2} \frac{R_2^2}{r^3} = \frac{2w_1R_2^2}{\frac{R_1^2 - R_2^2}{R_1^2} r^2} \\
\dot{\gamma}(n=1) &= \frac{2w_1R_2^2R_1^2}{(R_1^2 - R_2^2)r^2} \tag{10}
\end{aligned}$$

Il est aussi possible d'estimer la variation maximale du taux de cisaillement présent dans l'entrefer du Couette en utilisant l'équation suivante :

$$\Delta\dot{\gamma} = 100 * \left| 1 - \frac{\dot{\gamma}(R_1)}{\dot{\gamma}(R_2)} \right|$$

On peut alors calculer les deux cisaillements :

$$\dot{\gamma}(R_1) = \frac{2}{n} \frac{w_1}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \cdot \left(\frac{R_2^{2/n}}{R_1^{2/n}}\right)$$

$$\dot{\gamma}(R_1) = \frac{2w_1}{n} \frac{1}{\frac{R_1^{2/n} - R_2^{2/n}}{R_1^{2/n}}} \cdot \left(\frac{R_2^{2/n}}{R_1^{2/n}}\right)$$

et

$$\dot{\gamma}(R_2) = \frac{2}{n} \frac{w_1}{1 - \left(\frac{R_2}{R_1}\right)^{2/n}} \cdot \left(\frac{R_2^{2/n}}{R_2^{2/n}}\right)$$

$$\dot{\gamma}(R_2) = \frac{2w_1}{n} \frac{1}{\frac{R_1^{2/n} - R_2^{2/n}}{R_1^{2/n}}} \tag{10}$$

soit

$$\Delta\dot{\gamma} = 100 \cdot \left| 1 - \frac{\left[ \frac{2w_1}{n} \frac{1}{\frac{R_1^{2/n} - R_2^{2/n}}{R_1^{2/n}}} \cdot \left(\frac{R_2^{2/n}}{R_1^{2/n}}\right) \right]}{\left[ \frac{2w_1}{n} \frac{1}{\frac{R_1^{2/n} - R_2^{2/n}}{R_1^{2/n}}} \right]} \right|$$

$$\Delta \dot{\gamma} = 100 \left| 1 - \left( \frac{R_2}{R_1} \right)^{2/n} \right| \quad (11)$$

## **Annexes B**

### **I - Collecte et préparation du sang de porc**

#### **Étape A : Centrifugation du sang**

- Verser 3 g d'EDTA dilué dans 15 ml de solution saline dans 2 récipients de 1.5 litres.
- Aller à l'abattoir et verser le sang de porc frais dans les deux récipients. Le sang doit provenir du même porc.
- Fermer et secouer doucement pour mélanger l'EDTA avec le sang.
- Retourner au laboratoire.
- Verser le sang dans douze tubes de 50 ml (Sarstedt 50 ml centrifuge tube) et mélanger délicatement la solution.
- Peser les contenants remplis afin de vérifier qu'ils possèdent la même masse (important pour éviter que la centrifugeuse ne vibre).
- Si les masses sont différentes, rajouter le sang pour équilibrer.
- Installer les tubes dans la centrifugeuse (Beckman centrifuge J6-MI, USA). Les placer aux endroits opposés pour équilibrer la masse.
- Refermer le couvercle de la centrifugeuse.
- Actionner le «Main Power».
- Ajuster la minuterie à 15 minutes.
- Choisissez le rotor 4.2, ajuster la vitesse de rotation à 2500 RPM et la température aux environs de 25 degrés.
- Appuyer sur «Start».



-Pendant les premières secondes de la rotation, tenir la machine pour éviter qu'elle ne vibre trop.

-A la fin de la centrifugation, retirer le plasma de chaque tube à l'aide d'une pipette, et le recueillir dans un autre contenant.

-retirer ensuite le *buffy coat* (globules blancs + plaquettes) et le jeter dans l'évier.

-Ajouter de l'eau saline aux globules rouges restants dans les tubes.

-Mélanger délicatement afin de s'assurer qu'il n'y a pas de dépôt d'érythrocytes dans le fond de chaque tube.

-Refaire les étapes de centrifugation deux autres fois (afin de s'assurer que le plasma est bien été complètement enlevé).

-Prendre les tubes de plasma. La centrifugation du plasma permet d'enlever les éventuelles plaquettes encore présente.

-Peser les contenants remplis afin de vérifier qu'ils possèdent la même masse.

