



HAL
open science

Approche biomimétique de la vaso-occlusion dans la drépanocytose: production de vésicules et microfluidique

Etienne Loiseau

► To cite this version:

Etienne Loiseau. Approche biomimétique de la vaso-occlusion dans la drépanocytose: production de vésicules et microfluidique. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2011. Français. NNT: . tel-00681260

HAL Id: tel-00681260

<https://theses.hal.science/tel-00681260>

Submitted on 21 Mar 2012

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

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

UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2
LABORATOIRE CHARLES COULOMB



THÈSE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 2

Discipline : Physique

Présentée par

Etienne Loiseau

**APPROCHE BIOMIMÉTIQUE DE LA
VASO-OCCLUSION
DANS LA DRÉPANOCYTOSE :
PRODUCTION DE VÉSICULES ET MICROFLUIDIQUE**

Soutenue publiquement le 9 décembre 2011 devant le jury composé de

Mme.	Patricia Bassereau	Rapporteur
M.	Damien Baigl	Rapporteur
M.	Jérôme Bibette	Examineur
M.	Jean Louis Viovy	Président du jury
M.	Vladimir Lorman	Directeur de thèse
Mme.	Gladys Massiera	Co-Directrice de thèse
M.	Manouk Abkarian	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les directeurs successifs qui m'ont accueillis au sein de leur laboratoire, Walter Kob et Jean Louis Sauvajol.

Je remercie également mes directeurs de thèse : Vladimir Lorman qui a suivi toute ma scolarité depuis ma première année d'université et qui m'a donné l'envie de persévérer dans l'étude de la physique puis de me diriger vers une carrière de chercheur ; Manouk Abkarian et Gladys Massiera qui ont encadré mon travail de thèse tout au long de ces trois années. Manouk pour ta passion communicative et ton enthousiasme résistant à toutes épreuves, parfois excessif mais tellement motivant et moteur ! Gladys, merci pour ton suivi au quotidien, je sais que ça n'a pas toujours été évident mais tu as toujours été présente et je t'en suis grandement reconnaissant.

Merci à tous les deux pour les discussions scientifiques enrichissantes, de m'avoir envoyé en conférences et en école d'été, à chaque fois j'en suis revenu plus motivé. Quand je regarde le chemin parcouru depuis ce mois de juillet 2008 lorsque vous m'avez confié le développement d'une nouvelle méthode facile;-) de fabrication de vésicules, juste de quoi m'amuser durant deux mois avant de m'intéresser à l'anémie falciforme, je me rend compte de la chance que j'ai eu de travailler avec vous. Finalement « l'amusement » a duré un peu plus de deux ans et je ne le regrette pas, tellement ce fut riche et passionnant.

Merci à Andrea Parmeggiani et Norbert Kern qui m'ont fait découvrir la biophysique durant mon stage de M1, et à Miguel Manna et Serge Mora qui m'ont encadré durant mon stage de M2, ils m'ont confirmé dans mon choix de poursuivre en thèse.

Merci au Docteur Patricia Aguilar Martinez du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint Eloi ainsi qu'à toute son équipe de technicien(e)s qui m'ont mis de côté les échantillons sanguins correspondant à mes exigences pour aborder le problème de l'anémie falciforme.

Merci à toutes les personnes qui m'ont facilité le quotidien dans le laboratoire : toute l'équipe administrative, les chimistes Raymond Aznard et Ty Phou ainsi que les techniciens.

Merci aux amis kayakistes, les bons moments passés sur la rivière m'ont permis de me ressourcer durant les weekends et les vacances.

Résumé

Les vésicules sont des bicouches lipidiques refermées sur elles même, séparant ainsi un volume intérieur du milieu extérieur. Elles sont donc utilisées dans de nombreuses applications nécessitant l'encapsulation d'une substance mais également pour la construction d'objets biomimétiques. Une nouvelle méthode simple, appelée continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation (cDICE), a été développée pour la fabrication de vésicules de taille et de contenu finement contrôlés. Ainsi, des vésicules dans la gamme de taille 5-70 μm de diamètre et encapsulant des solutions aussi variées que des colloïdes micrométriques, protéines, cellules, solutions visqueuses (40 mPas) ou solutions salines (>300 mosm), sont produites de façon continue et à fréquence élevée (~ 150 Hz). Des vésicules « drépanocytaires » ont également pu être produites grâce à cette méthode.

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie génétique dont la principale conséquence est la vaso-occlusion de la circulation sanguine. La conception de canaux microfluidiques se rapprochant au mieux des conditions physiologiques (vitesse d'écoulement, concentration d'oxygène, hématicrite...) de la microcirculation a permis une approche biomimétique de la vaso-occlusion, mettant en évidence l'importance de paramètres physiques tels que la géométrie de l'écoulement, le taux d'oxygène, la présence de globules blancs et l'hémoglobine libre en solution sur la formation d'agrégats cellulaires qui pourraient jouer un rôle dans la vaso-occlusion.

Mots clés : vésicules lipidiques géantes, cDICE, encapsulation, objets biomimétiques, microfluidique, drépanocytose, vaso-occlusion.

Title Biomimetic approach of sickle cell vaso-occlusion : production of vesicles and microfluidics.

Abstract

Vesicles are spherical lipid bilayers which enclose an internal volume, there are thus used in many applications such as encapsulation or design of biomimetic systems. An original simple method called continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation (cDICE), have been developed to produce vesicles controlled in size and content. This method allows the production of vesicles in the range 5-70 μm in diameter with a high efficiency to encapsulate solutions as diverse as micrometric colloids, proteins, cells, viscous solutions (40 mPas) or saline solutions (>300 mosm). Vesicles are then produced continuously at high frequency (~ 150 Hz). Furthermore, sickle « vesicles » have been produced using this method.

Sickle cell anemia is a genetic disease which results in vaso-occlusive crisis of the blood circulation. Microfluidic channels designed to mimic physiological conditions (flow velocity, oxygen concentration, hematocrit...) of the microcirculation were used to carry out a biomimetic study at the cellular scale of sickle cell vaso-occlusion. This study has shown that flow geometry, oxygen concentration, white blood cells and free hemoglobin S are essential in the formation of cell aggregates which could play a role in the vaso-occlusion event.

Keywords : giant vesicles, cDICE, encapsulation, biomimetic objects, microfluidics, sickle cell anemia, vaso-occlusion

Table des matières

Introduction	1
I Méthode de fabrication de vésicules lipidiques géantes par continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation (cDICE)	3
Introduction aux méthodes de production de vésicules	5
1 Vésicules lipidiques géantes	7
1.1 Méthodes par hydratation d'un film de lipide	9
1.1.1 Gonflement spontané	9
1.1.2 Electroformation	9
1.1.3 Méthodes dérivées	10
1.2 Méthode de l'émulsion inverse et transfert spontané	11
1.3 Méthodes en microfluidique	13
1.3.1 Jetting au travers d'une bicouche préformée	13
1.3.2 Double émulsion	14
1.3.3 Autres méthodes	15
1.4 Quelles techniques pour quelles applications ? Et après ?	16
2 Méthodes expérimentales	17
2.1 Montage expérimental	17
2.2 Dissolution des lipides	19
2.3 Préparation des capillaires	19
2.4 Mesure de tension de surface	20
2.4.1 Expérience de goutte pendante	20
2.4.2 Analyse d'image pour déterminer la tension	20
2.5 Détermination des distributions de taille par analyse d'image	23

3	cDICE	25
3.1	Principe de fonctionnement	25
3.2	Production des gouttelettes	27
3.2.1	Contrôle de la taille	27
3.2.2	Fréquence de production	31
3.3	Dispersion des lipides et lipides aux interfaces	32
3.3.1	Cinétique d'adsorption	32
3.3.2	Dispersion des lipides	35
3.3.3	Couverture continue des interfaces	36
3.4	Passage de l'interface	39
3.4.1	Approche et « zipping »	39
3.4.2	Détachement	43
3.5	Caractéristiques des vésicules produites par cDICE	45
3.5.1	Distribution de taille des vésicules	45
3.5.2	Encapsulation	45
3.5.3	Propriétés de la membrane	48
3.6	Conclusion	52
 II Une approche microfluidique de la drépanocytose : étude de la vaso-occlusion		53
Introduction à une maladie génétique du sang : la drépanocytose		55
4	Hémoglobine S et études sur des cellules	59
4.1	Pathophysiologie	59
4.2	Structure moléculaire	60
4.2.1	La molécule d'hémoglobine	60
4.2.2	Structure du polymère	63
4.3	Etudes en solution	66
4.3.1	Solubilité de l'hémoglobine S	66
4.3.2	Cinétique de polymérisation	75
4.4	Etudes sur des cellules	80
4.4.1	Généralités sur le sang et la microcirculation sanguine	80
4.4.2	Morphologie des globules rouges drépanocytaires	82
4.4.3	Propriétés physiques des globules rouges drépanocytaires	86
4.4.4	Vaso-occlusion : scénarios proposés	91
5	Techniques expérimentales	95
5.1	Echantillons sanguins	95
5.2	Purification de l'hémoglobine	95

5.3	Tri des globules par densité	96
5.4	Microfluidique	98
5.4.1	Généralités à propos de la lithographie	98
5.4.2	Construction des canaux en résine photosensible	100
5.4.3	Construction des canaux en PDMS	102
5.4.4	Désoxygénation	104
6	approche microfluidique	105
6.1	Dispositif expérimental	105
6.2	Forme des globules rouges drépanocytaires sous écoulement	107
6.3	Formation d'agrégats cellulaires dans des canaux microfluidiques	108
6.3.1	Globules rouges drépanocytaires sous écoulement	110
6.3.2	Rôle de l'hémoglobine S libre en solution	110
6.3.3	Rôle des globules blancs	114
6.4	Vaso-occlusion ?	115
6.4.1	Vaso-occlusion et désobstruction	115
6.4.2	La vaso-occlusion : une obstruction stérique ?	117
6.4.3	Adhésion des globules drépanocytaires	117
6.4.4	Agrégats cellulaires	118
6.5	Conclusion	121
	Conclusions et perspectives	123
	Appendices	
A	régime de Taylor	127
A.1	Géométrie du problème	127
A.2	Champs des vitesse et de pression	128
A.3	Force résistive exercée sur la sphère	129
A.4	Calcul de la vitesse en régime de Taylor	130
B	Dispersion des lipides	131
B.1	Contrôle de l'humidité	131
B.2	Dissolution des lipides dans le chloroforme méthanol	131
B.3	Préparation de la LOS	132
B.3.1	Formation du film de lipides	132
B.3.2	Dispersion dans l'huile minérale	132
	Liste des abréviations	133

Introduction

Cette thèse comporte deux parties décrivant respectivement la production de vésicules par un procédé original, et une approche microfluidique de la drépanocytose. Ces deux parties de la thèse constituent en fait les deux voies que nous avons choisi pour l'étude de la vaso-occlusion par une approche biomimétique.

L'anémie falciforme ou drépanocytose est une maladie génétique de la microcirculation sanguine, qui touche environ cinquante millions de personnes de par le monde, principalement sur le continent Africain, en Inde et au Moyen-Orient. Les symptômes de la maladie se caractérisent par des crises anémiques qui se traduisent par d'intenses douleurs chroniques chez les patients et localisées principalement dans les extrémités des membres, la poitrine ou l'abdomen. Ces crises sont en partie provoquées par l'obstruction de la circulation sanguine au niveau de la microcirculation, on parle alors de vaso-occlusion.

Malgré un corpus rigoureux d'expériences qui ont fourni une compréhension approfondie des mécanismes de polymérisation de l'HbS à l'échelle moléculaire (revue dans [1]) et une compréhension plus approfondie des symptômes associés aux pathologies médicales de l'anémie falciforme [2], la relation qui existe entre ces deux échelles reste encore incertaine voire indéterminée et peu explorée. Il manque en effet une compréhension claire des phénomènes qui ont lieu à l'échelle mésoscopique de la cellule en écoulement.

La première approche est de produire des objets biomimétiques ou globules rouges artificiels à partir de vésicules, avec pour exigences d'encapsuler l'hémoglobine S (HbS) à des concentrations physiologiques dans des vésicules de taille contrôlée proche de celle des globules rouges. La production de ces globules artificiels a pour but de comparer leur comportement sous écoulement à celui des globules drépanocytaires, d'une part, mais aussi d'appréhender le rôle des contraintes élastiques et de confinement sur la cinétique de polymérisation de l'HbS, ainsi que les éventuelles interactions avec la membrane. Nous avons donc proposé et développé une technique originale de fabrication de vésicules appelée cDICE pour continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation, que nous présenterons en détail dans la première partie. Ce procédé a présenté des challenges techniques et des enjeux auxquels nous avons choisi de dédier une grande partie de cette thèse.

La deuxième voie de recherche a consisté en l'utilisation des techniques de microfluidiques pour approfondir la compréhension des phénomènes pouvant mener à la vaso-occlusion. De façon cohérente avec les résultats connus sur la cinétique de polymérisation, nous avons conçu des microécoulements qui nous permettent de contrôler la concentration d'HbS et la pression partielle en oxygène, nous rapprochant ainsi des conditions physiologiques. Nous présenterons les résultats de ce travail dans la seconde partie de ce manuscrit.

Première partie

Méthode de fabrication de vésicules lipidiques géantes par continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation (cDICE)

Introduction aux méthodes de production de vésicules

Une vésicule est une membrane refermée sur elle même, séparant ainsi un volume intérieur du milieu extérieur. Les lipides constituant les membranes biologiques sont des molécules amphiphiles qui s'assemblent en bicouche à l'intérieur de laquelle les chaînes aliphatiques hydrophobes se font face et les têtes polaires hydrophiles sont en contact avec les milieux aqueux interne et externe.

Le travail de cette thèse sur les vésicules est motivé par l'étude de la drépanocytose, une maladie génétique affectant la circulation sanguine, qui sera présenté dans la deuxième partie de ce manuscrit. L'approche choisie est d'utiliser les vésicules comme globules rouges modèles. Les contraintes de fabrication étant un contrôle sur la taille et sur le contenu avec un haut rendement de production. L'intérêt pour la fabrication de substitut sanguin pour le transport de l'oxygène par exemple [3] est fort, cependant, les techniques actuelles ne permettent pas d'atteindre les tailles de vésicules qui nous intéressent.

L'intérêt et les fonctions d'objets tels que les vésicules est vaste. La compartimentalisation a été une étape primordiale dans l'évolution et la complexification des organismes cellulaires, le recours aux vésicules comme moyen de transport intra et inter-cellulaire fait partie de ce processus. C'est donc assez naturellement que les vésicules sont utilisées comme vecteur pour délivrer in vivo des substances actives; de la simple molécule jusqu'aux cellules souches [4–6], des applications cliniques sont déjà opérationnelles. Plus généralement, la capacité d'encapsulation entre dans un large champ d'applications [7, 8] : encapsulation de saveurs, de compléments alimentaires, agents antimicrobiens, pesticides... Les industriels de la cosmétique, de l'agroalimentaire ou encore de la chimie trouvent un moyen avec les vésicules de protéger un produit du milieu extérieur (incompatibilité chimique, prévention de l'évaporation, protection d'un produit cher) et de contrôler son relargage (perméabilité).

D'un point de vue plus fondamental les vésicules géantes unilamellaires, de part leur étendue en tailles (1-100 μm) qui couvre l'ensemble des tailles des cellules biologiques, font d'excellentes candidates pour la construction d'objets biomi-

métiques. De tels systèmes modèles permettent une meilleure compréhension des membranes biologiques : propriétés mécaniques, formation de domaines [9, 10] et compositions hétérogènes, formes et stabilité [11] (pour une liste plus exhaustive voir Peter Walde et al. [12]). Par ailleurs, un champ d'application très novateur est celui de la biologie synthétique avec la promesse d'aller plus avant dans la compréhension de l'origine de la vie [13] ; cependant la conception et l'élaboration de systèmes « artificiels » comportant les fonctions minimales d'un organisme vivant représente un véritable challenge tant intellectuel que technique encore loin d'être résolu. Une première étape a été franchie cette dernière décennie avec la première démonstration par Nomura et al. [14] de l'expression d'une protéine (rsGFP) dans des vésicules géantes. Noireaux et Libchaber [15] ont amélioré la technique et maintiennent durant plusieurs jours la production de GFP grâce à l'expression simultanée de la GFP et de l'alpha-hémolysine qui permet l'apport extérieur des nutriments nécessaires. La reconstruction du cytosquelette dans des vésicules [16–18] est très intéressante du point de vue système modèle pour l'étude de la motilité cellulaire, des propriétés mécaniques, elle sera de plus très certainement une des pièces pour la construction de cellules minimales.

Chapitre 1

Méthodes de fabrication de vésicules lipidiques géantes

Les méthodes de production de vésicules sont nombreuses. On peut distinguer principalement quatre types d'approches différentes : par hydratation d'un film de lipides [19–21], à partir d'une émulsion d'eau dans l'huile stabilisée par une monocouche de lipides [22, 23], à partir de double émulsions stabilisées [24] ou la formation à partir d'une bicouche déjà formée [25–27]. Historiquement les premières descriptions de fabrication de vésicules par hydratation d'un film de lipides sont faites par Bangham et al. en 1965 [19] et par Reeves et al. en 1969 [20]. Dans la littérature, on les trouve indifféremment sous le nom de « gonflement naturel » ou « gonflement spontané ». En 1986, Angelova et Dimitrov [21] améliorent sensiblement cette méthode et inventent l'électroformation, une hydratation « contrôlée » par un champ électrique externe. Le principal avantage de ces méthodes est la facilité de mise en oeuvre. Par contre, elles ne permettent pas un contrôle de la taille et sont assez inefficaces pour des applications d'encapsulation. Plus récemment, les techniques basées sur le passage à une interface huile-eau d'une émulsion stabilisée sont rapportées par Pautot et al. en 2003 [22] et par Yamada et al. [23] en 2006. Ici, l'encapsulation est efficace, le travail en conditions physiologiques est possible ainsi que la fabrication de vésicules à feuillet asymétriques [28]. En revanche, la taille n'est pas contrôlée et le rendement est faible. Avec le développement de la microfluidique, plusieurs techniques ont vu le jour : méthode dite du jetting par Funakoshi et al. en 2007 [26] et Stachowiak et al. en 2008 [25] et la méthode de la double émulsion par Shum et al. en 2008 [24]. Toutes ces techniques permettent la production de vésicules monodisperses où l'encapsulation est efficace mais le rendement est faible et les résidus de solvant organique dans la membrane peuvent être importants. Enfin, la stabilité de ces vésicules peut être remise en cause (vésicules tendues).

Nous rappelons dans ce chapitre avec plus de détails l'ensemble de ces tech-

riques afin d'introduire la méthode que nous avons développée et expliquer en quoi elle constitue une avancée par rapport aux méthodes existantes.

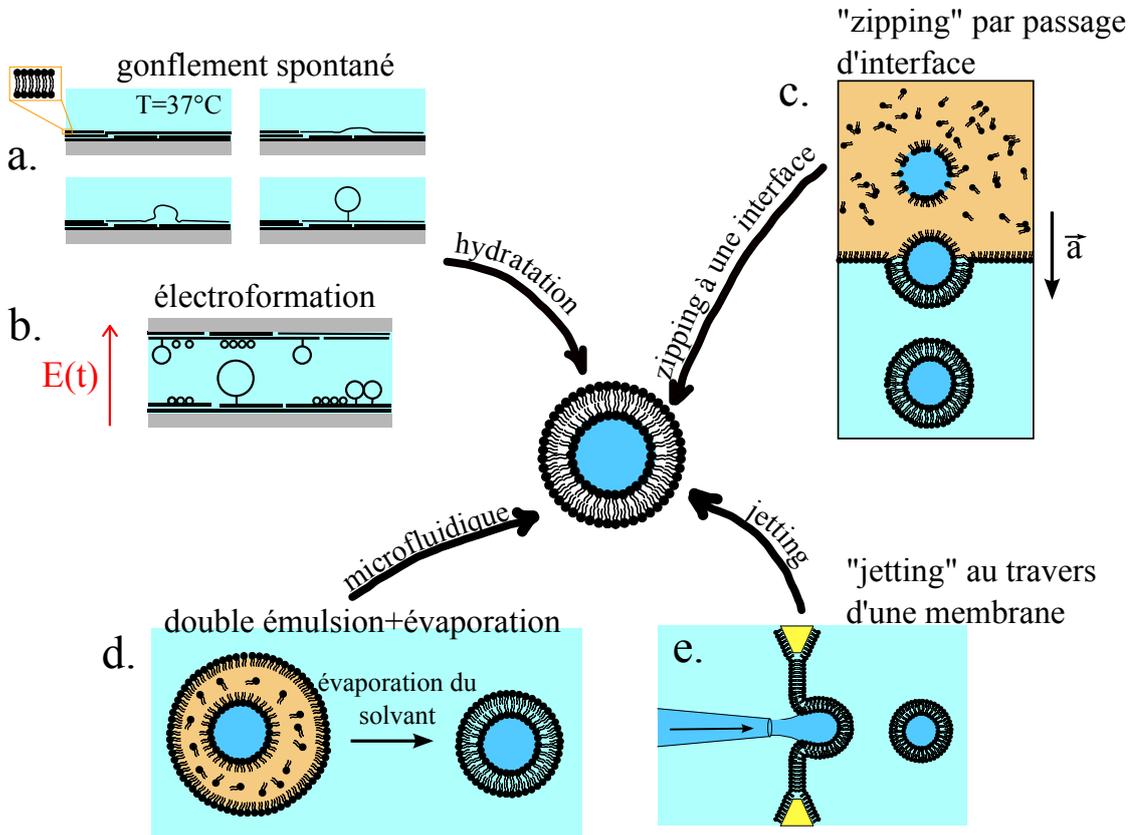


FIG. 1.1: Principales méthodes de fabrication de vésicules. **a.** Gonflement spontané : le film de lipide réhydraté gonfle pour former des vésicules qui restent liées au substrat par un tube lipidique [20]. **b.** Electroformation : la croissance des vésicules est contrôlée par un champ électrique alternatif externe [21]. **c.** Emulsion inverse : passage forcé d'une interface huile-eau par centrifugation d'une émulsion d'eau dans l'huile stabilisée par des lipides [22] et [23]. **d.** Double émulsion d'eau dans huile dans l'eau fabriquée par technique microfluidique. Les vésicules sont obtenues après évaporation du solvant [24]. **e.** Microjet pulsé contre une bicouche déjà formée [26] et [25].

1.1 Méthodes par hydratation d'un film de lipide

1.1.1 Gonflement spontané

Dès 1965, Bangham et al. utilisent des vésicules obtenues par gonflement spontané pour l'étude de la diffusion d'ions à travers les membranes [19]. Cependant, la première étude complète décrivant la préparation de telles vésicules ainsi que leur caractérisation est menée par Reeves et Dowben [20] en 1969.

La préparation est simple, dans une bouteille en verre, une solution de lipides dissous dans un mélange chloroforme-méthanol est évaporée sous un flux d'azote résultant en un film de lipide sur la surface de verre. Une solution aqueuse est alors versée sur le film et le tout est laissé au repos pendant plusieurs heures à 37°C. Au cours du temps, le film de lipide hydraté gonfle et donne naissance à des structures lipidiques dont des vésicules (figure 1.1 a). Les vésicules ainsi obtenues ont des tailles comprises principalement entre 0.5 et 10 μm , certaines sont multilamellaires et les plus grosses ont tendance à renfermer de plus petites vésicules.

Facile à mettre en œuvre, cette méthode souffre de nombreuses limitations ; la taille n'est pas contrôlée, il est difficile de travailler en conditions physiologiques, l'encapsulation est très limitée et le rendement est faible : peu de vésicules unilamellaires.

1.1.2 Electroformation

La méthode de l'électroformation développée par Angelova et Dimitrov en 1986 [21] permet grâce à l'application d'un champ électrique extérieur de mieux contrôler la croissance des vésicules. Ici, le film de lipide est formé sur deux plaques semiconductrices d'ITO (Indium Tin Oxyde) agencées face à face et espacées de 1 à 2 mm. Une fois l'étanchéité entre les deux plaques effectuée, la chambre d'électroformation ainsi formée est remplie avec la solution aqueuse que l'on souhaite encapsuler. On applique alors une tension alternative (10 Hz) aux bornes des deux plaques, dont on augmente graduellement l'amplitude (de 0,1 à 2 V) tout au long de la croissance des vésicules sur plusieurs heures (figure 1.1b).

Dans le film hydraté, les lipides s'auto-arrangent en bicouches superposées. Au début de la formation, on observe sur les plaques des domaines comportant des milliers de vésicules micrométriques. Puis, sous l'effet de l'agitation électro-osmotique produite par la tension alternative, ces vésicules fusionnent entre elles. Le processus de croissance se fait donc par fusions successives de vésicules de plus en plus grosses au fur et à mesure que l'intensité du champ augmente. Les vésicules sont toujours reliées au film par un tube lipidique.

Contrairement au gonflement spontané, les vésicules électroformées peuvent atteindre des tailles de plus de 100 μm et le rendement est important. De plus

les vésicules obtenues sont en très grande majorité unilamellaires [29] et sans défaut membranaire. Par contre, la taille n'est pas contrôlée. Il n'est pas possible de travailler en condition physiologique¹ et, de part le processus même d'hydratation d'un film de lipide, l'encapsulation est inefficace car elle implique que les molécules passent au travers de pores, ce qui réduit la probabilité d'encapsulation de macromolécules.

1.1.3 Méthodes dérivées

Vésicules en conditions physiologiques

L'utilisation des vésicules comme système modèle de membranes biologiques est une motivation forte pour former des vésicules en solution physiologique (milieu fortement salin). En effet, des processus comme l'interaction électrostatique entre membrane et protéine, la fusion de vésicules ou encore les propriétés de conductance de canaux ioniques sont dépendants de la force ionique du milieu. Plusieurs pistes ont ainsi été développées pour lever cette limitation. La technique proposée par Horger et al. [30] consiste en un gonflement spontané réalisé sur un film d'agarose. Le principe serait le suivant : la préhydratation du film de lipide due au film d'agarose permet l'auto-organisation des lipides en bicouches avant l'ajout de la solution ionique ; puis le gonflement du film d'agarose génère une force normale aux bicouches, ce qui favorise la croissance des vésicules ; enfin la forte densité de vésicules serait responsable des fusions entre vésicules adjacentes.

Deux autres méthodes sont des modifications de l'électroformation. La première proposée par Estes et Mayer [31] est une électroformation dans une chambre à flux ; la chambre d'électroformation est semblable à celle décrite précédemment mais avec une entrée et une sortie permettant de changer continuellement le fluide à l'intérieur de la chambre. La croissance des vésicules se fait de façon analogue à une électroformation classique, une fois la taille souhaitée obtenue, la solution non ionique est alors remplacée progressivement par une solution saline physiologique. Au cours de cet échange, la solution ionique diffuse à l'intérieur des vésicules par les tubes lipidiques les rattachant au substrat. La deuxième méthode décrite par Pott et al. [32] modifie plus en profondeur le protocole standard. La croissance des vésicules ne se fait plus sur des plaques d'ITO mais sur des électrodes de platine. Le dépôt de lipides sur les électrodes se fait à partir d'une solution aqueuse concentrée en vésicules submicroniques (on parle de LUV) préparées par des techniques usuelles (sonication, extrusion ...). Après évaporation, la chambre est remplie avec une solution physiologique et mise sous tension. Comparé à une électroformation classique, le champ électrique appliqué est plus fort et la fréquence plus élevée

¹Lorsque la tension est trop importante, ou bien la solution trop saline, un courant s'établit dans la chambre perturbant la formation des vésicules.

pour prévenir la formation de courant dans la chambre (500 Hz contre 10 Hz habituellement). Il est à noter que ce protocole permet aussi la formation de vésicules géantes à partir de dépôts sur les électrodes de globules rouges fantômes (globules vidés de leur hémoglobine) qui sous l'effet du champ fusionnent [33].

Contrôle de la croissance, influence sur la taille des vésicules

Un autre axe d'investigation concerne l'étude de l'influence du substrat sur lequel est formé le film de lipide et du contrôle de l'épaisseur de celui-ci. Estes et al. [34], en étalant par tournette une solution de lipides sur les plaques ITO ont montré qu'une épaisseur de film dans la gamme 25-50 nm est optimale pour obtenir une croissance homogène sur toute la surface des plaques. De plus, les vésicules ainsi formées sont plus nombreuses et en majorité plus grandes que celles obtenues par électroformation classique. Toujours dans l'optique de contrôler l'épaisseur et l'organisation du film de lipides, des expériences ont été menées sur l'influence de différents traitements de surface sur des wafers de silicium [35]; le dépôt à vitesse fixe sur des substrats composés d'une structure de puits circulaires [36] permet de contrôler la vitesse d'évaporation du solvant, influant ainsi sur l'organisation interne du film. Ces études montrent que la gamme de tailles des vésicules obtenues à partir de ces dépôts est plus étroite que dans le cas du protocole standard.

1.2 Méthode de l'émulsion inverse et transfert spontané

La méthode dite de l'émulsion inverse développée par Pautot et al. en 2003 [22] est une idée élégante qui propose dans un premier temps la formation séparée de chaque feuillet de la bicouche, les vésicules obtenues résultant de l'assemblage final des deux monocouches (figure 1.1 c). La mise en œuvre est simple, une émulsion d'eau dans l'huile stabilisée par des lipides est préparée par sonication ou vortex puis déposée dans un tube à centrifuger sur une solution aqueuse créant ainsi une seconde interface huile-eau recouverte à son tour par les lipides. L'étape finale consiste à centrifuger le tout pendant quelques minutes; les gouttelettes plus denses que l'huile sédimentent et au passage de l'interface les deux monocouches s'assemblent (« zippent ») pour former une bicouche se refermant sur elle-même. Sous l'effet de l'accélération, les vésicules se détachent de l'interface huile-eau et sont récupérées à la fin dans la phase aqueuse.

Cette technique de passage d'interface par des gouttelettes présente potentiellement de nombreux avantages en plus de ceux d'être simple et rapide : l'encapsulation est efficace, il suffit d'incorporer la substance que l'on souhaite encapsuler dans la solution aqueuse destinée à l'émulsion; seulement quelques microlitres sont

nécessaires pour former l'émulsion permettant ainsi de préserver des produits rares et/ou coûteux. De plus la production de vésicules en conditions physiologiques est facile et il est aussi possible de confectionner des membranes asymétriques [28]. Cependant, en raison de la grande polydispersité de taille des émulsions préparées par sonication ou vortex, cette méthode ne permet pas un contrôle de la taille des vésicules.

La difficulté à dissoudre les lipides dans l'huile est la principale source d'irreproductibilité sans qu'une solution soit proposée pour maîtriser ce point. De plus, les vésicules obtenues (voir figure 1.2) sont en majorité petites ($<5 \mu\text{m}$) [22] et résultent en partie de formation spontanée à l'interface huile-eau. Centrifuger une émulsion entière perturbe le passage de chaque goutte, atténuant sans doute l'efficacité de production des vésicules.

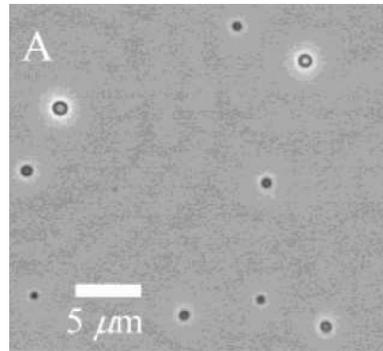


FIG. 1.2: Image en contraste de phase de vésicules de POPC préparées par émulsion inverse (Pautot et al. [22]).

Une autre méthode reposant sur le même principe du passage à une interface huile/eau d'une émulsion stabilisée a été proposée par Yamada et al. en 2006 [23]. La principale différence réside dans le fait que la sédimentation de l'émulsion se fait sous l'action de la pesanteur sans centrifugation. Au passage de l'interface lors de la formation de la bicouche, l'accélération n'est généralement pas suffisante pour décrocher les vésicules qui restent donc attachées à l'interface. Pour cette raison le montage expérimental se fait dans de petites chambres hautes de quelques millimètres pour pouvoir observer les vésicules sous microscope (figure 1.3). Néanmoins, Hamada et al. [37] ont observés qu'augmenter la différence de densité entre la solution encapsulée et la solution aqueuse externe favorise le détachement de l'interface. Il est également possible de fabriquer des vésicules asymétriques [37] et plus généralement les principaux points forts, mais aussi les limitations de la méthode de l'émulsion inverse sont aussi valable dans le cas du transfert spontané.

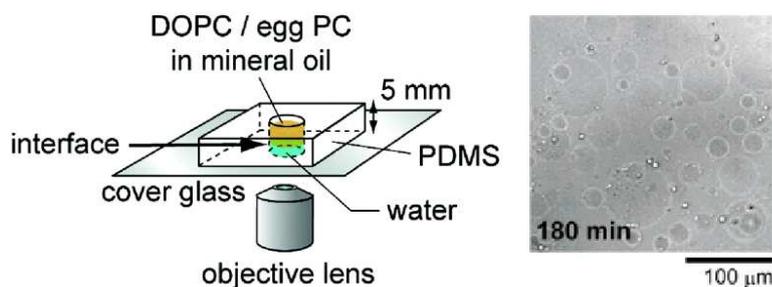


FIG. 1.3: Chambre de production et d'observation pour la méthode du transfert spontané. A droite, image en contraste de phase des vésicules formées et attachées à l'interface (Yamada et al. [23]).

1.3 Méthodes en microfluidique

1.3.1 Jetting au travers d'une bicouche préformée

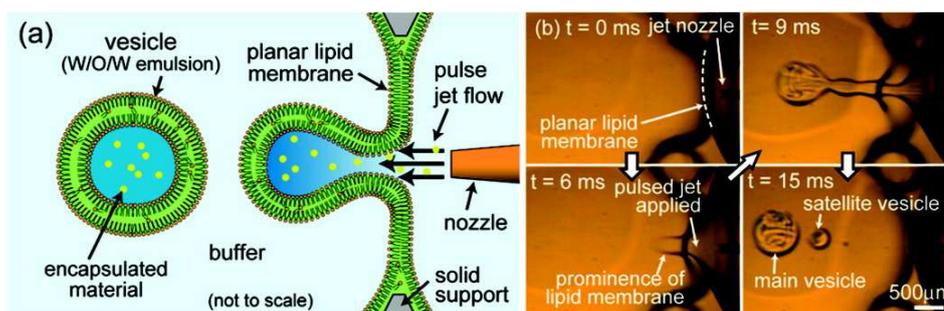


FIG. 1.4: Schéma de principe et séquence d'images illustrant la formation d'une vésicule par la méthode de jetting : une bicouche est préalablement formée en mettant deux gouttes de fluide au contact d'un film de solvant contenant des lipides puis un jet est pulsé contre la bicouche. Si la force et la vitesse du jet ne sont pas parfaitement contrôlés, la formation d'un long cou de fluide et la déstabilisation de celui-ci entraînent la formation de vésicules satellites de plus petite taille. (Funakoshi et al. [26]).

Dans la méthode du jetting rapportée en 2006 par Funakoshi et al. [26] puis améliorée par Stachowiak et al. en 2008 [25], un jet du fluide à encapsuler est pulsé au travers d'une bicouche déjà formée dans une chambre microfluidique (figure 1.4). Le montage expérimental est délicat à maîtriser, bien que permettant la production de vésicules monodisperses. Il est cependant difficile d'atteindre des tailles

inférieures à $100\ \mu\text{m}$. Le rendement est bon mais la fréquence de production des vésicules est faible (quelques Hertz) car il est nécessaire d'attendre que la bicouche se reforme après la formation de quelques vésicules. L'encapsulation est efficace et le travail en conditions physiologiques ne pose pas de problème. Si le processus de génération du jet n'est pas parfaitement contrôlé, la quantité d'huile résiduelle dans la bicouche peut être importante (jusqu'à plusieurs microns d'épaisseur [26]). De plus, de part la formation de ces vésicules en régime inertiel, la membrane des vésicules est tendue, résultant en une stabilité limitée dans le temps.

1.3.2 Double émulsion

La technique permettant de générer des double émulsions monodisperses [38] a été proposée comme étape intermédiaire pour la fabrication de vésicules [24]. Le principe consiste à former dans un système de capillaires imbriqués une gouttelette de la solution à encapsuler dans une goutte d'huile contenant des lipides, le tout étant dispersé dans une solution aqueuse (figure 1.5). La double émulsion ainsi obtenue est stabilisée par les lipides et toute la difficulté réside dans l'évaporation du solvant. L'encapsulation, la formation en conditions physiologiques et le contrôle de la taille ne présentent pas de difficulté particulière. En revanche, l'évaporation du solvant génère de nombreux défauts membranaires et le rendement est faible. En effet, la production de double émulsion est efficace mais lors de l'expulsion du solvant beaucoup de ces capsules éclatent. Il paraît par ailleurs difficile d'envisager de construire des membranes asymétriques par cette méthode.

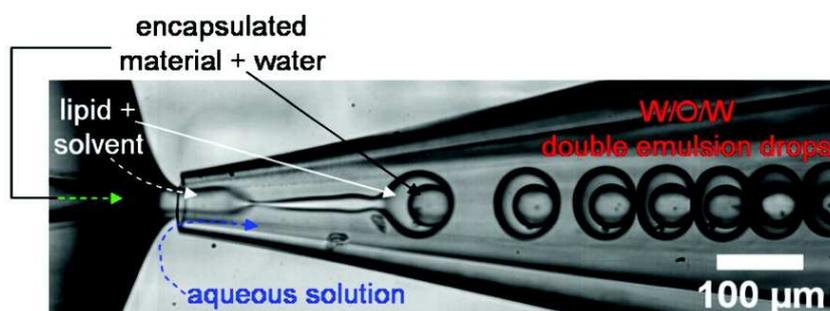


FIG. 1.5: Formation d'une double émulsion stabilisée par des lipides : des gouttelettes de solution aqueuse à encapsuler sont entourées par une couche de solvant contenant des lipides, le tout est dispersé dans une solution aqueuse. Les lipides migrent aux deux interfaces solvant/solution aqueuse, le point limitant étant l'évaporation complète du solvant. (Shum et al. [24])

1.3.3 Autres méthodes

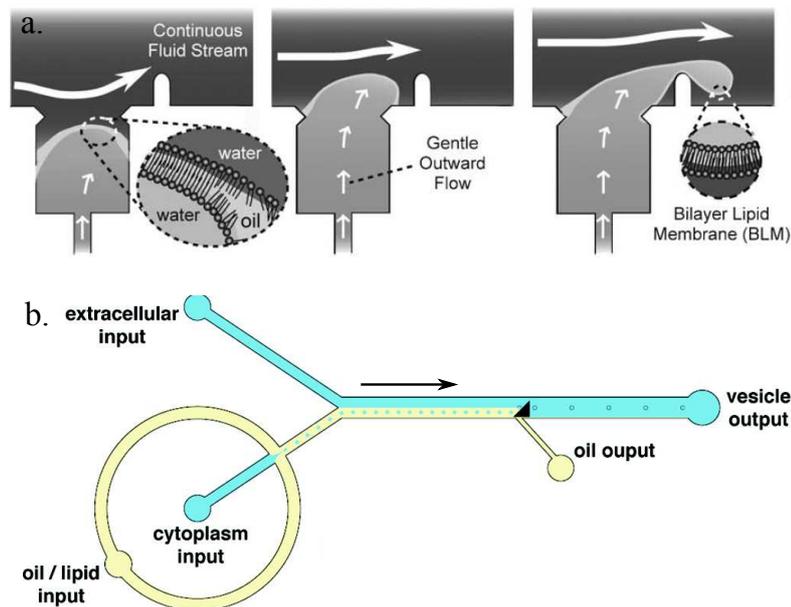


FIG. 1.6: **a.** Une bicouche est formée à la jonction de deux canaux microfluidiques en faisant circuler successivement une solution aqueuse, une solution d'huile contenant des lipides puis de nouveau une solution aqueuse. La bicouche étant formée, on injecte la solution aqueuse du bas dans le canal supérieur sous écoulement, les vésicules sont détachées sous cisaillement à hauteur d'un plot dans le canal principal. (Ota et al. [27]). **b.** Une émulsion monodisperse d'eau dans l'huile est produite dans une branche de la puce microfluidique, les lipides présents dans l'huile stabilisent les gouttelettes. L'émulsion formée et une solution aqueuse se rejoignent dans le canal principal et les lipides couvrent la nouvelle interface huile/eau. Le passage des gouttelette de l'interface huile/eau est forcé par un obstacle dans le canal. (Matosevic et al. [39]).

D'autres techniques utilisant la microfluidique comme moyen de produire des gouttelettes monodisperses d'eau dans l'huile stabilisées par des lipides sont proposées [27, 39, 40]. La plus récente, développée par Matosevic et al. [39] propose de forcer le passage à une interface huile/eau d'une émulsion stabilisée dans un canal microfluidique (figure 1.6b). La méthode rapportée par Ota et al. [27] est une implémentation ingénieuse de la formation de vésicules à partir d'une bicouche déjà formée (figure 1.6a) et souffre des même limitations concernant le renouvellement de la bicouche. Enfin, Tan et al. [40] plongent une émulsion monodisperse stabilisée préalablement fabriquée en microfluidique, dans une solution d'éthanol.

Un réarrangement des lipides conduit alors à la formation d'une bicouche. Toutes ces méthodes n'apportent pas de grand changement, la taille est certes contrôlée mais le rendement est faible et le problème de dissolution des lipides dans l'huile n'est pas résolu.

1.4 Quelles techniques pour quelles applications ? Et après ?

Chacune des méthodes décrites précédemment possède ses propres avantages et limitations, ainsi suivant l'application envisagée une technique particulière sera préférentiellement choisie. Pour des études portant sur les transitions de phases ou la dynamique des lipides dont la qualité de la bicouche est essentielle, on préférera l'électroformation [21] qui donne des vésicules unilamellaires sans défaut membranaire. Pour des applications nécessitant l'encapsulation de protéines (reconstitution du cytosquelette [16, 17], expression de GFP [15] ...), l'émulsion inverse [22] et le transfert spontané [23] seront les méthodes de choix ; simples à mettre en œuvre et rapides, elle permettent de plus la fabrication de bicouches asymétriques [28, 37]. Néanmoins leur principale limitation reste leur faible reproductibilité. Si le contrôle de la taille est recherché alors les techniques en microfluidiques sont toutes indiquées [24, 39, 40], par contre les résidus de solvant dans la bicouche et/ou le faible rendement en limitent leur utilisation.

Dans la suite, nous présenterons comment réunir le maximum d'avantages en une seule technique. Nous discuterons des possibilités qu'offre cette nouvelle méthode ainsi que de ses limitations.

Chapitre 2

Méthodes expérimentales

Nous présentons dans ce chapitre les différentes techniques expérimentales. Nous décrivons d'abord le dispositif utilisé pour la fabrication des vésicules, puis le protocole pour dissoudre les lipides dans l'huile minérale ainsi que le moyen pour caractériser la solution de lipides. Enfin, nous terminons par expliquer la technique d'analyse d'image employée pour obtenir les distributions de tailles des gouttelettes et des vésicules.

2.1 Montage expérimental

La chambre dans laquelle sont produites les vésicules est constituée de deux couvercles ¹ de boîte de pétri (35 mm de diamètre) collés entre eux et dont l'un comporte en son centre un trou de 1 cm de diamètre (figure 2.1). Cette chambre est alors fixée sur un moteur dont on contrôle la vitesse de rotation (typiquement entre 10 et 40 Hz). Une fois en rotation, la chambre est successivement remplie avec : 1 ml de la solution aqueuse dans laquelle on récupérera les vésicules, 3.5 ml de la solution d'huile contenant les lipides et 1 ml de la phase continue dans laquelle sera introduit le capillaire pour la production de gouttelettes monodisperses. Le capillaire de verre, rempli de la solution que l'on souhaite encapsuler est connecté à un système de pression (mfcs-4c de Fluigent) piloté par ordinateur permettant de fixer la pression d'injection et donc la fréquence de production des gouttelettes. Il est ensuite introduit dans la phase continue tout en restant au plus près de l'interface avec l'air. Après quelques minutes de production, le capillaire est retiré et la rotation de la chambre stoppée progressivement pour limiter le cisaillement à l'interface. Les vésicules sont récupérées en aspirant délicatement la solution aqueuse externe avec une micropipette.

¹L'utilisation de deux couvercles permet de limiter la hauteur de la chambre et donc le volume de solution de lipides nécessaire.

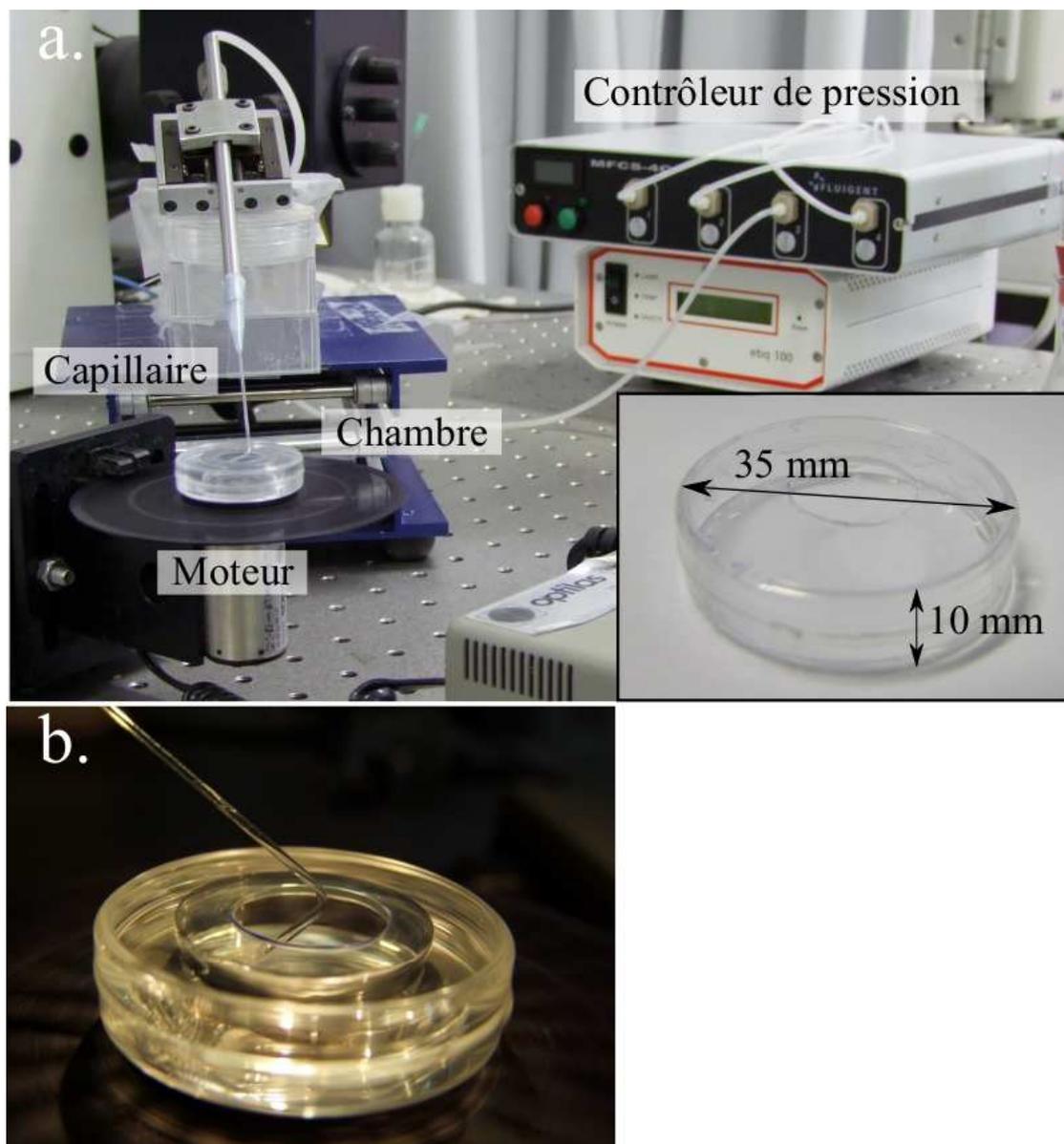


FIG. 2.1: **a.** La chambre est fixée sur le moteur. Le capillaire en verre contenant la solution à encapsuler est connecté sur un tuyau de silicone lui même relié au contrôleur de pression. Dans l'encart, la chambre de production est composée de deux couvercles de boîte de pétrie de 35 mm de diamètre collés ; un trou de 15 mm de diamètre est effectué avec une perceuse de précision sur l'un des couvercle avant d'être assemblé. **b.** Vue rapprochée du capillaire introduit dans la couche de phase continue.

2.2 Dissolution des lipides

La dissolution des lipides dans l'huile minérale est un point clé pour le succès de la méthode et nécessite une attention particulière tout au long de la préparation. En particulier, le contrôle de l'humidité est critique et toute la dissolution est faite dans une boîte à gants en plastique alimentée par de l'azote pour stabiliser le taux d'humidité entre 8 et 12 %. Les lipides proviennent indifféremment de chez Sigma Aldrich ou Avanti Polar Lipids. Dès leur réception, ils sont dissous à 50 mg/ml dans un mélange chloroforme/méthanol (proportion 9:1, v/v). On laisse la solution mère reposer pendant trois semaines au congélateur avant de pouvoir l'utiliser durant cinq mois.