-Installer les tubes dans la centrifugeuse (Beckman centrifuge J6-MI, USA). Les placer aux endroits opposés pour équilibrer la masse.

-Refermer le couvercle de la centrifugeuse.

-Actionner le «Main Power».

-Ajuster la minuterie à 15 minutes.

-Choisissez le rotor JA-25.5, ajuster la vitesse de rotation à 1500 G et la température aux environs de 25 degrés.

-Appuyer sur «Start».

-Pendant les premières secondes de la rotation, tenir la machine pour éviter qu'elle ne vibre trop.

**Étape B : déterminer l'hématocrite du sang centrifugé**

- Verser tous les globules rouges dans un même bécher de 500 ml.
- Bien mélanger.
- Utiliser un capillaire pour recueillir l'échantillon de globules rouges.
- Incliner le capillaire pour permettre au liquide de monter par capillarité.
- Former un bouchon dans le capillaire pour éviter que le sang ne soit éjecté lors de la centrifugation.
- Allumer la centrifugeuse et ouvrir le couvercle
- Dévisser la plaque circulaire.
- Placer le capillaire dans la centrifugeuse (le côté bouché vers l'extérieur).
- Revisser la plaque avant de refermer le couvercle de la centrifugeuse.
- Actionner la centrifugeuse pendant 10 minutes à une vitesse de 12000 RPM.
- Mesurer le capillaire centrifugé sur le diagramme HERAEUS pour déterminer son hématocrite.
- Noter les hématocrites obtenus.
- Une fois terminé, jeter les capillaires dans une poubelle biologique.

**Étape C : Préparation des échantillons sanguins**

Pour chaque échantillon sanguin à préparer, appliquer cette équation :

$$(H_f - H_1) * V_1 = (H_2 - H_f) * V_2$$

Ainsi,

Hf : hématocrite voulu

H1 et V1 : hématocrite et volume de la solution diluante

H2 et V2 : hématocrite et volume du sang centrifugé

Faisons un exemple d'application pour le H40. En appliquant l'équation :

H1=0% (parce que l'eau saline n'a pas de globule rouge)

V1=40 mL (volume de GR)

Hf=40% (hématocrite voulu)

H2=90% (l'hématocrite est élevé puisque le sang a été centrifugé trois fois, mais jamais à 100%)

V2= est à déterminer  $(40-0)*35 = (90-40)*V2 \Leftrightarrow V2= 32 \text{ mL}$

-Une fois les dosages établis, verser chaque volume dans un bécher de 80ml.

### **Étape D : Vérification des hématocrites des deux échantillons**

-Recommencer l'étape C pour mesurer l'hématocrite de l'échantillon.

-Si l'hématocrite est supérieur à 2% par rapport à la valeur désirée, corriger à nouveau l'hématocrite avec l'équation :  **$(Hf-H1)*V1=(H2-Hf)*V2$**

Par exemple :

Si on obtient un H35 et on veut le recorriger à H40.

H1=35%

V1=70 mL (le volume de la solution à corriger)

Hf=40% (hématocrite voulu)

H2=90%

$V_2 = \text{inconnu}$

$$(40-35) \cdot 70 = (90-40) \cdot V_2$$

$V_2 = 7 \text{ mL}$  de globules rouges à rajouter

**N.B. Un programme développé sous Matlab 7.0.4 a été mis en place pour calculer les étapes C et D de façon automatique.**

## **II – Protocole expérimental**

### **Étape A : Préparation de l'agar**

- Préparer l'agar (3 g d'agar + 8 mL de glycérol + eau distillée complétée à 100 mL).
- Bouillir la solution au four à micro-ondes jusqu'à ébullition pendant au moins 2 minutes (diminuer la puissance du four à micro-ondes pour éviter le débordement).
- Si la solution est déjà préparée, la réchauffer au four à micro-ondes pendant 1 minute.
- Dégazer l'agar à l'aide de la pompe à vide jusqu'à ce que toutes les bulles de la solution aient disparues.
- Enlever le cylindre externe du Couette.
- À l'aide d'une seringue de 50 ml, aspirer le plus d'agar possible.
- Laisser couler l'agar dans la fente du Couette.
- Attendre environ 5-10 minutes pour que l'agar sèche.
- Éliminer le surplus d'agar sec à l'aide d'un scalpel, ou d'un rasoir, pour s'assurer que la surface interne du cylindre soit lisse.