Une bouteille en verre de 25 ml, hermétique, préalablement séchée à l'azote est ouverte dans la boîte à gants. 160 μ l de la solution mère de lipides sont ajoutés à 200 μ l du mélange chloroforme/méthanol (9:1) de façon à recouvrir complètement le fond de la bouteille. Le solvant est alors évaporé sous vide pendant une vingtaine de minutes, résultant en un film de lipides très blanc, opaque, sur le fond de la bouteille. Le vide est alors cassé dans la boîte à gants (toujours à 8-12% d'humidité) et 20 ml d'huile minérale (sigma aldrich #M3516) sont ajoutés pour atteindre une concentration finale en lipide de 0,5 mM. La bouteille, fermée hermétiquement est laissée au repos sur la paillasse pendant une heure. L'huile minérale imprègne alors le film de lipides que l'on voit apparaître au cours du temps légèrement blanc sur le fond. Finalement, la solution est vortexée durant une vingtaine de seconde avant de la soniquer pendant une heure en maintenant la température du bain inférieure à 40°C pour ne pas dégrader les lipides. Dès les premières secondes de sonication, le film de lipide doit commencer à se détacher du fond de la bouteille. Après la sonication, la solution est complètement transparente et on la laisse reposer toute une nuit durant laquelle elle évolue et devient trouble. Il est préférable, pour la qualité des vésicules, de l'utiliser dans les trois jours.

2.3 Préparation des capillaires

Les capillaires en verres sont dans un premier temps étirés (P-87 Sutter instrument) puis le diamètre est ajusté à la taille désirée avec une microforge (microforge de Fontbrune, Beaudouin 5462). Typiquement le diamètre est compris entre 3 et 30 μ m pour produire des vésicules dans la gamme 4-100 μ m. Pour faciliter l'introduction du capillaire dans la chambre, l'extrémité est courbée à angle droit au dessus d'une flamme. Afin d'éviter des problèmes de mouillage sur les parois externes du capillaire et de les rendre hydrophobes, la pointe est traitée au silane.

Le protocole de traitement est le suivant: un premier bain dans l'acide sulfochromique pour nettoyer, rinçage à l'eau pure et séchage à l'azote, immersion de

la pointe 30 secondes dans la solution de silane (mélange de 90% méthanol, 10% eau et 0.1% silane #435708 sigma) puis séchage à l'azote pour expulser le fluide restant à l'intérieur du capillaire et cuisson pendant une heure à 100°C.

2.4 Mesure de tension de surface

2.4.1 Expérience de goutte pendante

La méthode dite de la goutte pendante est la solution retenue pour mesurer la tension de surface entre la solution à encapsuler et la solution d'huile contenant les lipides. Pas trop difficile à mettre en œuvre, elle donne des résultats précis (de l'ordre de quelques mN/m). Lors d'une expérience de mesure, une goutte du fluide le plus dense est gonflée au bout d'un capillaire dans le fluide le moins dense. La forme de la goutte dépend alors de la compétition entre les forces de tension de surface qui tendent à garder la goutte sphérique et le poids de la goutte qui la déforme.

En pratique, une goutte de 15 μl est gonflée à un débit de 5500 $\mu\text{l}/\text{h}$ dans une solution d'huile avec des lipides. Au cours du temps, les lipides s'adsorbent sur la surface de la goutte, la tension de surface décroît et la goutte se déforme jusqu'à casser lorsque le poids devient trop important. Pour éviter des problèmes de mouillage, le capillaire est traité au silane (voir protocole précédent). L'évolution de la forme de la goutte est enregistrée avec une caméra sur laquelle est monté un objectif macro sur soufflet pour obtenir une meilleure résolution (idéalement la goutte déformée occupe la surface entière du capteur de la caméra soit 600x800 pixels). La goutte est éclairée par derrière à travers un matériau diffusant résultant ainsi en un fort contraste entre la goutte et l'arrière plan. Pour obtenir une échelle de longueur et éviter les aberrations optiques, une bille d'acier de diamètre connu est prise en photo dans la solution d'huile. Enfin, l'évolution de la tension de surface est déterminée par analyse d'image du contour de la goutte.

2.4.2 Analyse d'image pour déterminer la tension

Pour une goutte pendante à l'équilibre, on peut écrire en un point $S(x,z)$ de la surface l'équation de Young-Laplace qui décrit la différence de pression à l'interface due aux forces de tension de surface:

$$(\Delta P)_S = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right), \quad (2.1)$$

où γ représente la tension de surface et $R_1 = SM$, $R_2 = SN$ sont les deux rayons de courbure principaux de la surface au point S (voir figure 2.2). A l'apex (le point le plus bas de la goutte) $R_1 = R_2 = b$ et la différence de pression s'écrit:

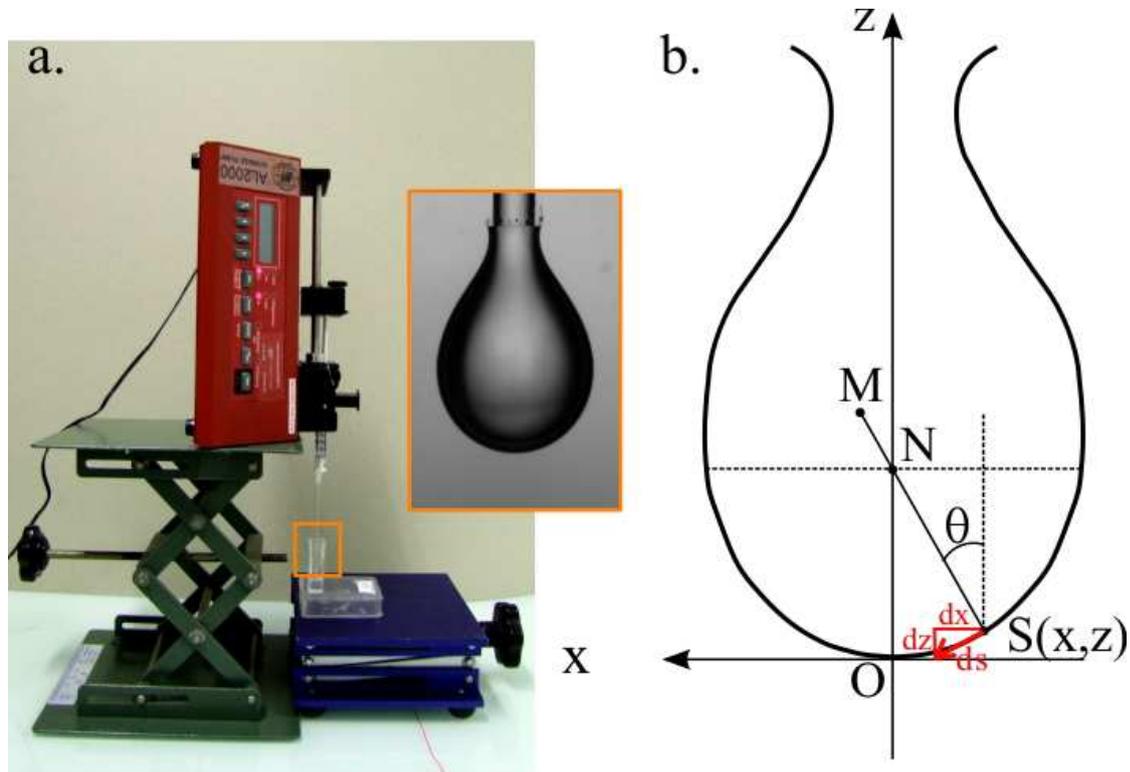


FIG. 2.2: **a.** Montage expérimental pour la mesure de tension de surface: une seringue contenant la solution aqueuse est connectée à un capillaire de verre traité hydrophobe et fixée sur un pousse seringue disposé verticalement; l'extrémité du capillaire trempe dans la solution d'huile contenant les lipides. Dans le cadre, un zoom sur la goutte gonflée dans l'huile au bout du capillaire. **b.** Paramètres géométriques pour décrire le contour d'une goutte: $R_1 = SM$ est le premier rayon de courbure contenu dans le plan (xz) , $R_2 = SN$ est le second rayon de courbure contenu dans le plan perpendiculaire à (xz) passant par SN , $d\vec{s}$ est le déplacement élémentaire le long de l'abscisse curviligne.

$$(\Delta P)_0 = \frac{2\gamma}{b}. \quad (2.2)$$

En un point $S(x,z)$ quelconque de la surface, on a la pression du côté de la phase aqueuse $P_a = (P_a)_0 + \rho_a g z$ et du côté de la phase huile $P_h = (P_h)_0 + \rho_h g z$, avec $(P_a)_0$ et $(P_h)_0$ les pressions à l'apex dans chaque phase, ρ_a et ρ_h les densités de la phase aqueuse et de la phase huile respectivement. Le saut de pression au point S s'écrit alors:

$$(\Delta P)_s = \frac{2\gamma}{b} + \Delta\rho g z. \quad (2.3)$$

Par des considérations géométriques simples (voir figure 2.2), on peut écrire $z = R_2 \cos \theta$ et $dS = R_1 d\theta$, soit:

$$\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} = \frac{d\theta}{dS} + \frac{\cos \theta}{z}, \quad (2.4)$$

où dS est l'élément infinitésimal de déplacement de la coordonnée curviligne. On cherche à exprimer R_1 et R_2 en coordonnées cartésiennes. On a $(dS)^2 = (dx)^2 + (dz)^2$, soit:

$$\frac{dS}{dx} = \sqrt{1 + \left(\frac{dz}{dx}\right)^2}, \quad (2.5)$$

de plus,

$$\frac{d\theta}{dS} = \frac{d\theta}{dx} \frac{dx}{dS} = \frac{d\theta}{dx} \frac{1}{(1 + \dot{z}^2)^{1/2}}. \quad (2.6)$$

De $dz = dS \sin \theta$ et $dx = dS \cos \theta$, on en déduit que

$$\frac{d^2 z}{dx^2} = \frac{d(\tan \theta)}{dx} = \frac{1}{\cos^2 \theta} \frac{d\theta}{dx} = (1 + \dot{z}^2) \frac{d\theta}{dx}, \quad (2.7)$$

soit en reportant dans 2.6:

$$\frac{d\theta}{dS} = \frac{\ddot{z}}{(1 + \dot{z}^2)^{3/2}}. \quad (2.8)$$

Pour le rayon de courbure R_2 , il vient de $dx = dS \cos \theta$ et de l'équation 2.6:

$$\frac{1}{R_2} = \frac{\cos \theta}{z} = \frac{1}{z(1 + \dot{z}^2)^{1/2}}. \quad (2.9)$$

Finalement, en reportant 2.3, 2.8 et 2.9 dans l'équation de Young-Laplace (2.1), on obtient l'équation différentielle suivante pour le contour de la goutte:

$$\frac{\ddot{z}}{(1 + \dot{z}^2)^{3/2}} + \frac{\dot{z}}{z(1 + \dot{z}^2)^{1/2}} = \frac{2\gamma}{b} + \Delta\rho g z; \quad (2.10)$$

$\Delta\rho$ et g sont connus, le rayon de courbure à l'apex b est mesuré sur les images et la tension de surface γ est le paramètre d'ajustement.

Sur les images, le contour de la goutte ayant été extrait, on cherche une solution polynomiale à l'équation 2.10 qui passe par les points du contour en utilisant une méthode des moindres carrés.

2.5 Détermination des distributions de taille par analyse d'image

Les distributions de taille des gouttelettes et des vésicules sont obtenues par traitement d'image à partir de photos prises en champ clair pour les gouttelettes et en contraste de phase pour les vésicules. Une variante pour faciliter le traitement d'image dans le cas des vésicules consiste à encapsuler une solution de billes fluorescentes de 20 ou 60 nm. Lors du traitement, un premier filtre sobel (un opérateur qui calcule les variations d'intensité) est appliqué pour détecter les contours, ceux-ci sont ensuite affinés puis l'image est binarisée. Cette image constitue le point de départ pour la recherche des gouttes ou vésicules par la méthode de la transformée de Hough. Le principe est le suivant: pour un cercle de rayon R connu, tous les points (x,y) appartenant à son périmètre peuvent générer un cercle de centre (x,y) et de rayon R , l'intersection (a,b) commune à tous ces cercles est le centre du cercle recherché (voir figure 2.3); si le rayon est inconnu alors chaque point (x,y) de l'image appartenant à un cercle, génère un cône dans l'espace paramétré de dimension 3 (a,b,r) ; la recherche se ramène alors au problème précédent en effectuant une recherche dans chaque plan $r = \text{constante}$. En construisant pour chaque valeur de r une matrice d'accumulation (figure 2.3c) qui représente le nombre d'intersections de cercles en chaque point et après un seuillage sur cette matrice, on obtient finalement les triplets (a,b,R) pour chaque cercle de l'image initiale. On vérifie la pertinence du traitement en superposant les cercles détectés avec l'image initiale (figure 2.3g).

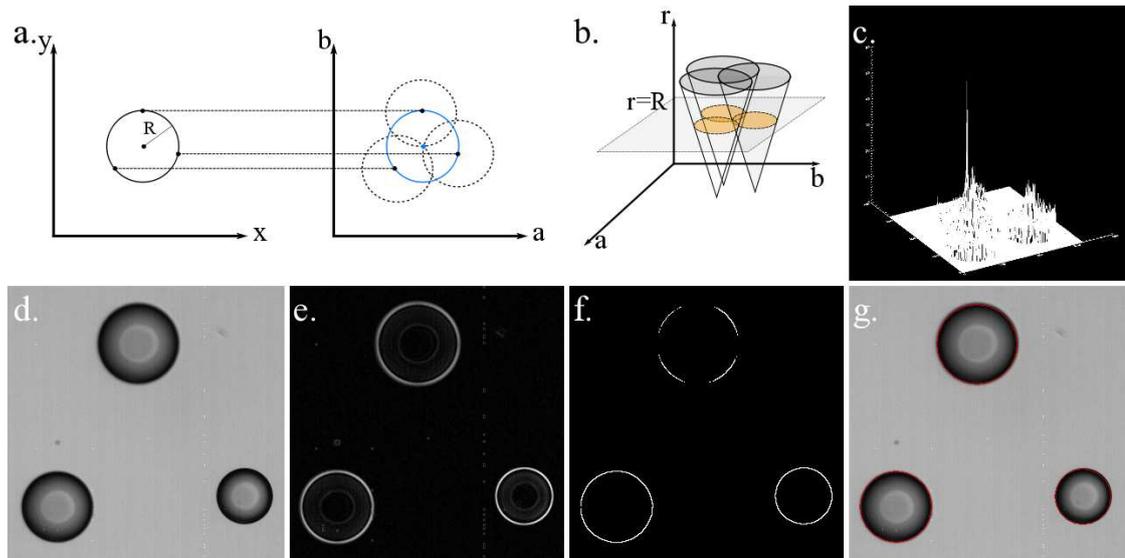


FIG. 2.3: **a.** Chaque point de coordonnées (x,y) appartenant à un cercle de rayon R , génère dans l'espace paramétré un cercle de rayon R et de centre (x,y) ; le point d'intersection (a,b) de ces cercles correspond aux coordonnées du centre du cercle recherché dans l'espace géométrique. **b.** Si les rayons ne sont pas connus, chaque point du périmètre génère alors un cône dans l'espace paramétré de dimension 3; le problème se ramène à deux dimensions pour chaque coupe $r=R$. **c.** Exemple d'une matrice d'accumulation pour un R donné: en chaque point de l'espace paramétré, le nombre d'intersections est reportée. **d.** Image originale en champ clair de gouttelettes. **e.** Détection des contours après application du filtre sobel. **f.** Image binaire et affinage des contours. **g.** Superposition de l'image originale et des cercles détectés

Chapitre 3

Continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation (cDICE): des gouttelettes aux vésicules

Le principe du passage à une interface huile/eau de gouttelettes stabilisées par des lipides, exploité dans la méthode de l'émulsion inverse [41] et du transfert spontané [23] est une idée élégante nécessitant d'être approfondie et sa mise en œuvre modifiée. En particulier, le manque de contrôle de la production des gouttelettes, du recouvrement en lipides des interfaces et du passage final, est directement responsable du faible rendement et de la non reproductibilité de ces techniques de passage d'interface. Partant de ce constat, nous proposons un dispositif expérimental simple permettant un contrôle fin de ces différents points, levant ainsi les principales limitations évoquées précédemment.

3.1 Principe de fonctionnement

L'astuce est de concilier en une seule étape et sur un seul montage, la production de gouttelettes monodisperses, la stabilisation de cette émulsion par des lipides et le passage à une interface huile/eau couverte de lipides pour l'assemblage final de la bicouche. Le dispositif expérimental représenté sur la figure 3.1, consiste en une chambre cylindrique en rotation autour de son axe vertical dans laquelle trois solutions sont successivement introduites: une solution aqueuse qui sera la solution de suspension des vésicules produites (dans la suite on la notera DAS pour Dispersing Aqueous Solution), une solution moins dense de lipides dissous dans de l'huile (notée LOS pour Lipid in Oil Solution) et un alcane servant de phase continue (le plus souvent du décane) de faible viscosité et de densité plus faible que les solutions précédentes et servant à la production contrôlée des gouttelettes

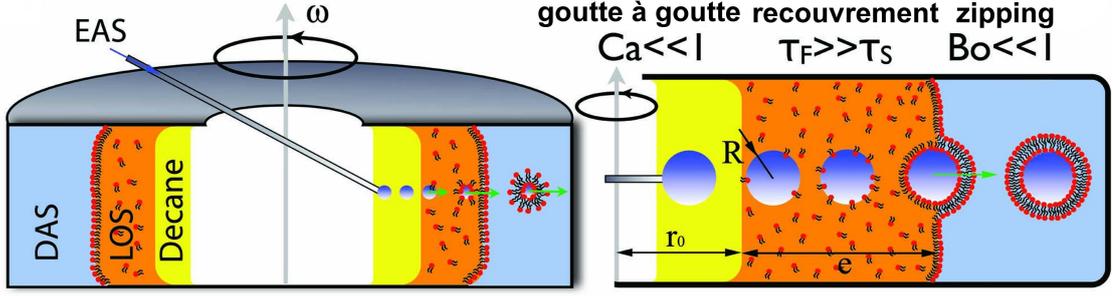


FIG. 3.1: Vue de côté de la chambre, le capillaire est fixe et la chambre tourne à la vitesse angulaire ω . Les gouttelettes monodisperses de la solution à encapsuler sont produites dans la couche de décane à faible nombre capillaire C_a et sous l'action de la force centrifuge transitent dans la LOS vers l'interface LOS/DAS. Le temps τ_s nécessaire pour que les lipides saturer la surface d'une gouttelette doit être plus petit que le « temps de vol » τ_F dans la LOS. Le passage à l'interface a lieu dans un régime pour lequel les forces inertielles sont faibles devant les forces de tension de surface.

monodisperses. Ces trois couches de fluides immiscibles, sous l'action de la force centrifuge, forment entre elles des interfaces verticales. Un capillaire contenant la solution aqueuse que l'on souhaite encapsuler (notée EAS pour Encapsulated Aqueous Solution) est introduit dans la phase continue (CP) en restant au plus près de l'interface avec l'air. L'EAS est alors injectée à débit constant. Lorsque les forces de tension de surface dominent les forces visqueuses, définissant ainsi le régime d'écoulement à faible nombre capillaire $C_a = \eta_{cp} v_{cp} d / \gamma d_i \ll 1$ (η_{cp} et v_{cp} sont la viscosité et la vitesse de la phase continue, d et d_i les diamètres respectifs des gouttelettes et du capillaire et γ la tension de surface EAS/CP), les gouttelettes arrachées de la pointe du capillaire ont une distribution de taille très étroite (figure 3.5). Ces gouttelettes sont immédiatement soumises à la force centrifuge qui les pousse radialement vers l'interface LOS/DAS. Durant leur trajet dans la couche de LOS, les lipides s'adsorbent sur la surface des gouttelettes. Lors de cette étape, le temps τ_F nécessaire aux gouttelettes pour traverser la couche de LOS d'épaisseur e , doit être plus grand que le temps caractéristique τ_s pour saturer les interfaces en lipides. Dans le régime des faibles nombres de Reynolds, pour lequel les forces inertielles sont négligeables devant les forces visqueuses, τ_F se détermine à partir de l'équilibre atteint en régime stationnaire entre la force de Stokes et la force centrifuge agissant sur la gouttelette: $\tau_F = 9\eta / (2\Delta\rho R^2 \omega^2) \ln(1 + e/r_0)$ ¹,

¹A faible nombre de Reynolds, l'équilibre entre la force de Stokes et la force centrifuge revient à résoudre l'équation différentielle du premier ordre suivante: $\Delta\rho \frac{4}{3}\pi R^3 \omega^2 r(t) - 6\pi\eta R \frac{dr}{dt} = 0$

où η est la viscosité de la LOS, $\Delta\rho$ la différence de densité entre EAS/LOS, R le rayon des gouttelettes, ω la vitesse angulaire de la chambre et r_0 la distance au centre d'où sont produites les gouttelettes. Lorsque les gouttelettes atteignent l'interface LOS/DAS également saturée en lipides, les deux monocouches de lipides s'assemblent au cours du passage au travers de l'interface pour former la bicouche lipidique renfermant la solution encapsulée. Les vésicules ainsi formées sont suspendues dans la DAS. Nous décrivons par la suite les différents mécanismes qui sous-tendent ces trois étapes.

3.2 Production des gouttelettes

3.2.1 Contrôle de la taille

Le dispositif d'injection dans la chambre en rotation consiste en un capillaire de verre introduit radialement dans la phase continue non aqueuse, l'application d'une différence de pression ΔP permet alors d'injecter l'EAS dans la CP (figure 3.2). Grâce à ce système, des gouttelettes sont formées de façon continue: chaque fois que les forces visqueuses l'emportent sur les forces de tension de surface qui maintiennent la goutte sur le capillaire, une gouttelette se détache.

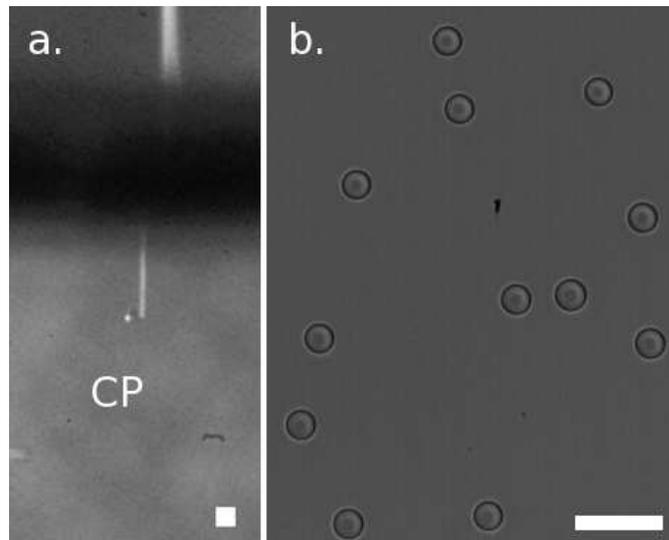


FIG. 3.2: **a.** Vue de dessus de la chambre, le capillaire est introduit dans la phase continue (CP) et une gouttelette est sur le point d'être détachée (flux de la droite vers la gauche). **b.** Exemple d'émulsion produite avec le montage décrit précédemment. L'échelle représente $30\mu\text{m}$ dans les deux cas.

Dans le cas du régime $C_a \ll 1$, les gouttelettes retenues à la pointe du capillaire par la tension de surface, gonflent puis se détachent au niveau de la pointe, formant ainsi des gouttelettes monodisperses (figure 3.3a.). Au contraire, lorsque $C_a \sim 1$, les forces visqueuses étirent la goutte en formation en un long cou instable donnant lieu à un mécanisme de pincement éloigné de la pointe et aléatoire (figure 3.3b.).

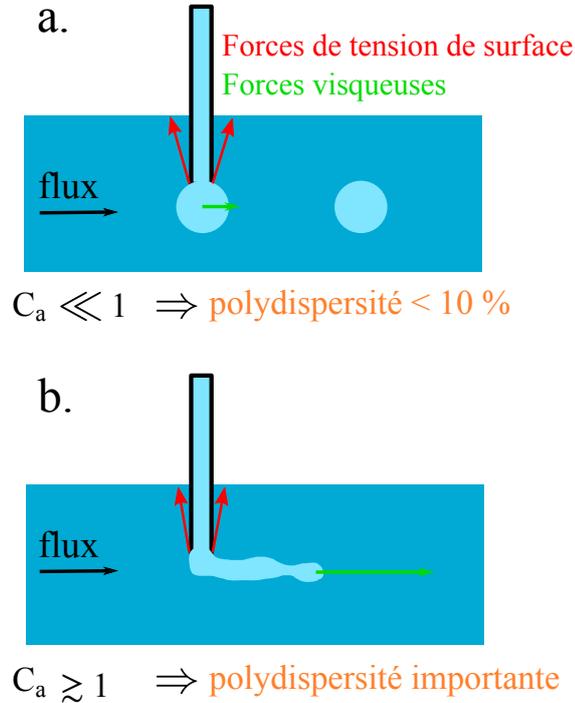


FIG. 3.3: **a.** A bas nombre capillaire, les gouttelettes grossissent sans grande déformation et se détachent de la pointe du capillaire quand les forces visqueuses excèdent les forces de tension superficielles, résultant en la production de gouttelettes monodisperses. **b.** Lorsque le nombre capillaire n'est plus suffisamment faible, les forces visqueuses étirent la gouttelette dont la surface se déstabilise et se détache de façon irrégulière.

En écrivant l'équilibre des forces de tension de surface ($\sim \pi\gamma d_i$) et des forces visqueuses ($\sim 3\pi\eta dv$), la taille des gouttelettes peut être exprimée en fonction du nombre capillaire:

$$\frac{d}{d_i} = A \frac{1}{C_a}, \quad (3.1)$$

où d et d_i sont respectivement le diamètre de la gouttelette et le diamètre interne du capillaire. En considérant la force visqueuse égale, en première approximation,

à la force de Stokes s'appliquant sur une sphère de diamètre d , $F_{\text{stokes}} = 3\pi\eta_{cp}dv_{cp}$, alors $A = 1/3$. Nous avons mesuré le rapport d/d_i pour une grande gamme de valeur de C_a , les résultats sont représentés sur la figure 3.4 et l'on trouve une décroissance en $1/C_a$ avec une amplitude $A_{\text{fit}} = 0,11$; du même ordre de grandeur que la valeur théorique donnée par la loi de Stokes. La formule donnée par Stokes est valable pour un écoulement autour d'une sphère éloignée de parois ce qui n'est pas le cas dans notre système où les gouttelettes sont retenues à la pointe d'un capillaire, modifiant ainsi l'écoulement autour de celles-ci. De plus l'angle des forces capillaires n'est pas forcément selon la verticale et il y a un écoulement dans la gouttelette.

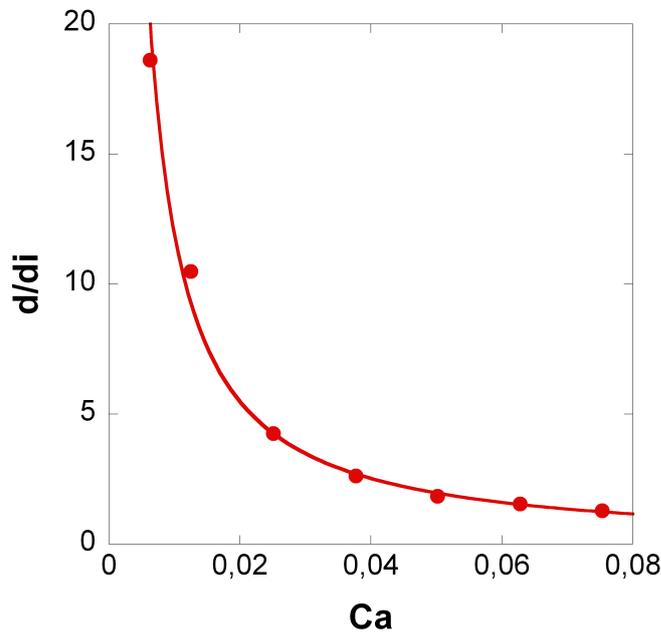


FIG. 3.4: Diamètre des gouttelettes produites normalisée par le diamètre interne du capillaire en fonction du nombre capillaire. La courbe passant par les points expérimentaux est un ajustement de la fonction $\frac{d}{d_i} = A\frac{1}{C_a}$ avec $A=0,11$.

La taille des gouttelettes est donc contrôlée par deux paramètres: d_i et C_a . Afin d'obtenir une taille donnée d , il est donc possible de faire varier les trois paramètres η_{cp} , v_{cp} et d_i (la tension de surface variant assez peu) tout en se plaçant toujours à un C_a faible. Changer la viscosité η_{cp} implique de trouver un fluide non aqueux, de densité inférieure à la LOS et avec un contraste de viscosité important par rapport à la LOS pour ralentir leur mélange. La vitesse v_{cp} est fixée entre autre par ω , la vitesse de rotation; celle-ci ayant également une influence sur la force centrifuge

agissant sur les gouttelettes et donc sur les autres étapes de la formation, nous éviterons par la suite d'utiliser ce paramètre pour le contrôle de la taille. Le plus simple reste d'ajuster la taille du capillaire d_i . Ainsi pour des tailles de capillaires comprises entre 4 et 30 μm , des gouttelettes monodisperses peuvent facilement être produites dans l'intervalle 4-100 μm de diamètre (figure 3.5). Dans notre géométrie d'injection avec le capillaire introduit radialement à la phase continue, le débit ne joue pas de rôle sur la taille des gouttelettes. Des variations sont observées lorsque le capillaire n'est plus radial, il faut alors tenir compte de la vitesse relative entre EAS et CP, et le rapport $d/d_i \propto Q^{1/3}$ avec Q le débit d'injection [42].

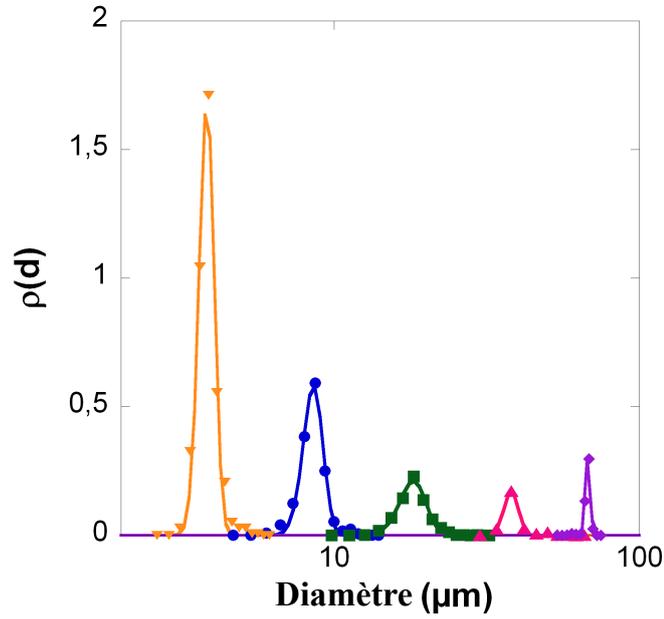


FIG. 3.5: Distribution de taille des gouttelettes produites dans la gamme 4-70 μm . La densité de probabilité $\rho(d)$ est représentée en fonction du diamètre. Les courbes correspondent à des ajustements gaussiens avec $\langle d \rangle = 3,8 \mu m$ et $\sigma = 0,2 \mu m$ (triangles renversés orange); $\langle d \rangle = 8,5 \mu m$ et $\sigma = 0,6 \mu m$ (cercles bleu); $\langle d \rangle = 18,2 \mu m$ et $\sigma = 1,8 \mu m$ (carrés vert); $\langle d \rangle = 38 \mu m$ et $\sigma = 2 \mu m$ (triangles roses); $\langle d \rangle = 67,9 \mu m$ et $\sigma = 1,2 \mu m$ (losanges violet). Les gouttelettes ont été produites dans l'ordre croissant des tailles, à un nombre capillaire $C_a = 0,2$ et un capillaire de 4 μm ; $C_a = 0,06$ et $d_i = 5 \mu m$; $C_a = 0,035$ et $d_i = 6 \mu m$; $C_a = 0,035$ et $d_i = 13 \mu m$ et $C_a = 0,04$ et $d_i = 27 \mu m$.

3.2.2 Fréquence de production

Pour un nombre capillaire donné fixant le diamètre des gouttelettes, la fréquence de production f_{drop} est déterminée par le débit d'injection Q qui dépend de la différence de pression appliquée:

$$Q = \frac{\Delta P}{R_H}, \quad (3.2)$$

où ΔP est la différence de pression et R_H la résistance hydrodynamique du capillaire donnée par la relation $R_H = 8\eta L/\pi R^4$ dans le cas d'un capillaire cylindrique de rayon R et de longueur L avec η la viscosité du fluide injecté.

Par ailleurs, pour des petits diamètres de capillaire, la pression de Laplace $\Delta P_L = 4\gamma/d_i$ s'opposant à la sortie du fluide est non négligeable: pour des pressions d'injections inférieures à la pression de Laplace, la production de gouttelettes cesse; à des pressions supérieures à ΔP_L , le débit est proportionnel à ΔP et la fréquence de production des gouttelettes augmente linéairement avec ΔP .

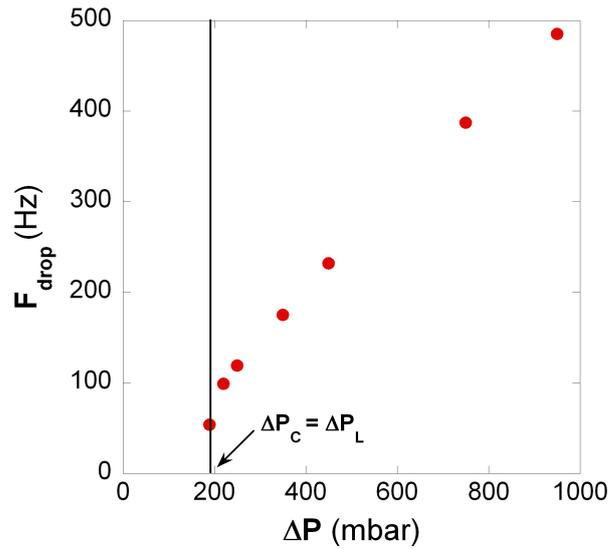


FIG. 3.6: Fréquence de production des gouttelettes en fonction de la différence de pression appliquée. Les gouttelettes sont produites dans du décane avec un capillaire de $10,8 \mu m$ et à une vitesse de 30 trs/s, la tension de surface entre la solution de sucrose 400 mM et le décane est égale à 52 mN/m. La ligne verticale à 193 mbar représente la pression de Laplace calculée, en bonne adéquation avec la pression de coupure $\Delta P_c = 190$ mbar. La fréquence de production croît linéairement avec la pression au dessus de ΔP_c .

Expérimentalement, la pression de coupure ΔP_c en dessous de laquelle la production de gouttelettes est stoppée, correspond comme attendu, à la pression de Laplace calculée (figure 3.6). La fréquence de production s'exprime donc $F_{drop} = \Delta P \pi d^3 / 6 R_H$

3.3 Dispersion des lipides et lipides aux interfaces

Le contrôle de la couverture en lipides des interfaces eau-huile et en particulier des gouttelettes durant leur traversée de la solution d'huile contenant les lipides (LOS), est un point primordial pour le succès de la production de vésicules. La surface des gouttelettes doit être saturée en lipides avant d'atteindre l'interface LOS/DAS en un temps τ_s inférieur à τ_F , le temps pour traverser la couche d'huile.

3.3.1 Cinétique d'adsorption

Nous avons mesuré la cinétique d'adsorption des lipides à l'interface eau-huile par des expériences de goutte pendante [43]. L'évolution au cours du temps de la tension de surface γ entre la solution aqueuse à encapsuler (EAS) et la LOS est représentée sur la figure 3.7 pour différentes concentrations en Egg-PC.

Pour chaque concentration, γ décroît pour atteindre une valeur finale de 11 mN/m lorsque, les forces de tension de surface ne pouvant plus contrebalancer le poids de la goutte, celle-ci se détache du capillaire. Pour chaque concentration, il est possible d'ajuster les valeurs mesurées par une exponentielle décroissante, cette fonction n'a qu'une valeur empirique mais permet néanmoins d'extraire un temps caractéristique τ_s pour saturer l'interface: $\tau_s = 14$ s à 0,5 mM; $\tau_s = 25$ s à 0,25 mM et $\tau_s = 55$ s à 0,125 mM. Les modèles développés dans le cadre de la cinétique d'adsorption contrôlée par la diffusion moléculaire des phospholipides à l'interface chloroforme-eau [44, 45] ne permettent pas de décrire nos expériences, probablement parce que les lipides dispersés dans l'huile minérale forment des agrégats micrométriques que nous allons décrire dans le paragraphe suivant.

Les résultats des expériences de goutte pendante montrent la forte dépendance à la concentration en lipides de la cinétique d'adsorption à l'interface eau-huile. La cinétique relativement rapide obtenue pour la concentration de 0,5 mM ($\tau_s = 14$ s), est bien adaptée aux contraintes géométriques de notre chambre de production. En effet, la taille restreinte de la chambre ne permet pas d'avoir une épaisseur de LOS importante (2-3 mm), le temps τ_F étant par conséquent court, il est nécessaire d'obtenir une cinétique d'adsorption rapide. Pour une taille de goutte donnée, il faut s'assurer que la condition $\tau_F > \tau_s$ est bien respectée. τ_F peut être ajusté en

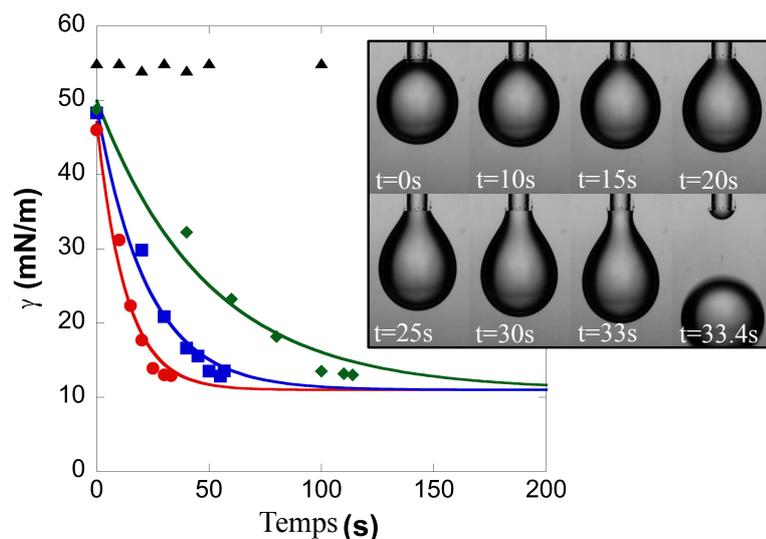


FIG. 3.7: Evolution de la tension de surface entre une solution de sucrose à 400 mM et des solutions à différentes concentrations d'Egg-PC dissous dans l'huile minérale: 0,5 mM (ronds rouge); 0,25 mM (carrés bleu); 0,125 mM (losanges vert) et huile minérale seule (triangles noir). Les données sont ajustées par des exponentielles décroissantes desquelles on extrait le temps caractéristique τ_s pour saturer l'interface: $\tau_s(0,5mM) = 14s$; $\tau_s(0,25mM) = 25s$; $\tau_s(0,125mM) = 55s$. Le décalage au temps $t=0$ entre l'huile seule et les autres courbes est dû au début d'adsorption des lipides durant le gonflement de la goutte. Dans le cadre, les photos illustrent la déformation de la goutte sous l'action de son poids lorsque la tension de surface diminue; cette série correspond à la dynamique pour une concentration de 0,5 mM d'Egg-PC (courbe rouge à gauche).

modifiant certains des paramètres dont il dépend: $\Delta\rho$, η , e (épaisseur de la couche de LOS) et ω^2 .

La différence de densité $\Delta\rho$ entre EAS et LOS n'est pas un paramètre que l'on peut faire varier de façon conséquente car le gain sera très faible au regard de la dépendance linéaire. Afin d'accroître τ_F , il est possible d'augmenter la viscosité η de la LOS. Pour cela, il faut soit dissoudre des lipides dans une huile plus visqueuse que l'huile minérale ($\eta = 30$ mPas) tout en s'assurant d'une cinétique d'adsorption rapide, ou bien effectuer un mélange entre une solution d'huile minérale plus concentrée en lipides avec un autre alcane plus visqueux. Il est donc également difficile d'obtenir une forte augmentation de τ_F à partir de la viscosité. La vitesse de rotation ω est en revanche un levier important du fait de la dépendance en ω^2 de τ_F . Cependant il faudra alors adapter en conséquence le diamètre du capillaire

et/ou la viscosité de la phase continue pour conserver le nombre capillaire initial qui fixe la taille des gouttelettes produites (se reporter à la figure 3.4). Enfin, on peut également ajuster l'épaisseur de la couche de LOS même si la marge est faible du fait des contraintes géométriques. Enfin, la stratégie consistant à augmenter la concentration de lipides pour diminuer τ_s n'est pas recommandée. En effet, il est préférable de ne pas travailler à des concentrations plus élevées que 0,5 mM. Au delà, la vésiculation spontanée aux interfaces eau-huile devient importante [41], entraînant par la même, une dégradation de la qualité des vésicules.

Nous avons également réalisé des expériences de goutte pendante pour d'autres lipides ou mélange de lipides (figure 3.8). Pour 0,5 mM de POPS (lipide chargé négativement) la décroissance au cours du temps de la tension de surface n'est plus monotone. Nous observons une première marche suivie d'un long plateau avant de décroître à nouveau par une marche. Ce comportement pourrait s'expliquer par la présence d'agrégats de lipide de taille importante ($> 30\mu m$) dans la solution d'huile: quand l'un de ces agrégats rencontre la surface de la goutte, la grande quantité de lipides présents résulte en une décroissance soudaine de la tension de surface qui stagne alors jusqu'à ce qu'un nouvel agrégat s'adsorbe. Ce comportement peut certainement être corrigé en utilisant un protocole de dissolution adéquat (voir discussion de la section suivante).

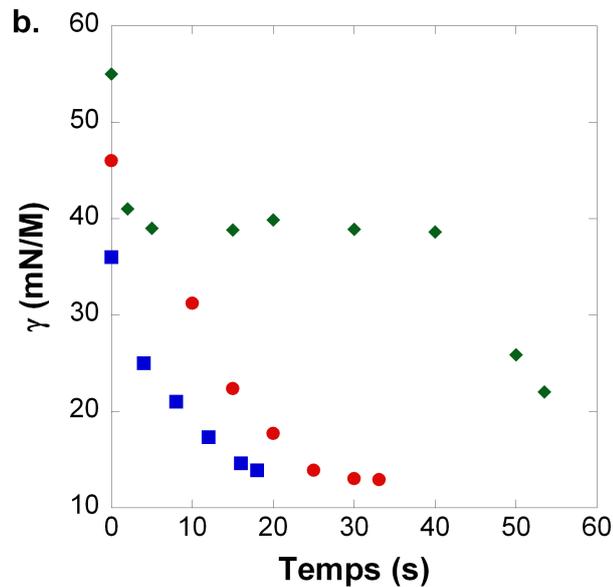


FIG. 3.8: Evolution de la tension de surface pour 0.5 mM de lipides: Egg-PC (cercles rouges), 95% Egg-PC et 5% Peg-PE (carrés bleu), POPS (losanges vert).

Idéalement il serait nécessaire de mesurer la cinétique d'adsorption pour tous

nouveaux lipides ou mélange de lipides afin de s'assurer que la condition $\tau_F > \tau_s$ puisse être vérifiée. Le tableau 3.1 liste les différents systèmes préparés sans modification du protocole décrit dans la partie méthodes expérimentales, et avec lesquels nous avons produit avec succès des vésicules avec la méthode cDICE.

Lipides seul	Mélanges de lipides
Egg-PC	Egg-PC + 10% POPS
DOPC	Egg-PC + 10% DOPG (une charge -)
POPS (une charge -)	Egg-PC + 10% PIP2 (3 charges -)
	Egg-PC + 5% PEG-PE

TAB. 3.1: Lipides et mélanges de lipides utilisés pour la production de vésicules.

3.3.2 Dispersion des lipides

La dispersion des lipides dans l'huile minérale est une étape critique pour obtenir une cinétique d'adsorption rapide mais aussi pour déterminer la qualité finale des vésicules (présence de défauts sur la membrane ou encapsulation de « débris » lipidiques). Dans les solutions d'huile minérale les lipides ne sont pas dissous individuellement, si tel était le cas, la cinétique d'adsorption des lipides serait beaucoup plus lente. La diffusion des molécules de lipide (quelques nanomètres) dans l'huile minérale (viscosité 30 mPas) engendrerait des temps de saturation supérieur à la minute [45], en désaccord avec les cinétiques d'adsorption ($\simeq 15$ s) obtenues. En effet, pour les modèles d'adsorption limité par la diffusion, le temps de saturation $\tau_s \propto 1/D$ [46] avec D le coefficient de diffusion ($\propto 1/\eta$). Il est très probable que la présence en solution d'agrégats micrométriques, véritables réservoirs de lipides, permette les cinétiques rapides mesurées.

Lors de la dispersion des lipides dans l'huile minérale, une attention particulière doit être portée aux conditions d'humidité. L'obtention de solutions reproductibles est conditionnée par la dissolution des lipides sous atmosphère contrôlée à 10 % d'humidité tout au long de la préparation comme décrit dans le chapitre « méthodes expérimentales ». L'état final du film de lipides après évaporation du solvant est grandement dépendant de la teneur en eau due à l'humidité (figure 3.9) mais aussi de la cinétique d'évaporation: modifier le rapport chloroforme/méthanol résulte en un aspect du film différent donc d'organisation interne différente, responsable d'un état de dispersion dans l'huile minérale modifié.

La taille des agrégats de lipides en solution a une répercussion directe sur la qualité des vésicules. La figure 3.10 illustre les différences entre des vésicules produites à partir de trois LOS de 0,5 mM d'Egg-PC. La solution contenant des agrégats de taille inférieure à 5 μm donne les meilleurs résultats, les vésicules ne comportent

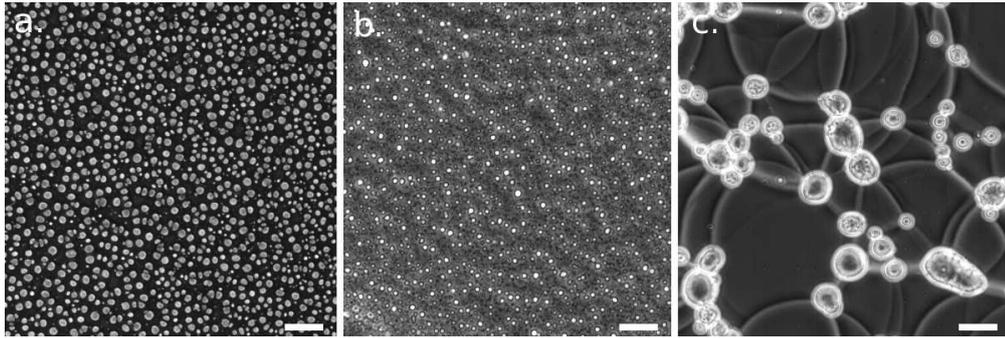


FIG. 3.9: Motifs de film de lipides préparés à différent taux d'humidité: **a.** 10 %; **b.** 23 % et **c.** 40 %. L'échelle représente 20 μm .

pas de défaut et sont stables plus d'un mois à température ambiante. Avec des agrégats dont la taille est comprise entre 5 et 10 μm , des défauts apparaissent, quelques vésicules renferment des résidus de lipides ou possèdent des défauts sur la membrane; quand les agrégats mesurent plus de 10 μm , la plupart des vésicules présentent des défauts sur leur membrane ou renferment des structures lipidiques.

Les dispersions de lipides dans l'huile minérale sont des systèmes qui évoluent dans le temps. Les premiers agrégats micrométriques apparaissent une nuit après la sonication et grossissent au cours du temps pour un échantillon laissé au repos. C'est pour cette raison qu'il est préférable d'utiliser la LOS durant les quelques jours qui suivent sa préparation.

3.3.3 Couverture continue des interfaces

Le renouvellement en lipides des interfaces est une condition essentielle à l'obtention d'un rendement important (le nombre de gouttelettes produites qui deviennent effectivement des vésicules). La production de gouttelettes par goutte à goutte et le contrôle de la fréquence de production que nous autorise ce système, permet d'individualiser la trajectoire de chaque gouttelette dans la LOS jusqu'au passage de l'interface, optimisant ainsi la couverture en lipides des interfaces eau-huile et le renouvellement des endroits déplétés en lipides. En effet, après le passage d'une gouttelette à l'interface LOS/DAS, toute une zone se retrouve déplétée en lipides. Si une gouttelette arrive sur l'interface à cet endroit avant que la zone aie eu le temps de se régénérer en lipides, alors le zipping complet des deux monocouches échoue et la gouttelette se dilue dans la DAS (figure 3.11).