### **Étape B : préparation du mélange dans la seringue**

- Aspirer 1 ml de l'échantillon sanguin à étudier dans une seringue de 3 ml.
- Placer le contenant des microparticules sur un vortex, pendant 10 secondes à une vitesse moyenne, afin de dissocier les microparticules agrégées
- Aspirer 300  $\mu$ l de solution de microparticules dans une micropipette.
- Positionner l'embout de la micropipette dans la sortie de la seringue.
- En même temps, éjecter la solution de la micropipette et aspirer la avec la seringue.
- Mélanger la solution sang + microparticules.
- Fixer une aiguille de 15.24 cm (B-D intradiscal therapy needle 18G6) sur la seringue.

### **Étape C : Préparation des membranes SAM<sup>2</sup>**

- Mettre des gants.
- Sortir la feuille SAM<sup>2</sup> du congélateur.
- À l'aide d'une lame de cutter (ou autre instrument coupant), découper deux membranes en suivant les lignes de pré-découpage.
- Noter le numéro inscrit sur chacune des membranes.
- Prendre un adhésif commercial en spray (Nashua covalente adhesives 357).
- Vaporiser cet adhésif dans un contenant en plastique (une couche d'adhésif se formera dans le contenant).
- Tremper un pinceau dans le contenant, et enduire légèrement l'envers d'une membrane.

-Prendre la membrane et la coller sur la partie externe du cylindre interne, au centre de la fente du Couette et à une hauteur de 3-3.5 cm par rapport à la base du Couette (les distances sont mesurées à partir du centre de la membrane).

-Recommencer la procédure de collage pour la deuxième membrane, et la coller sur la partie interne du cylindre externe, à droite de la fente (l'arc entre la position de la membrane et le milieu de la fente est de 7 cm) et à une hauteur de 3-3.5 cm par rapport à la base du Couette.

### **Étape D : Installation du sang dans le Couette**

-Remonter le cylindre interne à l'aide de la manivelle.

-Verser les 69 mL de l'échantillon à étudier dans le Couette (le même échantillon sanguin qu'il y a dans la seringue).

-Redescendre le cylindre interne du Couette jusqu'à ce que tout l'échantillon soit emprisonné dans l'entrefer.

### **Étape E : Mise en place du pousse-seringue**

-Positionner le pousse-seringue en face du Couette.

-Mettre le pousse-seringue sous tension.

-Entrer le diamètre du pousse-seringue (pour une seringue de 3 cc B-D,  $\varnothing=8.66$  mm).

-Entrer la valeur du débit correspondant au test (pour une étude à un cisaillement de  $2 \text{ s}^{-1}$ , le débit est de 0.6 ml/min. Pour une étude à un cisaillement de  $10 \text{ s}^{-1}$ , le débit est de 3 ml/min).

-Insérer l'aiguille de la seringue dans l'entrefer au travers de l'agar. L'embout de l'aiguille doit se trouver juste un peu en-dessous du milieu de l'entrefer (0.8 mm à partir de la partie interne du cylindre externe) pour assurer une éjection de la solution dans la seringue au centre de l'entrefer.

-Installer la seringue dans le pousse-seringue, et s'assurer que la seringue est bien horizontale.

### **Étape F : Contrôle de la vitesse angulaire du moteur pas-à-pas et du pousse-seringue**

-Démarrer l'ordinateur.

-Démarrer le contrôleur du moteur pas-à-pas.

-Démarrer le logiciel Matlab.

-Exécuter le programme de contrôle du moteur (le Couette tourne à une vitesse de  $500 \text{ s}^{-1}$  afin de brasser le sang).

-Attendre que le Couette ait tourné pendant 30 sec (au bout des 30 sec de brassage, la membrane collée sur le cylindre mobile doit se trouver juste à gauche de la seringue).

-Exécuter le pousse-seringue.

-L'éjection du mélange dans la seringue se fait en une révolution du Couette.

-À la fin de l'éjection, retirer l'aiguille de l'entrefer.

-Attendre que le Couette ait fait deux tours supplémentaires.

-Remonter aussitôt le cylindre interne avec la manivelle pour que le niveau de l'échantillon dans le Couette descende en dessous des membranes.

-Retirer le sang du Couette et le verser dans un récipient (étapes F).

### **Étape G : Lavage des membranes**

- Prendre deux contenants stérilisés et mettre de l'eau distillée dedans.
- Décoller les membranes à l'aide de forceps.
- Mettre chaque membrane dans un contenant.
- Démarrer la plateforme oscillante.
- Suivre le protocole de lavage.
- Une fois le protocole de lavage terminé, prendre toutes les membranes, les mettre dans un contenant et dans un réfrigérateur afin de les maintenir entre 2 et 8 °C.