En plus d'impacter le rendement, le passage raté d'une gouttelette laisse sur l'interface de nombreux débris lipidiques qui sont à l'origine de défauts: lorsqu'une gouttelette atteint l'interface en un endroit présentant des débris, la majorité des

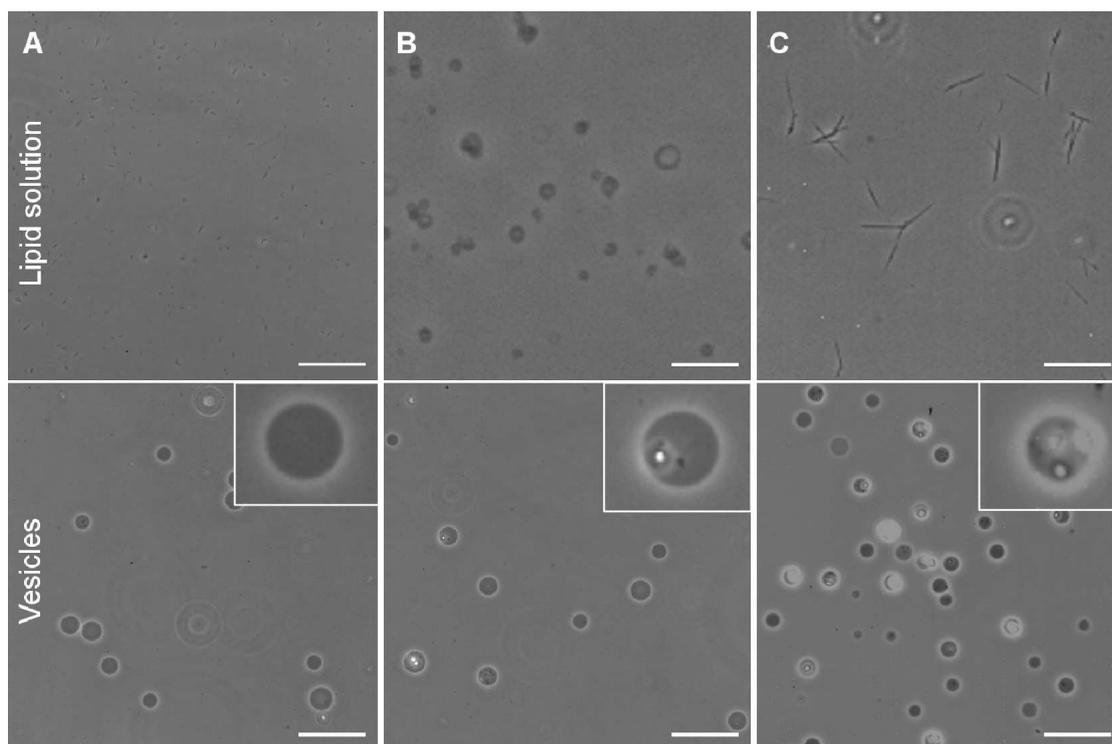


FIG. 3.10: Influence de la taille des agrégats de lipides sur la qualité des vésicules. Sur la rangée supérieure, photos de solutions contenant 0,5 mM d'Egg-PC: agrégats de 2 à 5 μm en **A**, de 5 à 10 μm en **B** et supérieur à 10 μm en **C**. Les photos de la rangée inférieure correspondent aux vésicules produites avec chaque solution: pour les plus petits agrégats, les vésicules ne présentent pas de défauts; pour les agrégats de taille supérieure en B, quelques vésicules possèdent des défauts sur la membrane ou renferment des objets lipidiques (petits points noirs); quand les agrégats sont trop gros C, la plupart des vésicules comportent des défauts. L'échelle représente 50 μm et la densité de vésicule n'est pas représentative de l'efficacité.

débris se retrouvent encapsulés dans la nouvelle vésicule ou bien sur sa membrane (figure 3.12).

Le renouvellement continu de la couverture en lipides des interfaces eau-huile, directement responsable d'un bon rendement, passe d'abord par l'utilisation d'une LOS dont la cinétique d'adsorption des lipides est rapide (typiquement une quinzaine de secondes) et par le contrôle de la fréquence de production des gouttelettes. Une fréquence trop élevée engendre inévitablement une diminution du rendement (voir donnée carré bleu sur la figure 3.17).

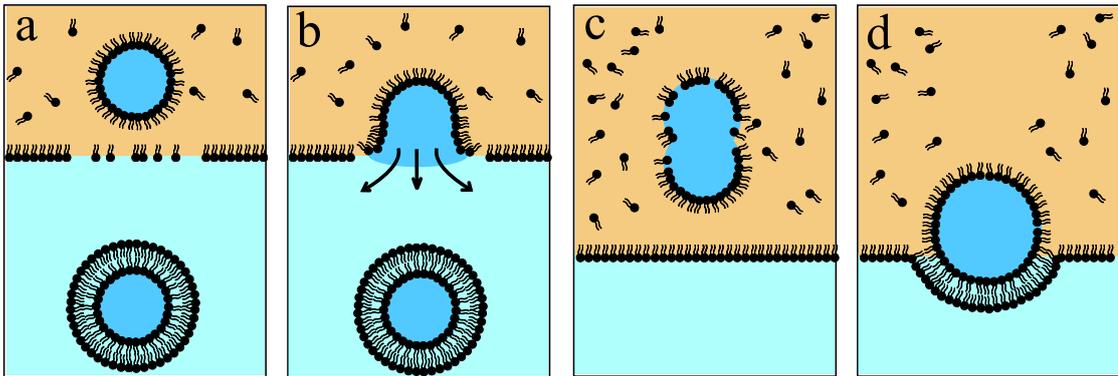


FIG. 3.11: **a.** Une gouttelette arrive sur l'interface à un endroit déplié en lipide dû à la formation d'une vésicule peu de temps auparavant. **b.** Dans ces conditions le zipping des deux monocouches n'a pas lieu et la gouttelette fusionne avec la DAS. **c.** Deux gouttelettes produites trop proche fusionnent dans la LOS. **d.** Le succès du passage de cette gouttelette issu d'une fusion résulte en la formation d'une vésicule de plus grosse taille et à une déplétion en lipide plus importante.

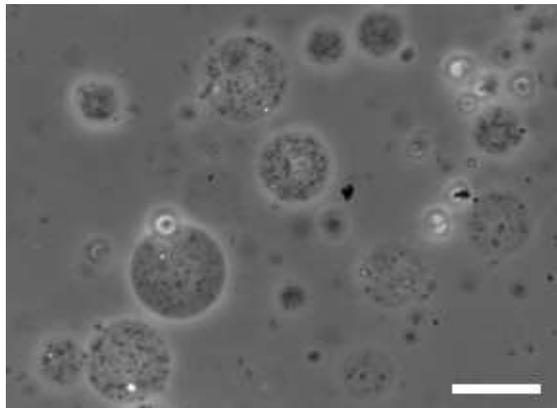


FIG. 3.12: Exemple extrême de vésicules renfermant des débris lipidique. Ces vésicules ont été préparées par la méthode de l'émulsion inverse, la photo illustre bien un des principal défaut de cette technique: des centaines de gouttelettes franchissent l'interface en même temps et environ 99 % ne deviennent pas des vésicules, l'interface se retrouve alors « tapissée » de débris qui sont à leur tour encapsulés lors de passages réussis.

3.4 Passage de l'interface

3.4.1 Approche et « zipping »

Approche de l'interface

La dynamique d'approche et de passage de l'interface est le point le moins approfondi, en partie dû au fait que l'observation sous microscope n'est pas évidente. Cependant des études théoriques [47, 48] et expérimentales [49] de l'approche d'une goutte à une interface, nous permettent de mieux appréhender les paramètres physiques importants qui gouvernent cette étape.

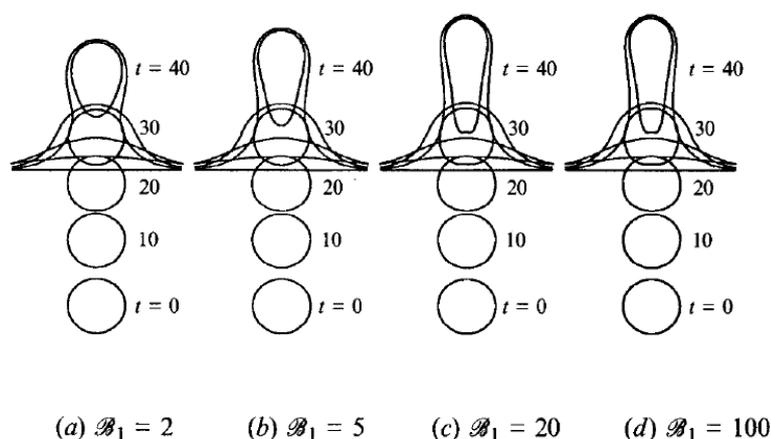


FIG. 3.13: Effet du nombre de Bond sur la déformabilité d'une gouttelette lors du son passage à une interface fluide/fluide (Manga et al. [50]).

Le nombre sans dimension $\mathcal{B}_o = \Delta\rho a R^2 / \sigma$ appelé nombre de Bond (ou nombre de Eötvös), compare les forces inertielles aux forces de tension de surface, avec $\Delta\rho$ la différence de densité entre les deux fluides, a l'accélération, R le rayon de la gouttelette et σ la tension de surface. Ce nombre est un bon critère pour évaluer la déformabilité des interfaces fluides. Lorsque les forces de tension de surface dominant, ce qui est le cas dans notre système pour lequel $\mathcal{B}_o = 10^{-4} - 10^{-3}$ pour des gouttelettes de taille comprise dans la gamme 10-100 μm de diamètre, les gouttelettes restent sphériques. Les simulations numériques du travail de thèse de Manga [47, 50] illustrent la relation entre nombre de Bond et déformation d'une goutte à l'approche et pendant le passage d'une interface fluide, plus ce nombre est faible et moins la goutte se déforme (figure 3.13).

A l'approche de l'interface LOS/DAS, pour des distances gouttelette-interface suffisamment petites (de l'ordre du rayon de la gouttelette), la présence de l'interface

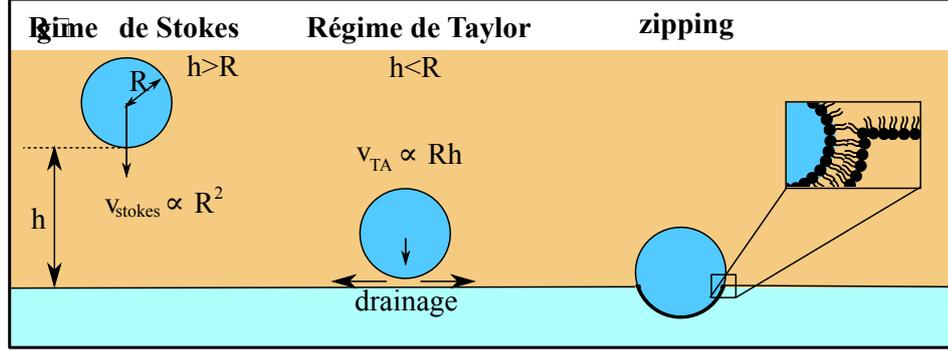


FIG. 3.14: Pour des distances à l'interface supérieures à R , la gouttelette est dans le régime de Stokes caractérisé par une vitesse $v_{Stokes} \propto R^2$. A des distances inférieures à R , la force visqueuse augmente due au drainage du film d'huile entre la gouttelette et l'interface. Cette dissipation engendre un ralentissement de la gouttelette et $v_{TA} \propto Rh$. Enfin, lorsque le film atteint une épaisseur critique, les deux monocouches de lipides zippent ensemble pour former la membrane.

génère des modifications de l'hydrodynamique. La vitesse de la gouttelette diminue due à l'augmentation de la friction visqueuse lors du drainage de l'huile entre l'interface et la gouttelette. Le régime de Stokes caractérisé par la vitesse $v_{Stokes} = 2\Delta\rho a R^2 / 9\eta$ n'est plus valide et la gouttelette entre dans le régime dit de Taylor² avec une vitesse corrigée [48] (calcul détaillé en annexe):

$$v_{TA} = \frac{2\Delta\rho a R h}{9\eta}, \quad (3.3)$$

où h est la distance entre la gouttelette et l'interface. Le temps de drainage τ_d est déterminé en calculant l'intégrale:

$$\tau_d = \int_{h_c}^{h_{in}} \frac{dh}{v_{TA}(h)}, \quad (3.4)$$

où h_c est l'épaisseur critique du film avant que le régime de zipping ne commence (de l'ordre d'une dizaine de nanomètres) et h_{in} est la distance initiale à l'interface lorsque la gouttelette commence à ralentir (typiquement $h_{in} = R$). L'expression du temps de drainage est alors donnée par:

$$\tau_d = \frac{9\eta}{2\Delta\rho a R} \ln\left(\frac{h_{in}}{h_c}\right). \quad (3.5)$$

²L'origine du nom de ce régime reste mystérieuse, les papiers faisant référence au régime de Taylor citent tous une référence qui n'existe pas.

Dans notre système, pour une gouttelette de $10 \mu m$ de rayon subissant une accélération de $40g$, le temps de drainage $\tau_d = 1,2 s$, que l'on peut comparer aux $0,2 s$ nécessaire à cette gouttelette pour parcourir la même distance dans le régime de Stokes.

Temps caractéristique de « Zipping »

On décrit le régime de « zipping » de la façon suivante: la gouttelette rentre en contact avec l'interface, à l'échelle macroscopique, elle est soumise aux forces de tension interfaciale $F_\gamma = 2\pi r\gamma$ au niveau de la ligne de contact avec l'interface qui aident le passage de la goutte, à la force centrifuge \vec{F}_{centri} , et à la force de friction visqueuse $\vec{F}_{friction}$ qui s'oppose au mouvement. L'équilibre des forces s'écrit alors:

$$\vec{F}_\gamma + \vec{F}_{centri} + \vec{F}_{friction} = \vec{0}. \quad (3.6)$$

Avec $F_\gamma = 2\pi r\gamma \sin \theta$ selon l'axe z . La force centrifuge en tenant compte qu'une partie de la gouttelette se situe dans la DAS et l'autre dans la LOS s'exprime de la façon suivante $\vec{F}_{centri} = (\Omega_1 \Delta\rho_{EAS/LOS} + \Omega_2 \Delta\rho_{EAS/DAS})\vec{a}$ où Ω_1 et Ω_2 sont les fractions de volume de la goutte immergée dans l'huile minérale et dans la DAS respectivement et \vec{a} le vecteur accélération. Après un peu de géométrie d'après la figure 3.15, cette force s'exprime comme $F_{centri} = \frac{4}{3}\pi R^3 a (\frac{1}{2}(1 + \cos \theta) \Delta\rho_{DAS/LOS} + \Delta\rho_{EAS/DAS})$. Il faut alors choisir la bonne expression pour la dissipation visqueuse. En première approximation nous avons considéré la force de Stokes sur une sphère dans de l'huile minérale $\vec{F}_{Stokes} = -6\pi\eta R \dot{Z} \vec{e}_z$ mais dans ce cas le temps caractéristique de « zipping » est très largement sous-estimée (figure 3.16). Nous avons donc considéré la friction de la ligne de contact évaluée par Huh et Scriven [51]. La géométrie du problème rend l'estimation de la friction compliquée, nous avons choisis de ne considérer l'effet de la géométrie que sur la variation du périmètre, mais nous utilisons l'expression de la force sur un coin comme si la sphère était un cylindre et la force n'avait qu'une composante verticale selon z . Dans ces conditions, une estimation grossière de cette force est donnée par:

$$\vec{F}_{friction} \simeq -2\pi r \frac{3\eta l}{\theta_D} \dot{Z} \vec{e}_z, \quad (3.7)$$

avec l un facteur logarithmique $l = \ln(R/b)$ qui dépend d'une longueur de coupure maximale R (rayon de la gouttelette) et d'une longueur de coupure aux tailles moléculaires pour éviter la divergence du gradient de vitesse quand l'épaisseur du fluide tend vers zéro. Dans l'approximation des petit angles, $\theta_D = (6l\dot{Z}\eta/\gamma)^{1/3}$ (loi d'Hoffmann), et en remplaçant dans l'équation 3.7, nous obtenons:

$$\vec{F}_{friction} \simeq -\frac{3}{6^{1/3}} 2\pi r (\eta l \gamma^{1/2})^{2/3} \dot{Z}^{2/3} \vec{e}_z \quad (3.8)$$

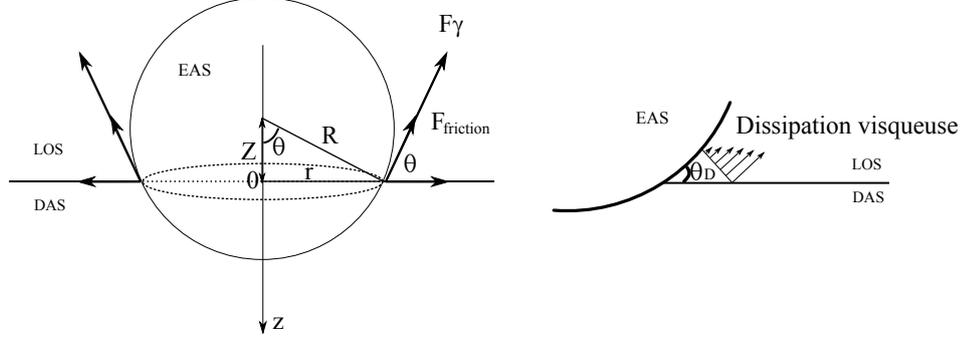


FIG. 3.15: Géométrie du passage de la gouttelette à l'interface huile/eau.

Nous adimensionnalisons l'équilibre des forces en posant $X(t) = -Z(t)/R$ et $\tau = \frac{\gamma}{R\eta}t$. Dans le terme de la force centrifuge, il y a un nombre de Bond qui apparaît ($R^2\Delta\rho_{DAS/LOS} a/\gamma$), ce nombre est de l'ordre de 10^{-4} pour notre système, nous négligerons donc ce terme par la suite et considérerons que le régime de « zipping » est uniquement contrôlé par le mouillage. Finalement, nous obtenons l'équation différentielle suivante:

$$(1 - X(t)^2)^{1/2} = K(-\dot{X}(t))^{2/3}, \quad (3.9)$$

où $K = 3l^{2/3}/6^{1/3}$. Après intégration numérique de cette équation (figure 3.16), nous trouvons un temps caractéristique de passage de l'ordre de 3 ms, assez éloigné des temps de passage $\simeq 300$ ms rapportés pour des expériences de transfert spontané [23] mais plus grand que si nous avons considéré la friction visqueuse de Stokes.

Lorsque nous adimensionnalisons les données [23] décrivant le passage de l'interface par des gouttelettes en transfert spontané, nous pouvons ajuster la solution numérique en changeant l'échelle des τ d'un facteur 120 (figure 3.16). C'est comme si nous avons une tension de surface effective de 0,1 mN/m au lieu de la valeur de 12 mN/m déterminée par l'expérience de la goutte pendante. Cependant, nous n'avons pas tenu compte, par exemple, que l'écoulement sur la surface de la gouttelette durant sa traversée de la LOS peut compresser les lipides plus que lors de l'équilibre atteint en goutte pendante, résultant en une tension de surface plus basse mais sûrement pas suffisamment pour atteindre 0,1 mN/m.

De toute façon, l'observation en vue de dessus du passage spontané est difficile car nous n'avons pas de référence précise pour le temps initial du début du « zip-

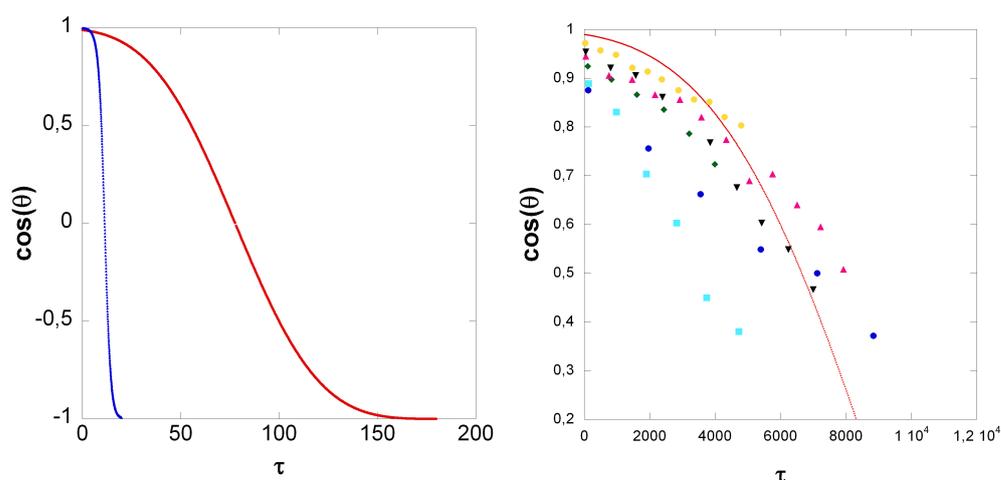


FIG. 3.16: A gauche, comparaison de l'évolution de $\cos \theta$ en fonction de τ lorsque l'on prend pour la force de dissipation visqueuse la force de Stokes (courbe bleu) ou la dissipation de la ligne triple dans un coin (courbe rouge). Au début, le « zipping » commence doucement puis accélère jusqu'à l'équateur puis diminue jusqu'à la fin. A droite, comparaison entre les données de Yamada et al. [23] pour des vésicules de différents diamètres, adimensionnalisées et un ajustement de la solution numérique. Les points expérimentaux suivent bien l'allure générale de la courbe à l'exception des données pour une goutte de rayon $R=13,8 \mu m$ (carrés turquoise) et pour une goutte de rayon $R=7,4 \mu m$ (cercles bleu).

ping ». Pour comprendre la cinétique de passage, il serait nécessaire d'effectuer des séries de mesures en transposant notre dispositif sous microscope pour filmer le passage en caméra rapide, le suivi d'une gouttelette étant possible à condition de synchroniser la fréquence d'acquisition de la caméra sur la vitesse de rotation de la chambre. Une autre possibilité consiste pour des expériences de transfert spontané, à coucher le microscope à l'horizontale pour avoir une vue de côté de la chambre. Ces montages permettraient alors de suivre le passage complet des gouttelettes au travers de l'interface.

3.4.2 Détachement

A la fin de l'assemblage des deux feuillets, il faut que la vésicule se détache de l'interface. Très probablement, cela consiste en la rupture d'un tube de lipides de taille moléculaire. Nous ne connaissons pas les mécanismes qui pilotent cette étape. Néanmoins, certaines observations nous donnent des indices. Le détachement de l'interface est aidé par la centrifugation; en effet dans le cas du transfert spontané,

sous l'action de la gravité, les vésicules restent suspendues à l'interface pendant de longues heures tandis que dans notre cas une partie des vésicules passent avec succès l'interface et nous les récupérons dans la DAS. La différence de densité $\Delta\rho$ entre EAS et DAS semble également être une clé du succès: le rendement, c'est-à-dire le pourcentage de gouttelettes qui deviennent effectivement des vésicules, augmente linéairement avec la différence de densité EAS/DAS dans la gamme testée $4.10^{-3} - 0,65 \text{ g/cm}^3$ jusqu'à atteindre 60% (figure 3.17). Pour quantifier le rendement, nous avons produit des vésicules pendant une minute tout en filmant la production des gouttelettes à la pointe du capillaire pour déterminer précisément la fréquence de production. La DAS contenant les vésicules est alors déposée dans une chambre d'observation sous microscope et nous comptons le nombre de vésicules produites.

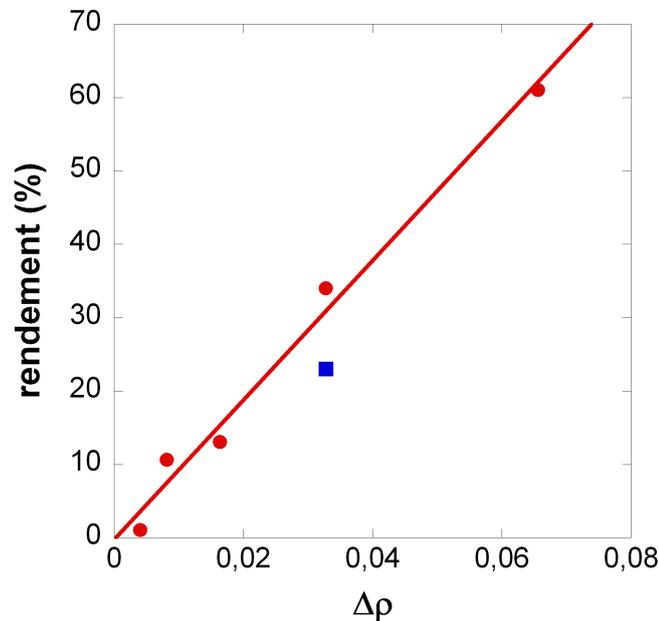


FIG. 3.17: Rendement (pourcentage de gouttelettes qui deviennent effectivement des vésicules) en fonction de la différence de densité $\Delta\rho$ entre EAS/DAS. Le rendement augmente linéairement avec $\Delta\rho$ de 1% pour un $\Delta\rho$ correspondant à des solutions de sucrose/glucose de 62 mM jusqu'à 61% pour des solutions de sucrose/glucose de concentration 1 M. La fréquence de production joue un rôle important sur le rendement final: pour le même $\Delta\rho = 0,033 \text{ g/cm}^3$, l'efficacité est de 34% à 450 Hz et chute à 23% (carré bleu) lorsque la fréquence de production augmente à 775 Hz

3.5 Caractéristiques des vésicules produites par cDICE

3.5.1 Distribution de taille des vésicules

Les distributions de taille sont déterminées par analyse d'image. La densité de probabilité ρ est représentée en fonction du diamètre des gouttelettes et des vésicules (figures 3.18 et 3.19). La comparaison des deux distributions permet de s'assurer que les deux sont centrées sur la même valeur moyenne, c'est-à-dire que les vésicules obtenues sont bien issues de la couverture des gouttelettes par une bicouche. En revanche la distribution des vésicules présente un léger épaulement pour les plus grands diamètres (figure 3.18a). Cet épaulement peut s'expliquer par la fusion de gouttelettes durant leur traversée de la LOS ou sur l'interface, et ce malgré le contrôle de la fréquence de production.