### **Étape H : Changer d'échantillon sanguin**

- Remonter le cylindre interne avec la manivelle.
- Retirer le cylindre externe et verser doucement le sang contenu dans son bécher correspondant.
- Rincer le cylindre externe avec de l'eau pour enlever toute trace de sang et de microparticules.
- Verser le prochain échantillon à étudier dans le cylindre externe du Couette.

### **III – Quantification de la fluorescence**

Toutes les prochaines étapes doivent être réalisées aux laboratoires communs d'Angus.



**Étape A : Scan des membranes (les mots en italique représentent les termes exactes qui se trouvent sur l'interface informatique du Typhoon PhosphorImager)**

- Ouvrir l'interface informatique du Typhoon PhosphorImager.
- Régler le mode d'acquisition (*acquisition mode*) sur : *fluorescente*.
- Régler la taille du pixel (*pixel size*) à 25 µm.
- Régler le plan focal (*focal plane*) sur *platen* et cocher la case *press sample*.
- Régler le filtre d'émission et d'excitation (dans *fluorescent setup window*); choisir le filtre bleu, soit une longueur d'onde de 488 nm pour l'excitation (la longueur d'onde d'émission se règle automatiquement).
- Toujours dans *fluorescent setup window*, régler le PMT voltage a 430 volts.
- Ouvrir le couvercle du Typhoon PhosphorImager, positionner la membrane sur la vitre de l'instrument. Le côté numéroté de la membrane doit se trouver en contact avec la vitre (le rayon du laser traverse la vitre par en dessous, il faut donc que la membrane soit retournée).
- Repérer la position de la membrane grâce au quadrillage (chiffre en horizontal et lettre en vertical).
- Régler la zone à scanner sur l'interface en se servant du quadrillage.
- Régler et repérer le chemin du dossier où se trouvent les scans enregistrés.
- Appuyer sur *SCAN*.

**Étape B : Quantification de la fluorescence avec le microscope Zeiss**

- Retirer la bâche qui recouvre le microscope.
- Allumer la lumière fluorescente (*fluoarc*).

- Choisir la lentille 10X.
- Mettre la membrane sur une lame. Si la membrane n'est pas lisse, mettre un peu d'eau distillée dessus afin de l'aplatir.
- Placer la lame sur la platine du microscope.
- Éteindre la lumière du local.
- Visualiser les membranes. Utiliser les molettes situées sur le côté du microscope pour qu'il se déplace spatialement sur la membrane. Utiliser le planétaire situé près des lentilles pour régler la zone focale de la lentille utilisée (sinon l'image perçue sera floue).
- Commencer au coin haut gauche de la membrane et compter le nombre de particules présentes. Utiliser la molette pour se décaler vers la droite et/ou vers le bas.
- Une fois toute la membrane visualisée, garder en mémoire, dans un cahier de laboratoire, le nombre de particules comptées (se servir du numéro de la membrane comme repère).
- Recommencer la même procédure pour toutes les membranes.
- Une fois la quantification de toutes les membranes terminée, éteindre la lumière fluorescente, et attendre 30 min avant de recouvrir le microscope avec la bâche.

### **Étape C : Quantification de la fluorescence avec ImageQuant 2005**

- Lancer le programme ImageQuant 2005 et choisir la palette d'outils *colony count*.
- Régler la taille de l'opérateur (*operator size*) à 7.
- Laisser les autres paramètres inchangés.
- Ouvrir le scan de la membrane à quantifier (le scan de la membrane s'affiche sur l'interface).
- Sélectionner avec la souris la zone d'intérêt (encadrer toute la membrane).

- Aussitôt que la zone d'intérêt est sélectionnée, le programme quantifie automatiquement le nombre de particules fluorescentes présentes sur toute la surface de la membrane.

- Vérifier si la quantification est similaire à la quantification faite au microscope (en règle générale, ImageQuant détectera légèrement plus de particules que l'œil humain).

- Si la différence entre la quantification au microscope et avec ImageQuant diffère de plus de 100 particules, alors réajuster la sensibilité en jouant avec le paramètre *sensitivity*.

- Une fois la quantification automatique terminée, appuyer sur *next* afin de passer à la prochaine étape.

- Les particules qui n'ont pas été détectées automatiquement peuvent être rajoutées manuellement en sélectionnant le bouton *draw feature* et en cliquant sur la microparticule à rajouter avec la souris (cette option permet d'affiner la quantification mais n'est pas obligatoire).

- Les colonies peuvent aussi être retirées en utilisant le bouton *erase feature* et en cliquant sur la colonie à retirer avec la souris.

- Une fois la quantification manuelle terminée, appuyer sur *next* afin de passer à la prochaine étape.

- La quantification est terminée.

- Garder en mémoire, dans un cahier de laboratoire, le nombre de particules comptées (se servir du numéro de la membrane comme repère).

- Recommencer la procédure pour toutes les membranes.

## Annexes C

Tableau 9 – Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM<sup>2</sup>, fixes et mobiles, dans une solution saline et une solution saline + dextran, à un cisaillement de 2 s<sup>-1</sup> et 10 s<sup>-1</sup>.

Cisaillement	Saline				Dextran + saline			
	2 s <sup>-1</sup>		10 s <sup>-1</sup>		2 s <sup>-1</sup>		10 s <sup>-1</sup>	
Série	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe
1	40	11	185	118	110	86	135	96
2	102	91	115	84	144	20	86	35
3	68	54	-	97	-	109	30	27
4	110	41	106	94	22	10	158	66
5	-	86	71	44	32	17	35	30
6	-	-	81	30	-	-	-	-
7	-	-	62	45	-	-	-	-
Moyenne ± Écart type	80 ± 32,29	56,6 ± 33,08	103,33 ± 44,87	73,14 ± 33,26	77 ± 59,52	48,4 ± 45,70	88,8 ± 57,63	50,8 ± 29,68
Médiane	85	54	93,5	84	71	20	86	35

Tableau 10 - Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM<sup>2</sup>, fixes et mobiles, dans du sang non agrégeant, à un cisaillement de 2 s<sup>-1</sup> et à 20%, 40% et 60% d'hématocrite.

Hématocrite	Échantillons non agrégeants					
	20%		40%		60%	
Série	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe
1	120	77	626	86	1390	1051
2	152	88	508	177	1095	745
3	199	61	594	-	1326	713
4	106	55	589	468	1298	982
5	173	18	500	-	1391	1007
6	158	118	-	-	1127	1015
7	-	-	-	-	1208	754
8	-	-	-	-	1496	879
9	-	-	-	-	1253	1105
10	-	-	-	-	1301	1157
11	-	-	-	-	1293	-
Moyenne ± Écart type	151,33± 34,13	69,50± 33,72	565,80± 52,90	243,67± 199,54	1288,91± 116,96	940,80± 158,60
Médiane	155	69	591	177	1298	994,5

Tableau 11 - Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM<sup>2</sup>, fixes et mobiles, dans du sang agrégé, à un cisaillement de 2 s<sup>-1</sup> et à 20%, 40% et 60% d'hématocrite.

Hématocrite	Échantillons agrégés					
	20%		40%		60%	
	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe
<b>Série</b>						
1	-	263	795	-	1538	886
2	524	245	884	642	1753	676
3	402	145	1313	727	1738	1415
4	418	-	1309	515	1793	1293
5	358	177	1257	-	1705	891
6	423	180	844	530	1709	-
7	420	167	1138	-	1627	981
<b>Moyenne ± Écart type</b>	424,17± 54,58	196,17± 46,79	1077,14± 229,75	603,5± 99,95	1694,71± 86,01	1023,67± 277,46
<b>Médiane</b>	419	178,5	1138	586	1709	936

Tableau 12 - Nombre de microparticules capturées par les membranes SAM<sup>2</sup>, fixes et mobiles, dans du sang hyper agrégé, à un cisaillement de 2 s<sup>-1</sup> et à 20%, 40% et 60% d'hématocrite.

Hématocrite	Échantillons hyper agrégés					
	20%		40%		60%	
	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe	Mobile	Fixe
<b>Série</b>						
1	758	100	1579	517	2979	2851
2	586	324	1666	-	2864	2894
3	305	113	1458	821	2677	2479
4	471	132	1418	495	-	-
5	550	-	1723	727	-	-
6	683	-	-	692	-	-
7	630	520	-	-	-	-
8	649	402	-	-	-	-
<b>Moyenne ± Écart type</b>	579± 140,4	265,16± 176,2	1568,8± 130,7	650,4± 140,22	2840± 152,42	2741,33± 228,2
<b>Médiane</b>	608	228	1579	692	2864	2851