La taille des vésicules peut être facilement sélectionnée en variant la taille du capillaire tout en gardant une faible polydispersité $\sigma/\langle d \rangle < 11\%$ dans la gamme 10-40 μm , σ et $\langle d \rangle$ étant l'écart type et le diamètre moyen (figure 3.18b).

Il est possible de descendre vers de plus petites tailles. Néanmoins, comme évoqué précédemment, nous sommes limités au niveau de la taille du capillaire à des valeurs d'environ 4 μm de diamètre. Il faut donc augmenter le nombre capillaire en changeant la viscosité de la phase continue et la vitesse de rotation pour atteindre la gamme des valeurs « hautes » de C_a de la figure 3.4. Par exemple, avec un capillaire de 4 μm , en utilisant de l'hexadécane ($\eta = 3,3 \text{ mPa.s}$) comme phase continue et en tournant à 40 tours par seconde, $C_a = 0,2$ et l'on produit ainsi des vésicules de 4 μm de diamètre (figure 3.19a). Gouttelettes et vésicules possèdent la même valeur moyenne, mais la polydispersité augmente à $\sigma/\langle d \rangle = 17\%$. L'élargissement sur les tailles supérieures provient probablement de la fusion des gouttelettes en solution, l'élargissement vers les tailles plus petites est quant à lui plus surprenant.

La production de vésicules de grande taille ($>40 \mu m$) demande de diminuer la vitesse de rotation à 10 trs/s pour que la condition $\tau_F > \tau_s$ soit respectée. Avec un capillaire de 6 μm et à un $C_a = 0,04$, des vésicules de 68 μm sont produites; la polydispersité est plus importante, $\sigma/\langle d \rangle = 25,8\%$ (figure 3.19b).

3.5.2 Encapsulation

La solution aqueuse que l'on souhaite encapsuler à l'intérieur des vésicules cDICE peut contenir divers objets aussi variés que des colloïdes, des globules rouges, des protéines, des tampons de force ionique comparable aux conditions physiologiques ($>150 \text{ mM}$), de l'ADN marqué (25 bases), une solution de sucre concentrée à 1M ou bien du dextran 2MW à 8% w/w de viscosité 40 mPa.s. Un

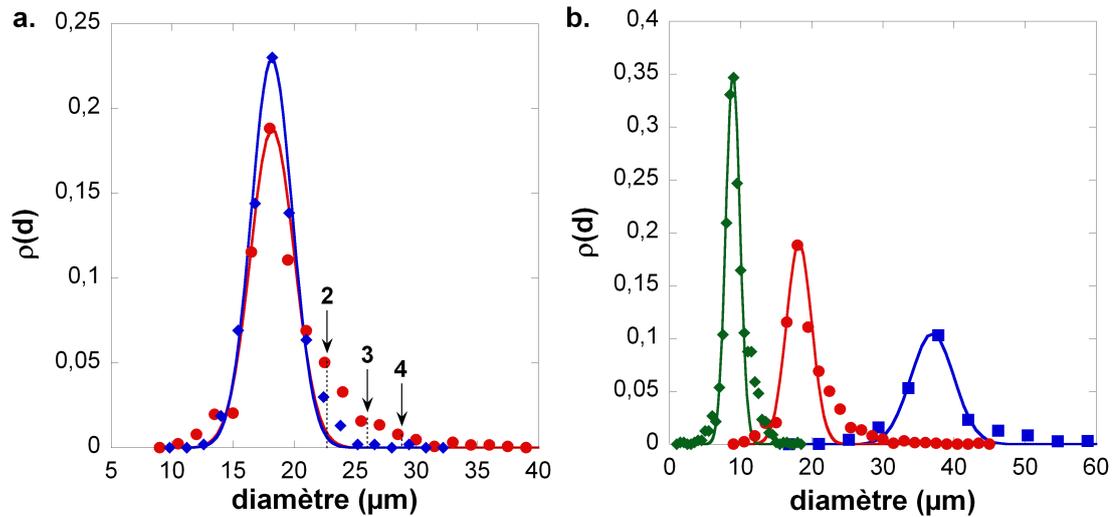


FIG. 3.18: **a.** Superposition de la distribution de taille des gouttelettes produites (losanges bleu), avec celle des vésicules obtenues (cercles rouges); $\rho(d)$ est la densité de probabilité en fonction du diamètre. Les deux distributions sont centrées sur la même valeur moyenne $\langle d \rangle = 18 \mu m$. Au niveau de l'épaule de la distribution des vésicules, les flèches indiquent les valeurs de diamètres correspondant à la fusion de 2, 3 et 4 gouttelettes. **b.** Distributions de taille pour des vésicules de $\langle d \rangle = 8 \mu m$ et $\sigma = 1 \mu m$ (losanges vert); $\langle d \rangle = 18 \mu m$ et $\sigma = 2 \mu m$ (cercles rouge); $\langle d \rangle = 37 \mu m$ et $\sigma = 3 \mu m$ (carrés bleu). Les vésicules ont été produites avec un capillaire de $5 \mu m$ à $C_a = 0,06$ (losanges vert) et à $C_a = 0,035$ avec des capillaires de 6 et $13 \mu m$ pour les tailles 18 et $37 \mu m$ respectivement.

aperçu est donné sur la figure 3.20.

Pour parvenir à encapsuler efficacement une solution, il faut veiller à deux principaux points: l'ajustement de la pression osmotique entre EAS et DAS et la différence de densité entre ces deux solutions.

Afin de prévenir les risques de formation de bouchons lors de l'encapsulation de colloïdes micrométriques, l'intérieur des capillaire doit être traité. La colle optique NOA61 (Norland) est une bonne candidate, la polymérisation d'une fine couche de colle sur une longueur d'environ $300 \mu m$ à la pointe du capillaire permet de limiter l'adhésion des colloïdes sur les parois internes. Les interactions entre les particules colloïdales et la membrane de lipide peuvent également être minimisées en utilisant des LOS contenant 5% mol/mol de lipides PEG.

Pour l'encapsulation des globules rouges, nous avons ajusté la densité de la solution de suspension avec celle des globules pour éviter leur centrifugation dans les gouttelettes lors de la traversée de la LOS. La distribution de la concentration

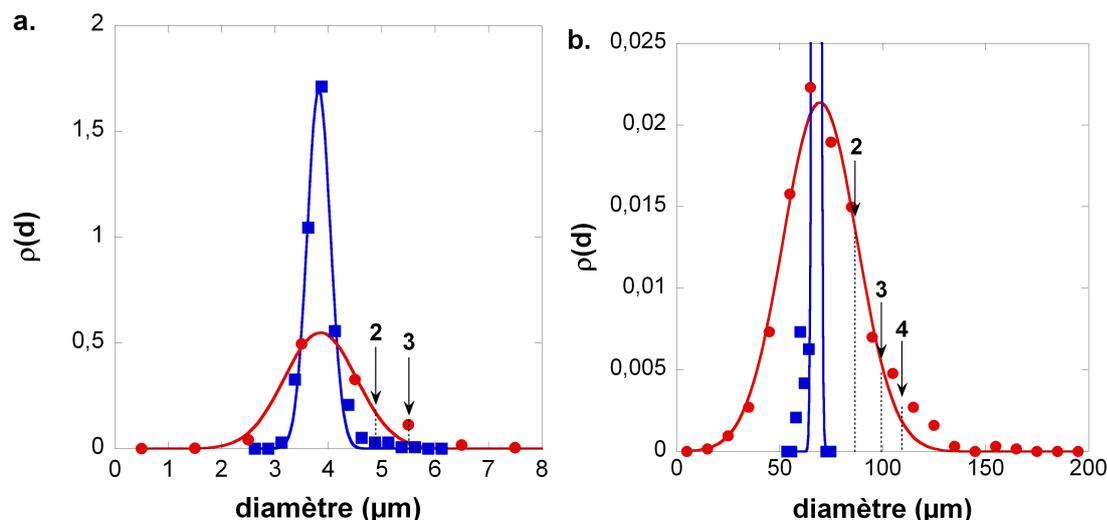


FIG. 3.19: Superposition des distributions de taille des gouttelettes et des vésicules obtenues. **a.** Gouttelettes et vésicules sont centrées sur la même valeur moyenne $\langle d \rangle = 3,8 \mu\text{m}$ et produites à $C_a = 0,2$. Pour les vésicules $\sigma = 0,6 \mu\text{m}$. **b.** Distribution de tailles des vésicules centrée sur $\langle d \rangle = 68 \mu\text{m}$ avec $\sigma = 17 \mu\text{m}$, production à $C_a = 0,04$.

d'hémoglobine intracellulaire résulte en une distribution de densité des globules de $1,085 \text{ g/cm}^3$ pour les plus jeunes jusqu'à plus de $1,112 \text{ g/cm}^3$. Nous avons alors préparé une solution de dextran à $1,09 \text{ g/cm}^3$ et ajusté la pression osmotique à 300 mosm avec du glucose, après centrifugation de globules sur cette solution, nous avons prélevé quelques microlitres sur le dessus que nous avons utilisé pour l'encapsulation.

Différentes collaborations nous ont amenées à encapsuler diverses protéines: l'actine (groupe d'Andreas Bausch, Munich) et l'ezrine (Nada Khalifat), composants du cytosquelette; FtsZ (groupe de Petra Schwille, Dresde), protéine impliquée dans le mécanisme de division cellulaire des bactéries. Pour l'encapsulation de l'actine, nous avons dilué les monomères d'actine à $15 \mu\text{M}$ dans le tampon de polymérisation juste avant de l'introduire dans le capillaire et de commencer l'injection. Effectuée rapidement, cette étape demande 30 s auxquelles il faut ajouter 5-10 minutes de production de vésicules, du même ordre de grandeur que le temps nécessaire pour que la polymérisation débute. Comme le tampon de polymérisation est ionique, nous utilisons une solution de glucose ajustée osmotiquement comme DAS, condition nécessaire pour que le passage à l'interface se déroule correctement.

Pour encapsuler l'hémoglobine, protéine responsable du transport de l'oxygène dans l'organisme, dont la densité est importante, nous ajustons la densité de la DAS

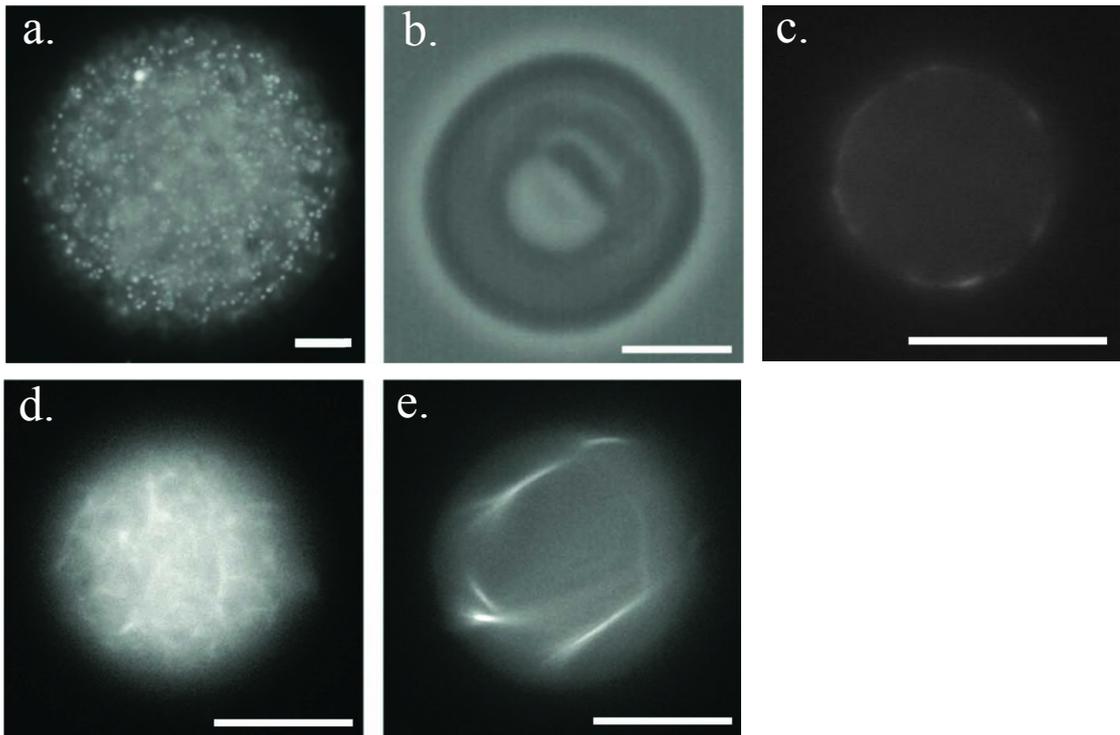


FIG. 3.20: Exemples d'encapsulation. **a.** colloïdes de $1 \mu m$ à 4% v/v; **b.** globule rouge; **c.** protéine FtsZ à $0,5 \mu M$ qui se lie au POPS de la membrane constituée de 90% Egg-PC+10% POPS; **d.** et **e.** faisceaux d'actine + fascine. L'échelle représente $10 \mu m$.

avec du percoll de manière à obtenir un $\Delta\rho$ de l'ordre de $2.10^{-2} - 2.10^{-3} \text{ g/cm}^3$, nous utilisons également des capillaires traité à la colle pour limiter l'adhésion sur les parois.

L'encapsulation de fluides visqueux demande d'appliquer une surpression plus importante du fait de la résistance hydrodynamique qui augmente avec la viscosité; pour une solution de dextran 2Mw concentré à 8% w/w dont la viscosité avoisine les 40 mPas, nous appliquons une pression de 800 mbar lorsque l'on injecte dans un capillaire de $10 \mu m$ de diamètre.

3.5.3 Propriétés de la membrane

Observée au microscope avec un objectif x100 à immersion et grande ouverture numérique (N.A.= 1,3), permettant ainsi d'atteindre une résolution d'environ $0,25 \mu m$, la membrane ne présente pas de défaut (figure 3.21). Lorsque nous suspendons

les vésicules dans une solution légèrement hypertonique, les vésicules se dégorgent et leur membrane fluctue indiquant que la membrane est bien perméable à l'eau. Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas caractérisé les fluctuations permettant de déterminer le module de courbure de la membrane pour le comparer avec les données existantes sur des vésicules électroformées [?]. La question de la présence de solvant résiduel dans la bicouche est pertinente, en particulier pour l'étude des propriétés physico-chimiques de la membrane comme par exemple la formation de domaines. La présence d'huile dans la bicouche peut modifier les propriétés de diffusion des lipides dans la membrane ou encore les transitions de phase dans les mélanges. Caractériser précisément de faibles quantités d'huile reste délicat, cependant nous avons réalisé plusieurs contrôles qui tendent à montrer que si présence d'huile il y a, c'est uniquement à l'état de traces.

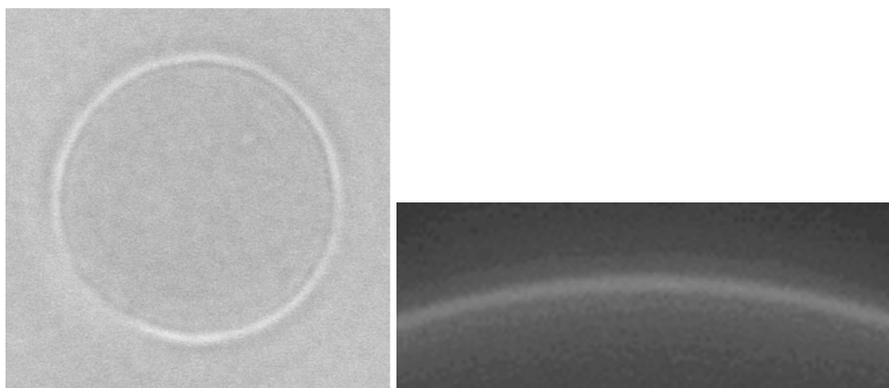


FIG. 3.21: **a.** Image en champ clair d'une vésicule avec un objectif x100 (N.A. 1,3) et un condenseur (N.A. 1,1). **b.** Partie de membrane marquée au PKH (sigma) et imagée en épifluorescence (x100, N.A. 1,3).

Le premier test consiste à encapsuler une solution de fluorescéine puis d'ajouter a posteriori de l'alpha-hémolysine dans la solution dans laquelle sont suspendues les vésicules. Cette protéine est connue pour former des nanopores dans les membranes [?]. En pratique, 1 μ l d'alpha-hémolysine à 1 mg/ml dans 10 mM Hepes et 150 mM KCl est dilué dans 100 μ l de glucose (ajusté osmotiquement avec l'EAS). Ces 100 μ l sont ensuite ajoutés dans la chambre d'observation contenant 200 μ l de suspension de vésicules. Des photos en fluorescence sont prises avant et après ajout de l'alpha-hémolysine: au départ l'intensité à l'intérieur des vésicules atteint 2000 ua (unité arbitraire) et celle de la solution de suspension 225 ua; trois heures plus tard, les pores formés par l'alpha-hémolysine ont permis un échange entre EAS et solution extérieure et l'intensité dans les vésicules est tombée à 325-330 ua tandis que dans le même temps l'intensité de la solution extérieure a augmenté autour de

310-315 ua. Cette protéine transmembranaire est donc bien fonctionnelle.

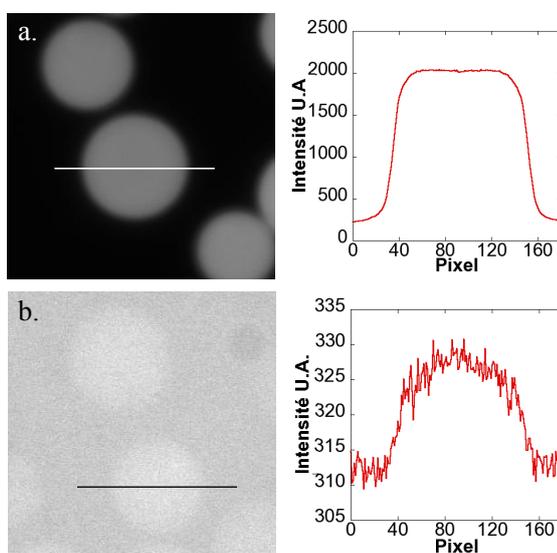


FIG. 3.22: Vésicules contenant de la fluorescéine, avant (a.) et 3h après (b.) ajout d'alpha-hémolysine. Les profils d'intensité correspondant sont représentés à droite de chaque photo. Avant ajout d'alpha-hémolysine, le fond présente une intensité de 225 ua (unité arbitraire) tandis que l'intensité à l'intérieur de la vésicule atteint environ 2000 ua. 3 heures après ajout de l'alpha-hémolysine, des nanopores se sont constitués dans les membranes autorisant un échange entre EAS/DAS: l'intensité du fond a maintenant augmenté à 310-315 tandis que l'intensité dans la vésicule a chuté à 325-330. L'intensité de la photo b. a été réchelonnée pour l'affichage.

Le deuxième test, plus direct, consiste à mesurer l'épaisseur de la bicouche en microscopie à force atomique (AFM). Ces mesures ont été réalisées en collaboration avec Pierre Emmanuel Milhiet et Cédric Godefroy (CBS, UMR 5048 CNRS, UMR554 INSERM). Un choc osmotique hypotonique est appliqué pour faire éclater les vésicules et en présence d'ions Ca^{2+} (3 mM CaCl_2) les membranes sont plaquées sur le substrat de mica. Le tout est rincé avec le tampon d'imagerie (Tris 10 mM, KCl 150 mM, MgCl_2 5 mM pH 7,4). Un premier point positif est l'homogénéité de la membrane (voir figure 3.23 A), indiquant qu'il n'y a pas de défaut sur la membrane ou de goutte d'huile emprisonnée dans la bicouche. De plus les hauteurs mesurées sur 40 sections donnent une valeur moyenne de $4,28 \pm 0,62$ nm, similaire aux hauteurs (4-5 nm) mesurées par AFM pour une bicouche supportée de DOPC préparée par fusion de SUV (small unilamellar vesicles) [?] et proche de la valeur mesurée par rayons X de 3,69 nm [?]. La différence avec la mesure rayons X provient de la présence d'une fine couche moléculaire d'eau entre la surface de

mica et les têtes polaires des lipides [?].

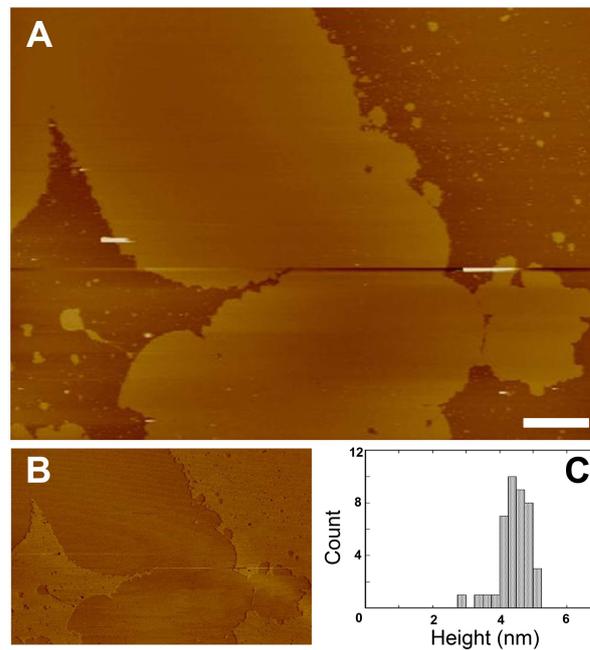


FIG. 3.23: Caractérisation par AFM d'une bicouche d'egg-PC sur du mica provenant de l'éclatement d'une vésicule CDICE. **A.** Membrane imagée en mode peak force tapping (mode oscillant), l'échelle de couleur qui code pour la hauteur s'étend sur 30 nm et la barre d'échelle représente 10 μm . La ligne horizontale au milieu correspond à une perte d'interaction pointe échantillon. **B.** Image « quadrature » qui rend compte de la différence d'interaction entre la pointe et l'échantillon selon que l'on se trouve sur le mica ou la membrane. **C.** Distribution des hauteurs mesurées sur 40 sections avec une valeur moyenne de $4,28 \pm 0,62$ nm

3.6 Conclusion

La méthode que nous avons développée présente de nombreux avantages. Simple à mettre en œuvre, elle permet la production de vésicules de taille contrôlée avec une distribution de taille piquée: $\sigma/\langle d \rangle < 11\%$ dans la gamme 4-40 μm de diamètre et plus large sur une gamme étendue de 4-70 μm . La formation individuelle de chaque feuillet puis leur assemblage final lors du passage des gouttelettes au travers de l'interface huile/eau, est un processus efficace autorisant l'encapsulation de substances variées, en veillant à ce que l'osmolarité des solutions interne et externe soit équilibrée et l'EAS légèrement plus dense que la DAS.

La production de gouttelettes monodisperses par goutte à goutte et le contrôle de la fréquence de production des gouttelettes permet d'optimiser la couverture continue des interfaces huile/eau, résultant en un rendement important: environ 150 vésicules par seconde produites avec un seul capillaire et de façon continue (>20 min). Ceci n'est possible qu'à la seule condition que la cinétique d'adsorption des lipides aux interfaces soit suffisamment rapide. La mise au point du protocole de dispersion des lipides dans l'huile minérale a demandé de nombreux ajustements mais il est maintenant reproductible et applicable à de nombreux lipides et mélanges de lipides.

De par l'étendue des tailles accessibles 4-70 μm qui couvre les tailles des cellules biologiques, de l'efficacité d'encapsulation, de la diversité des lipides que nous avons utilisé et la possibilité de travailler en conditions salines physiologiques, nous pensons que cette nouvelle technique est une méthode de choix pour la conception de systèmes biomimétiques.

De façon plus générale, cette méthode ainsi que le concept plus général de production de capsules d'épaisseur contrôlée a fait l'objet d'un dépôt de brevet.

Deuxième partie

Une approche microfluidique de la drépanocytose: étude de la vaso-occlusion

Introduction à une maladie génétique du sang: la drépanocytose

L'anémie falciforme ou drépanocytose est une maladie génétique de la micro-circulation sanguine qui touche environ cinquante millions de personnes de part le monde, principalement sur le continent Africain, en Inde et au Moyen Orient. Son caractère héréditaire est démontré par James Neel en 1949 [52] et la même année Linus Pauling [53] en découvre l'origine moléculaire: une structure anormale de la protéine d'hémoglobine la rendant moins soluble. C'est la première fois que le lien est fait entre une maladie génétique et un dysfonctionnement au niveau moléculaire. L'hémoglobine, contenue dans les globules rouges, est la protéine responsable du transport de l'oxygène dans l'organisme. La forme responsable de cette maladie est appelée hémoglobine S (HbS). Elle est le résultat d'une mutation génétique impliquant la substitution d'un seul acide aminé qui la rend moins soluble. En absence d'oxygène, le changement conformationnel de la protéine rend possible l'agrégation des monomères d'HbS. Ce phénomène est complètement réversible et dès que la concentration d'oxygène est suffisante les fibres d'HbS dépolymérisent. La pathophysiologie de la drépanocytose est compliquée par son caractère multi-échelle et reste inexplicite: au niveau moléculaire, l'HbS polymérise en quelques millisecondes pour former des fibres qui peuvent atteindre plusieurs microns; à l'échelle du globule rouge, les déformations apparaissent en quelques secondes; enfin à plus grande échelle, la vaso-occlusion est responsable des crises anémiques répétitives [1].

Une première approche consiste à étudier la cinétique de polymérisation de solutions purifiées d'HbS. L'existence d'un temps de latence entre le moment où l'hémoglobine est complètement désoxygénée et la formation des fibres a ainsi été mis en évidence [54], ce temps dépend grandement de la concentration initiale d'HbS. Les mesures sur la cinétique ont aussi permis de proposer deux types de mécanismes pour la formation des polymères [55]; une nucléation initiale homogène suivie par une nucléation hétérogène sur le polymère déjà existant. Ce modèle de

double nucléation permet d'expliquer les dépendances extrêmes à la concentration d'HbS du taux de nucléation [56], et du taux de formation de domaines [57]. D'autres études ont aussi été menées sur la cinétique de polymérisation pour des saturations partielles en oxygène [58] ou encore sur la cinétique de dépolymérisation [59]. Toujours sur des solutions d'HbS, la nucléation, la croissance de fibres et de domaines ont été observés par microscopie à contraste interférentiel [60, 61], observations confirmant le modèle de double nucléation. Enfin Wang et al. [62] ont mesuré le module de courbure et la longueur de persistance de fibre individuelle.

L'extrême variabilité et le fait que l'on ne puisse pas prévoir les crises parmi des patients ayant le même génotype HbSS sont la preuve que le processus encore indéterminé conduisant à la vaso-occlusion est complexe. Stephen H. Embury [63] et Robert P. Hebbel [64] font chacun une analyse critique du dogme de la polymérisation et déformation des globules rouges comme uniques facteurs importants menant à la vaso-occlusion. Pour aller plus avant dans la compréhension de la pathophysiologie et des mécanismes impliqués dans la vaso-occlusion de nombreuses études ont été menées sur des globules rouges *in vitro* mais aussi *in vivo*. L'hétérogénéité de la concentration en HbS dans les globules rouges est responsable d'une riche morphologie [65] et de comportements rhéologiques différents [66]. La capacité d'un globule rouge à se déformer est un facteur important lors du passage dans les capillaires sanguins les plus petits, la polymérisation intracellulaire et la répétition des cycles de déformation altèrent la déformabilité des différentes populations de globules; les plus denses, souvent irréversibles (gardent leur déformation même en condition normale d'oxygénation) sont ceux qui deviennent le moins déformables tandis que les réticulocytes les moins denses sont les plus déformables et moins rigides [67]. Il a été montré que la détérioration des propriétés mécaniques coïncide avec la déshydratation des globules et l'augmentation de la viscosité due à l'augmentation de la concentration intracellulaire d'hémoglobine [68–70]. Déshydratation et déformation sont intrinsèquement liées car la désoxygénation et la déformation qui l'accompagne induisent une augmentation de la perméabilité de la membrane pour les cations (K^+ , Na^+ et Ca^{2+}) [71] et d'une perte d'eau [72]. Les expériences de micropipettes [67, 73, 74] ont permis de mesurer les propriétés mécaniques sur des cellules drépanocytaires individuelles démontrant ainsi que même en condition normale d'oxygénation ces globules possèdent une déformabilité moindre et une rigidité plus importante que les globules normaux. Les globules anémiés ont aussi la particularité d'être plus adhérents sur les cellules endothéliales [75], Barabino et al. ont aussi étudié les propriétés d'adhésion grâce à une chambre à flux recréant mieux les conditions physiologiques d'écoulement [76]; de plus, cette plus grande adhésion a aussi été observée *in vivo* [77].

Plus récemment, la démocratisation des techniques de lithographie a permis la construction de puces microfluidiques pour désoxygéner rapidement des cellules

[78] ou bien pour l'étude en géométrie confinée du flux d'une solution de globules anémies [79].

Chapitre 4

Pathophysiologie, Hémoglobine S et études sur des cellules

4.1 Pathophysiologie

Les crises anémiques, caractérisées par d'intenses douleurs pouvant durer plusieurs jours et localisées principalement dans les extrémités des membres, la poitrine ou l'abdomen [80], sont pourtant la conséquence d'une unique mutation sur un seul acide aminé de la molécule d'hémoglobine.

L'angle d'approche pour comprendre ces aspects pathophysiologiques jusque dans le milieu des années 90 consistait à considérer le problème de la vaso-occlusion, responsable des crises douloureuses, comme étant le résultat d'une obstruction stérique de la microcirculation due à la difficulté de passage dans les capillaires sanguins les plus fins (quelques microns) des globules rouges fortement déformés en absence d'oxygène, par la polymérisation de l'hémoglobine S *in cellulo*. Cette approche a débouché sur toutes les études réalisées sur des solutions d'hémoglobine S purifiée. Cependant, cette seule explication souffre de plusieurs contradictions. Tout d'abord parce que la vaso-occlusion arrive fréquemment dans les artères cérébrales ($\simeq 20\%$ des cas chez les enfants [81]), loin de l'image des capillaires obstrués par quelques globules falciformes. La vaso-occlusion a lieu également au niveau de la circulation pulmonaire, donc par des globules ne contenant pas de polymère et par conséquent présentant pour la plupart leur forme discocyte normale. Le syndrome thoracique aigu concerne les deux tiers des personnes affectées par la drépanocytose, il est responsable de 20% des cas de décès [82].

Le dogme de la polymérisation au niveau moléculaire comme seule responsable des symptômes observés à l'échelle de l'organisme, a commencé à être remis en cause à partir des années 90 mais surtout dans les années 2000 [63, 64]. La grande disparité d'un malade à l'autre dans l'occurrence des crises anémiques et le caractère

non prévisible de celles-ci, a mené la réflexion sur la recherche des autres facteurs pouvant être impliqués, et guidé les études réalisés à l'échelle de la cellule et sur les observations de la circulation dans des modèles in-vivo. La vision « moderne » qui se dégage au regard de ces récentes études, implique nécessairement un processus multi-échelles (moléculaire, cellulaire, et circulation) et multi-étapes qui seront discutés dans la dernière partie de ce chapitre.

4.2 Structure moléculaire

4.2.1 La molécule d'hémoglobine

La molécule d'hémoglobine dont la principale fonction est le transport de l'oxygène des poumons jusque dans les tissus profonds, tient une place particulière dans l'histoire de la chimie des protéines; de par son abondance et sa facilité à l'isoler de nombreux scientifiques se sont penchés sur son étude. On doit la première observation de la cristallisation d'une protéine à Friedrich Hünfeld qui en 1840 laissa s'évaporer lentement une goutte de sang entre deux lamelles [83]. L'hémoglobine fut la première protéine caractérisée par ultracentrifugation [84], qui permit de démontrer que la molécule contient quatre atomes de fer et que c'est un matériau homogène, résultats fondamentaux à une époque où la nature des protéines était encore inconnue. C'est aussi la première fois dans le cas de l'anémie falciforme que la nature moléculaire d'une maladie a été prouvée, Linus Pauling faisant le lien en 1949 [85] entre mutation génétique et le changement d'un seul acide aminé dans la structure de l'hémoglobine. Les premières structures tridimensionnelles de protéines déterminées par rayons-X furent celles de la myoglobine (monomère) puis peu de temps après de l'hémoglobine par Perutz en 1959 [86].

La molécule d'hémoglobine est un hétérotétramère composé de deux sous-unités alpha et deux sous-unités beta (voir figure 4.2) qui sont apparentées à la myoglobine (protéine monomérique responsable du transport de l'oxygène dans les muscles), chacune de ces sous-unités est liée de façon non covalente à un hème (figure 4.1). Molécule planaire, l'hème contient en son centre un atome de fer II qui est responsable de la couleur rouge du sang et sur lequel se lie une molécule de dioxygène (figure 4.1).

Les chaînes de polypeptides sont arrangées de telle sorte que les interactions les plus importantes ont lieu entre sous-unités différentes: l'association $\alpha_1 - \beta_1$ (et son équivalence par symétrie $\alpha_2 - \beta_2$) implique 35 résidus tandis que l'association $\alpha_1 - \beta_2$ (et $\alpha_2 - \beta_1$) met en jeu 19 résidus. En plus de ces interactions de nature hydrophobe, il existe de nombreuses liaisons hydrogène et paires d'ions. Les interactions entre sous-unités similaires ($\alpha_1 - \alpha_2$ et $\beta_1 - \beta_2$) sont quant à elles peu nombreuses, ceci s'explique par le fait que ces sous-unités se font face de part et

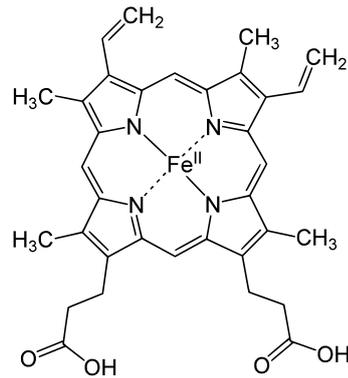


FIG. 4.1: Formule de la molécule d'hème, le dioxygène se fixe sur l'atome de fer au centre (wikipedia)

d'autre d'un canal de 20Å de diamètre sur 50Å de long (voir figure 4.2).

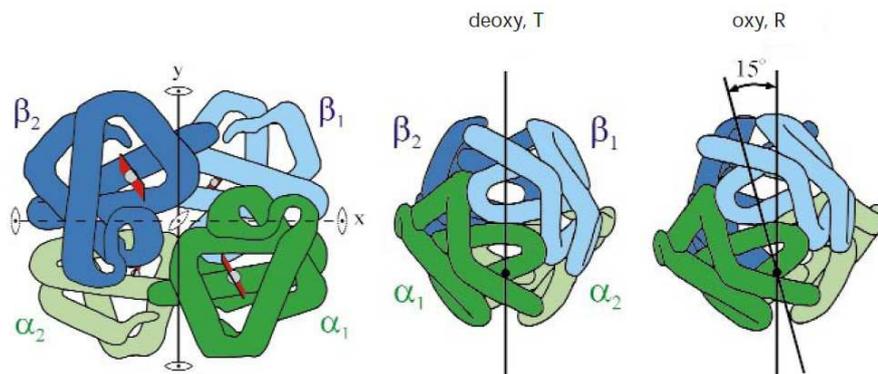


FIG. 4.2: A gauche, représentation de la structure de la molécule d'hémoglobine formée des quatre sous unités α_1 , α_2 , β_1 et β_2 renfermant chacune un hème (plan rouge). Le canal formé au centre du tétramère est rempli de solvant. A droite, le changement de conformation entre la forme oxygénée et désoxygénée consiste en une rotation de 15° des deux dimères $\alpha\beta$ (Eaton et al. [87])

En 1968 Perutz et al. [88] ont établi par diffraction aux rayons-X les structures à haute résolution de l'oxy et deoxyhémoglobine. Ces observations ont montré que l'axe de symétrie d'ordre 2 est préservé et que le changement de conformation induit par la dioxygène implique une rotation de 15° du dimère $\alpha_1 - \beta_1$ par rapport au dimère $\alpha_2 - \beta_2$ résultant en un déplacement de 6Å de certains atomes à l'interface $\alpha_1 - \beta_2$ (figure 4.2). Habituellement, la forme désoxygénée est noté T (pour "tense")

et la forme oxygénée R (pour "relaxed").

La liaison de l'hémoglobine avec les molécules de dioxygène est un processus coopératif ou allostérique, l'affinité de liaison est affectée par la saturation en oxygène de la molécule: la fixation de la première molécule entraînant un changement de conformation de l'hémoglobine qui augmente l'affinité de liaison de la seconde et ainsi de suite. Le caractère coopératif est caractérisé par une courbe d'affinité en fonction de la pression partielle en oxygène en forme de sigmoïde (figure 4.3). La capacité de l'hémoglobine à fixer l'oxygène décroît avec la présence de monoxide de carbone qui se lie préférentiellement à la place de l'oxygène.

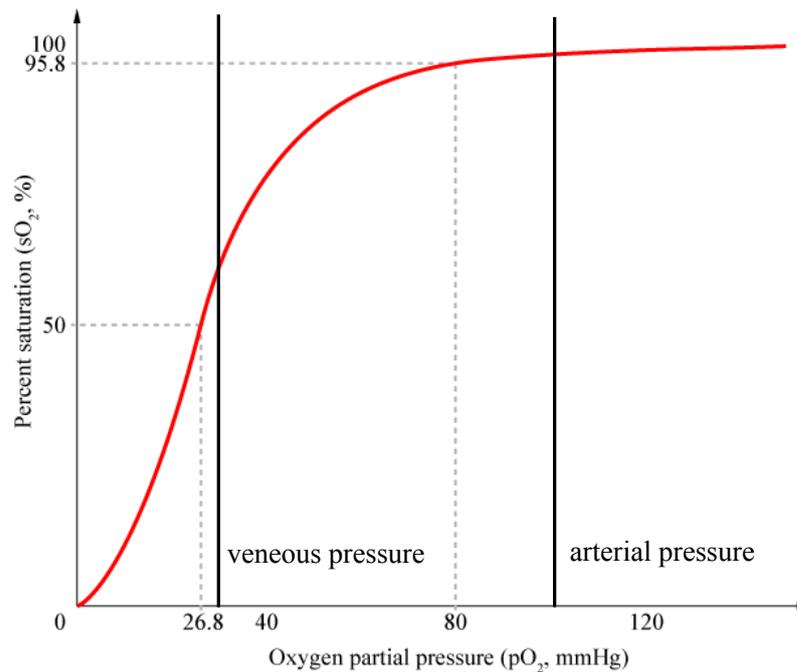


FIG. 4.3: Pourcentage de sites saturés en O_2 d'une solution d'hémoglobine en fonction de la pression partielle d' O_2 , les lignes noires verticales représentent respectivement la pression partielle dans les veines et dans les artères. (adapté de Voet et al. [89])

De nombreuses variantes anormales de l'hémoglobine existent, plus de 860 mutants ont été répertoriés à ce jour et 5 % de la population mondiale est porteur d'une variante héréditaire. L'hémoglobine S (HbS) responsable de l'anémie falciforme est le résultat d'une mutation impliquant la substitution d'un seul acide aminé: à la sixième position des chaînes β , le glutamate chargé négativement est remplacé par une valine neutre et hydrophobe. Localisée sur la surface de la molé-

cule, cette substitution n'a pas d'effet majeur sur la conformation de la protéine. Cependant, moins soluble que l'hémoglobine normale (HbA), l'HbS dans sa forme désoxygénée peut s'agréger pour former un polymère.

4.2.2 Structure du polymère

La première mise en évidence que l'HbS forme des structures ordonnées est à mettre au crédit de Sherman [90] qui observa en 1940 la biréfringence de solutions de globules désoxygénés. Les nombreuses études de microscopie électronique [91–93] ont permis de déterminer la structure moléculaire des fibres d'HbS, celles ci consistent en 7 double brins arrangés en un réseau hexagonal compact torsadé; le diamètre d'une fibre est de 21 nm (voir figures 4.5 et 4.4).

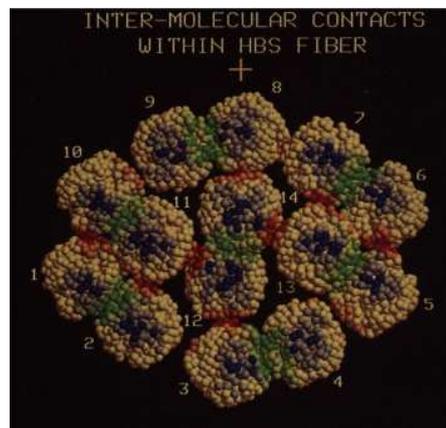


FIG. 4.4: Modèle de la section d'une fibre d'HbS, les sphères représentent les différents résidus. Les résidus impliqués dans des contacts inter double brin, intra double brin en latéral et intra double brin en axial, sont respectivement colorés en rouge, vert et bleu. (Voet et al. [89])

Les différents contacts intermoléculaires dans un double brin sont représentés sur la figure 4.6; seule la valine substituée de la sous unité β_2 intervient dans un contact intermoléculaire. Elle se loge alors dans une « poche » de la sous unité β_1 de la molécule adjacente dont la valine en 6^{ème} position ne participe pas dans un contact. Cette « poche » est absente lorsque l'hémoglobine S est oxygénée. Le fait que l'hémoglobine A désoxygénée ne polymérise pas indique que le contact impliquant la valine est essentiel pour la formation de fibres. L'importance des autres contacts intermoléculaires a été démontré en réalisant des expériences de copolymérisation avec d'autres mutants [94, 95] qui ont permis de dresser la carte des principaux résidus impliqués.

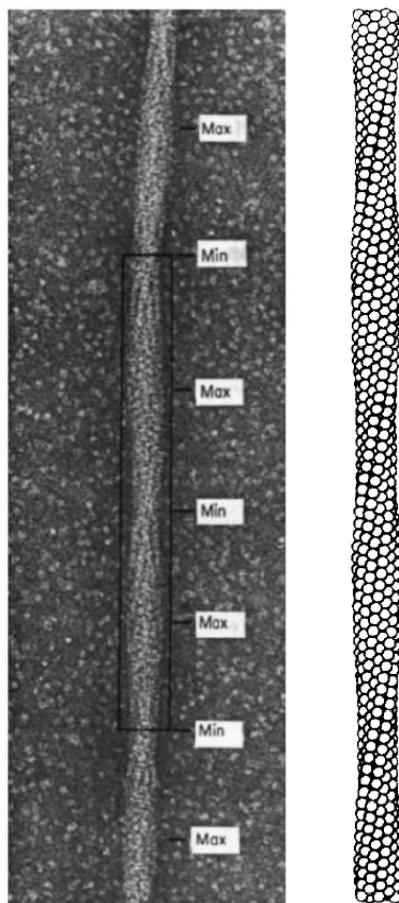


FIG. 4.5: La photo de gauche est un cliché de microscopie électronique d'une fibre d'HbS fixée en solution, le diamètre moyen d'une fibre est de 21 nm. A droite, modèle d'une fibre d'HbS reconstitué à partir des images de microscopie, chaque sphère représente un molécule d'hémoglobine. (Dykes et al. [91])

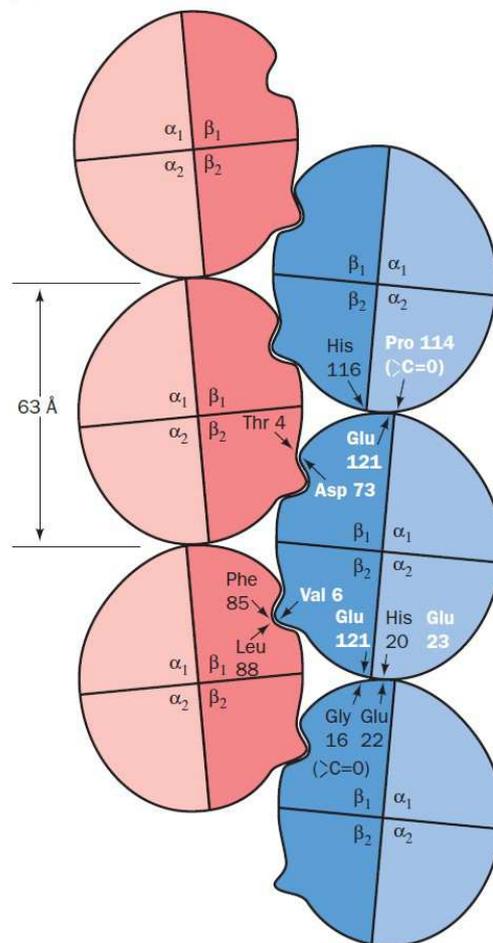


FIG. 4.6: Shéma représentant les contacts intermoléculaires dans un double brin, les résidus en lettre blanche participent aux contacts les plus importants. La valine à la sixième position de la chaîne β_2 est la seule à être impliquée dans un contact intermoléculaire, la valine de la chaîne β_1 est libre. (Voet et al. [89])

4.3 Etudes en solution

4.3.1 Solubilité de l'hémoglobine S

Dès le début des années 70 de nombreuses études sont menées sur des solutions purifiées d'HbS pour comprendre la cinétique de polymérisation. Le système étudié, constitué d'une solution de monomères et d'une phase polymère est appelé gel et le processus conduisant à la formation de polymère, gélification ou polymérisation. Une description thermodynamique simple d'un gel revient à considérer que la phase polymère se comporte comme un cristal en équilibre avec une solution d'hémoglobine monomérique (voir figure 4.7). La concentration d'HbS dans la phase solution est alors la solubilité.

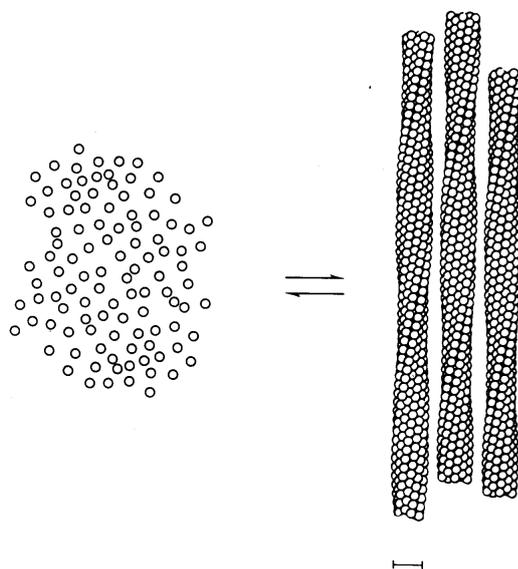


FIG. 4.7: Schéma représentant les deux phases en équilibre dans un gel d'hémoglobine S désoxygénée: solution de monomères-polymère (Eaton et al. [1])

La sédimentation par ultracentrifugation de gel de deoxyHbS (hémoglobine S désoxygénée) permet de séparer la phase gel de la phase polymère, la solubilité est déterminée en mesurant la concentration d'HbS du surnageant. En 1976 Hofrichter et al. [96] ont démontré que la solubilité est indépendante de la concentration initiale totale d'hémoglobine, ce résultat fondamental est cohérent avec le modèle d'équilibre entre cristal et monomères: pour former du polymère, la solution doit préalablement être saturée puis toute molécule d'HbS supplémentaire se retrouve dans le polymère.

Par des expériences de sédimentation à l'équilibre, Williams [97] a démontré que la phase monomérique ne comporte pas d'agrégat moléculaire: une solution de deoxyHbS de concentration inférieure à la solubilité est centrifugée à vitesse plus faible, les forces de sédimentation et de diffusion atteignent un équilibre résultant en un profil de concentration apparent stable au cours du temps. La comparaison de données obtenues pour une solution de deoxyHbS et de carbonmonoxyHbS qui ne forme pas d'agrégats (complexe soluble jusqu'à $0,5 \text{ g/cm}^3$) permet de conclure à l'absence d'agrégats en solution (voir figure 4.8), résultat en accord avec la description d'un équilibre solution-polymère. L'absence d'agrégat en solution a été vérifiée une dizaine d'années plus tard par Kam et Hofrichter [98] en diffusion de lumière.

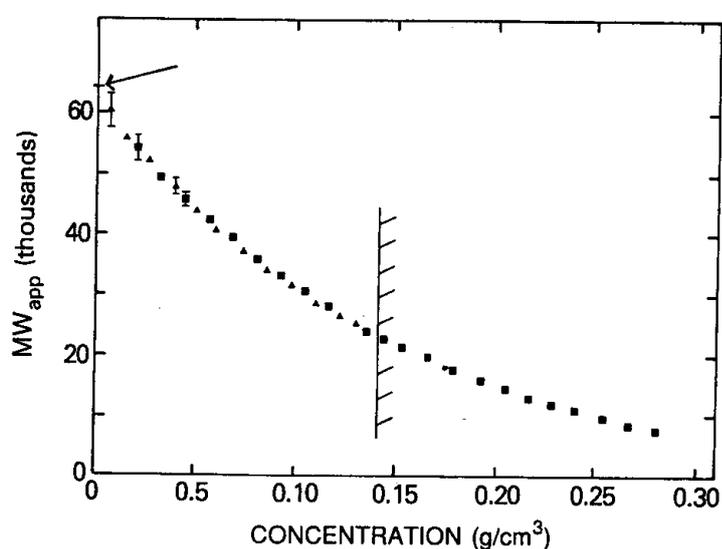


FIG. 4.8: Résultats d'expérience de sédimentation à l'équilibre pour une solution d'hémoglobine S à 20°C . Le poids moléculaire apparent est représenté en fonction de la concentration en hémoglobine le long du profil de sédimentation. Les carrés sont les données pour une solution d'HbS stabilisée par du monoxyde de carbone et les triangles pour une solution de deoxyHbS; le fait que les deux courbes se superposent indique qu'il n'y a pas d'agrégats dans la phase solution d'un gel. La barre verticale correspond à la concentration maximale de la solution de deoxyHbS. (Williams [97])

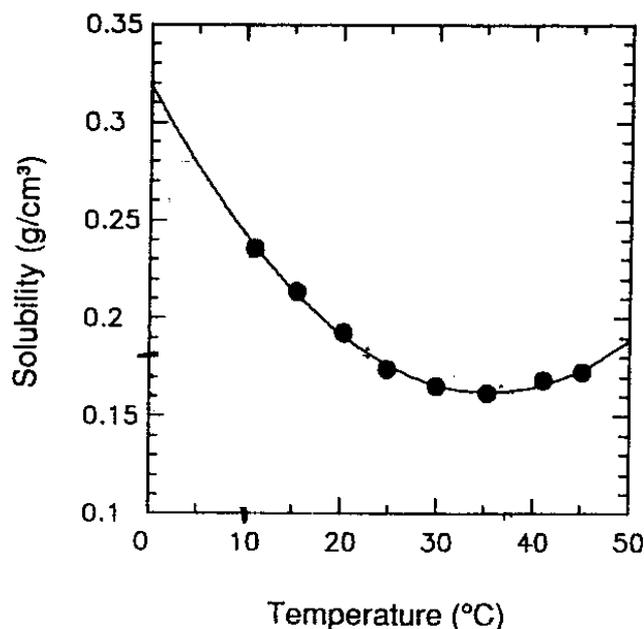


FIG. 4.9: Dépendance à la température d'une solution d'HbS désoxygénée. La courbe qui passe par les points mesurés est un ajustement utilisant la formule empirique, $c_s = 0,319 - 0,00883T + 0,000125T^2$, avec la température exprimée en degré centigrade. (Ross et al. [99])

Effet de la température

Un des paramètres importants pour l'étude de la polymérisation est la température. Un gel peut être préparé en chauffant une solution de deoxyHbS et liquéfié en le refroidissant. Les études de solubilité (figure 4.9) permettent de bien rendre compte de ce phénomène. Ainsi la solubilité est maximale $0,32 \text{ g/cm}^3$ à 0°C et atteint un minimum de $0,16 \text{ g/cm}^3$ à 35°C avant de croître à nouveau. A la température physiologique de 37°C , on est donc proche du minimum de solubilité à comparer avec la concentration moyenne d'hémoglobine dans les globules rouges qui varie autour de $0,30 - 0,32 \text{ g/cm}^3$. Pour une concentration totale inférieure à $0,16 \text{ g/cm}^3$, une solution de deoxyHbS reste liquide quelque soit la température; entre $0,16 \text{ g/cm}^3$ et $0,32 \text{ g/cm}^3$ on peut effectuer des cycles réversibles de polymérisation-dépolymérisation par chauffage et refroidissement successif de la solution.

A partir des données de solubilité de la figure 4.9, on peut calculer la fraction d'hémoglobine polymérisée en considérant la conservation de la masse:

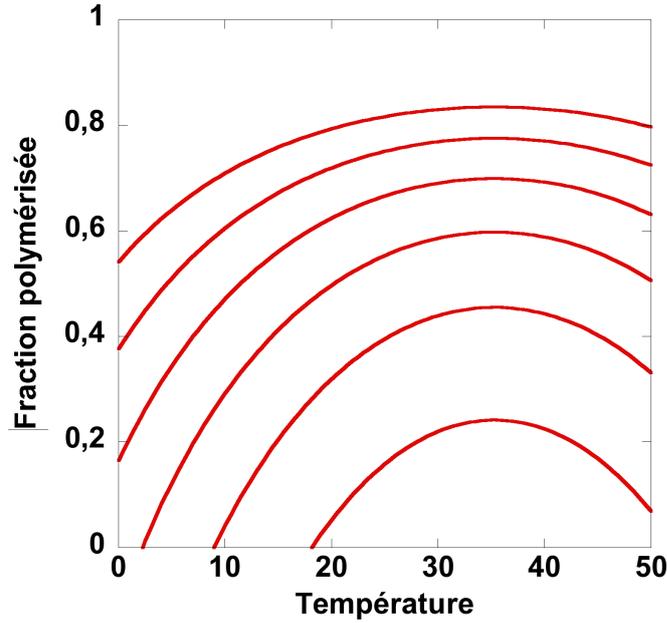


FIG. 4.10: Fraction polymérisée de solutions d'HbS désoxygénées en fonction de la température et calculée à partir des données de solubilité de la figure 4.9 et de l'équation de conservation de la masse (éq. 4.2), avec $c_p = 0,69 \text{ g/cm}^3$. Les courbes sont calculées pour des concentrations initiales variant de $0,20 \text{ g/cm}^3$ pour la courbe la plus basse à $0,45 \text{ g/cm}^3$ pour la plus élevée.

$$c_p v_p + c_s(1 - v_p) = c_0, \quad (4.1)$$

où c_p, c_s, c_0 sont respectivement la concentration de l'hémoglobine dans la phase polymère ($c_p = 0,69 \text{ g/cm}^3$), en solution et la concentration totale initiale (avant gélation), v_p le volume occupé par la phase polymère et c_s la solubilité. La fraction d'hémoglobine polymérisée en fonction de la température et de la concentration initiale est déterminée à partir de 4.1:

$$x_p = \frac{c_p v_p}{c_0} = \frac{1 - c_s/c_0}{1 - c_s/c_p}. \quad (4.2)$$

Effet du pH

Les tests de solubilité décrits jusqu'à présent ont tous été effectués dans un tampon de phosphate de potassium $0,15 \text{ M}$ et $0,05 \text{ M}$ de dithionite de sodium

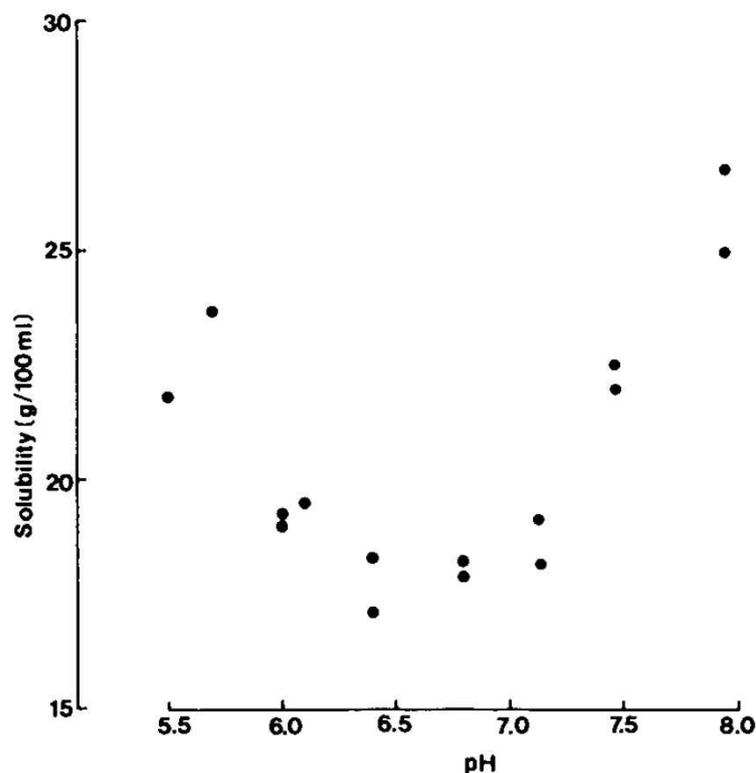


FIG. 4.11: Effet du pH sur la solubilité de l'hémoglobine S désoxygénée à 25°C (Golderb et al. [100])

¹ (sel qui sert à fixer l'oxygène pour la conservation des échantillons) à un pH = 7,1. Ces conditions expérimentales relèvent plus de l'habitude par rapport aux premières études entreprises. Goldberg et al. [100] ont regardé l'influence du pH sur la solubilité de la deoxyHbS, les données sont représentés sur la figure 4.11: entre les pH 6,0 et 7,0 la solubilité varie peu mais augmente rapidement pour des pH plus acide ou basique, le minimum de solubilité est atteint pour un pH de 6,5, valeur proche du pH isoélectrique ² de l'ordre de 7 pour la deoxyHbS; le principal effet d'un pH plus élevé ou moins élevé est de déstabiliser le polymère par une augmentation des interactions électrostatiques répulsives entre les molécules. Chez les humains le pH du sang varie entre 7,35 et 7,45 soit dans la gamme de pH pour lesquels la solubilité augmente.

¹en solution, le dithionite de sodium réagit avec l'oxygène et s'oxyde en ions sulfite et sulfate selon la réaction: $S_2O_4^{2-} + O_2 + 2OH^- \longrightarrow SO_3^{2-} + SO_4^{2-} + H_2O$

²pH pour lequel la molécule est sous forme zwitterionique

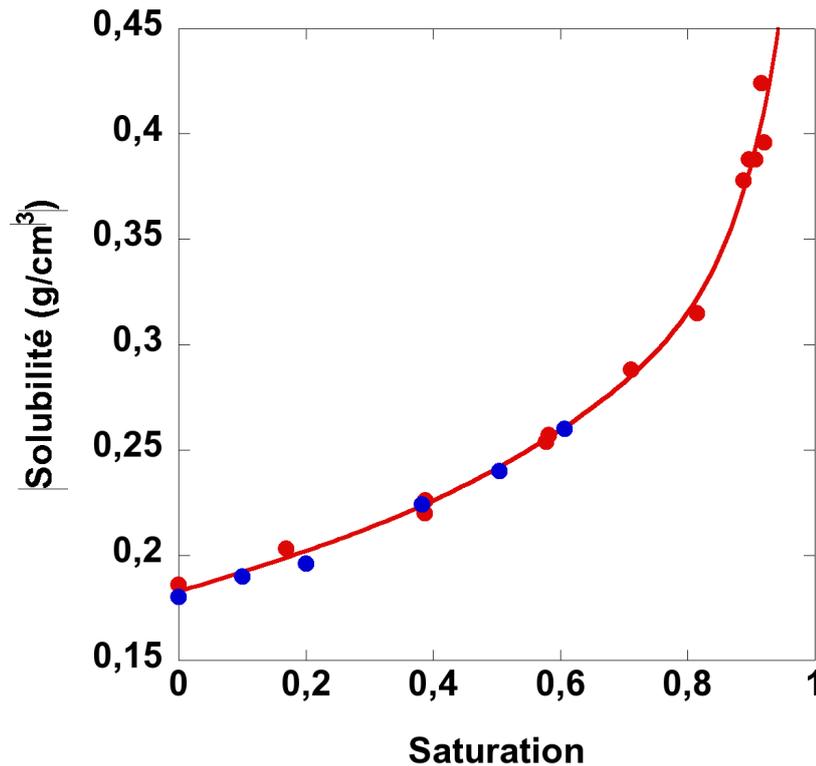


FIG. 4.12: Solubilité de l'HbS en fonction de la saturation en oxygène (points rouge) et monoxyde de carbone (points bleu) à 23,5°C et 25°C respectivement. La courbe en rouge est un ajustement des données pour l'oxygène avec la fonction empirique $c_s = 0,183 + 0,0924y_s + 0,0980y_s^3 + 0,235y_s^{15}$. (à partir des données de Sunshine et al. [102] pour l'oxygène et Hofrichter pour le CO [103])

Effet de la concentration d'oxygène

La concentration en oxygène est le paramètre le plus critique pour la polymérisation de l'HbS. Historiquement, le fait qu'une solution d'HbS complètement désoxygénée polymérise tandis qu'une solution pleinement oxygénée reste stable a été découvert par Harris en 1950 [101]. Pour avoir des données de solubilité entre ces deux extrémités il a fallu attendre une trentaine d'année car faire des mesures précises sur des échantillons à des saturations partielles d'oxygène est délicat du fait de la faible stabilité du système dans le temps. Les données de solubilité à 23,5°C pour l'oxygène et 24,5°C pour le monoxyde de carbone sont représentées sur la figure 4.12. A des saturations élevées en oxygène, la solubilité augmente rapidement pour atteindre des valeurs supérieures à 0,4 g/cm³ à 90 % de saturation.

Il n'existe pas de mesures précises à saturation partielle d'oxygène pour différentes températures par contre il en existe pour le monoxyde de carbone qui forme un système stable avec l'hémoglobine. Ces données [103] montrent que les courbes de solubilité en fonction de la saturation sont approximativement parallèles, c'est-à-dire qu'elles sont décalées pour chaque saturation, par la différence de solubilité à saturation nulle. De plus comme la solubilité en fonction de la saturation est identique pour l'oxygène et le monoxyde de carbone (voir figure 4.12), il est admis que la solubilité en fonction de la saturation d'oxygène suit le même décalage. La solubilité peut alors être calculée pour une température et une saturation d'oxygène donnée en regroupant les fonctions empiriques précédemment utilisées pour ajuster les données des figures 4.9 et 4.12:

$$c_s = 0,321 - 0,00883T + 0,000125T^2 + 0,0924y_s + 0,0980y_s^3 + 0,235y_s^{15}, \quad (4.3)$$

où y_s est la saturation en oxygène dans la phase solution et T la température exprimée en degré Celsius. La fraction polymérisée est alors calculée en injectant ces données dans l'équation 4.2. Pour une température de 37°C, la fraction de polymère pour plusieurs concentrations initiales d'HbS en fonction de la saturation en oxygène, est représentée sur la figure 4.13: on remarquera que pour une concentration totale de 0,45 g/cm³, qui correspond à la concentration intracellulaire des globules les plus denses, du polymère est présent jusqu'à une saturation en oxygène de 95%.

Les courbes d'affinité pour l'oxygène des différentes phases permettent de compléter la description. Pour la phase solution, les mesures ont montré que le comportement est le même que pour de l'hémoglobine A (voir figure 4.14), les monomères d'hémoglobine S se lient donc à l'oxygène normalement.

La figure 4.15 compare l'affinité pour l'oxygène du polymère, de la phase solution et du gel total: l'affinité du polymère est beaucoup plus faible que celle de la solution, contrairement à la solution, il se lie de façon non coopérative à l'oxygène. Ces données mesurées confortent le modèle à deux phases composées d'une solution monomérique d'HbS et d'une phase polymère de concentration totale d'Hbs $c_p = 0,69$ g/cm³, les points de l'affinité du gel total s'ajustent à la courbe d'affinité calculée à partir de la relation de conservation de la masse d'oxygène:

$$y_t = y_p x_p + y_s (1 - x_p), \quad (4.4)$$

avec y_t la saturation du gel et y_p la saturation du polymère donnée par $y_p = K_p p / (1 + K_p p)$ où p est la pression partielle en oxygène.

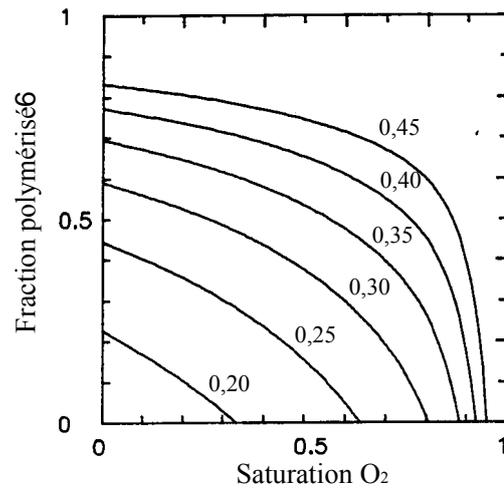


FIG. 4.13: Fraction d'HbS polymérisée en fonction de la saturation en oxygène de la solution à 37°C. Données calculées à partir des équations 4.2 et 4.3 pour des concentrations initiales variant de 0,20 g/cm³ à 0,45 g/cm³ par incrément de 0,05 g/cm³. (adapté de Eaton et al. [1])

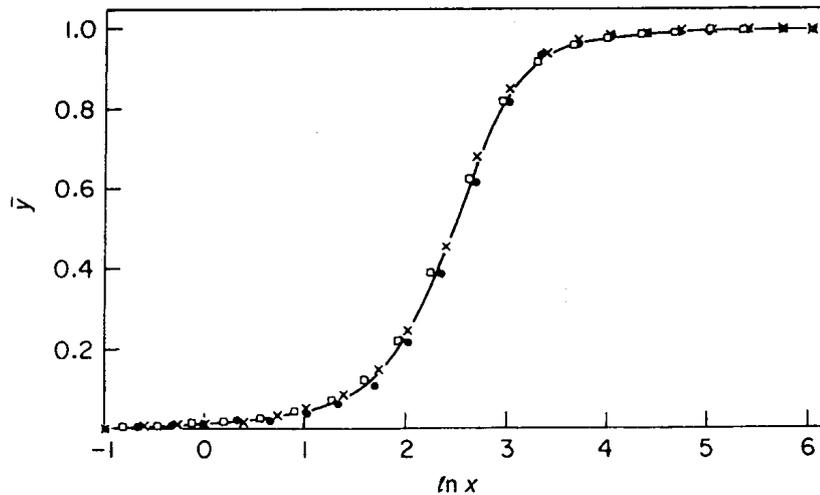


FIG. 4.14: Comparaison de l'affinité pour l'oxygène de l'hémoglobine A et l'hémoglobine S à 25°C. La fraction d'hémoglobine saturée est représentée en fonction de la pression d'oxygène en torr. Les carrés sont les données pour l'HbS à 0,15 g/cm³; les croix pour l'HbA à 0,16 g/cm³ et les cercles pour l'HbA à 0,35 g/cm³. (Gill et al. [104])

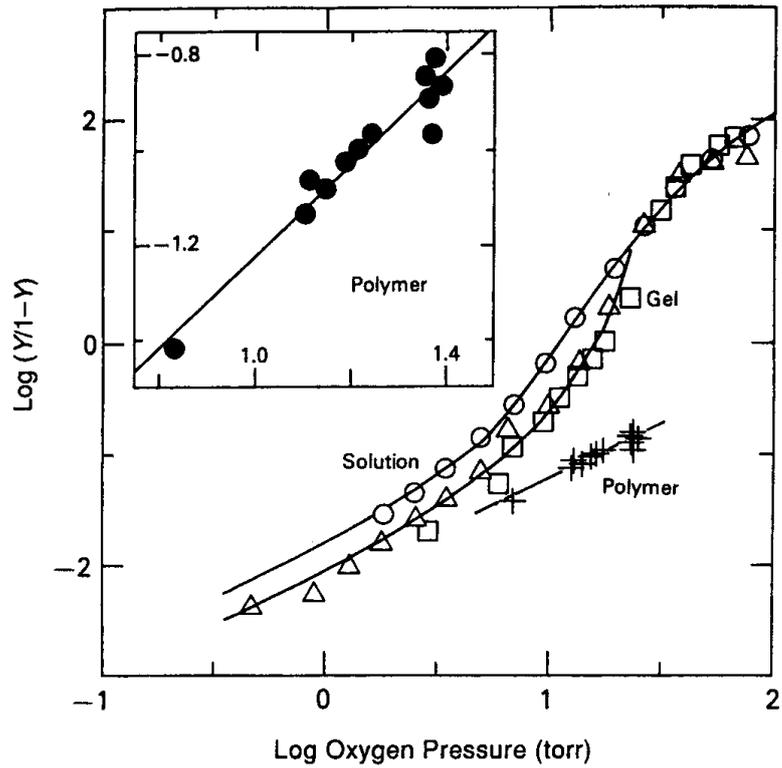


FIG. 4.15: Courbes d'affinité pour l'oxygène de la phase solution, du polymère et du gel. La courbes qui passe par les points expérimentaux pour le gel à été calculées en utilisant l'équation 4.4 . (Eaton et al. [1])

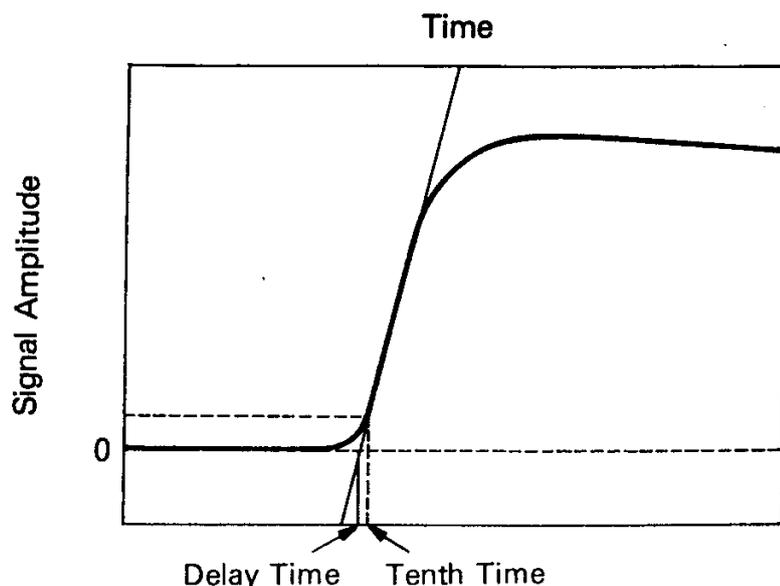


FIG. 4.16: Courbe typique de suivi de la cinétique de polymérisation de l'HbS. Le temps de retard est défini par l'intersection entre la pente maximum de la courbe de suivi et l'axe des abscisses, le temps correspondant à 10 % du signal maximum est en pratique très proche du temps de retard du fait de l'explosivité de la réaction. (Eaton et al. [1])

4.3.2 Cinétique de polymérisation

La cinétique de polymérisation de l'HbS est caractérisée par une très grande dépendance avec la concentration initiale et la température. L'allure d'une courbe permettant de suivre l'avancement de la polymérisation est représentée sur la figure 4.16: le début de la polymérisation est précédé d'un temps appelé « temps de retard » durant lequel aucun signal caractéristique d'une agrégation n'est détecté. Passé ce délai, il y a formation « explosive » de polymère. Un autre paramètre utile pour caractériser une expérience de suivi de polymérisation est le temps requis pour atteindre 10 % du signal maximum final.

Pour effectuer le suivi de la cinétique de polymérisation, deux méthodes sont privilégiées: la technique dite du saut de température et la technique par photolyse. Une expérience de saut de température consiste à amener à la température souhaitée une solution d'HbS préalablement désoxygénée à 0°C (solution de monomères) et de suivre l'évolution au cours du temps de la turbidité de la solution par spectrométrie. Lors d'une expérience par photolyse, une solution d'HbS est saturée avec du monoxyde de carbone (complexe stable dans le temps) puis la polymérisation

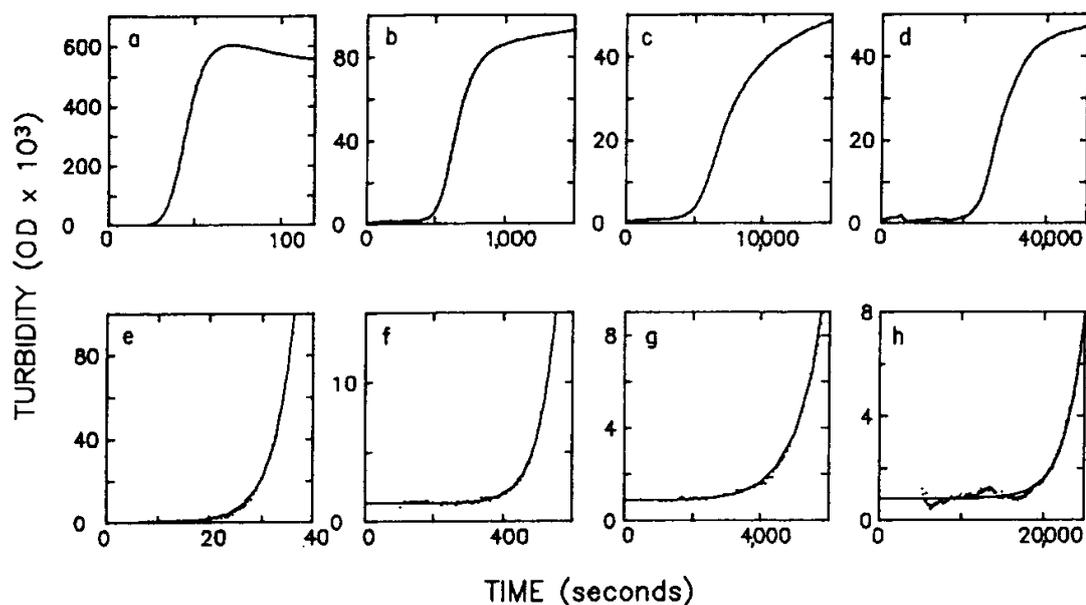


FIG. 4.17: Suivi de la cinétique de polymérisation par mesure de la turbidité lors d'expériences de saut de température de 0 à 37°C. La variation au cours du temps de la densité optique (OD) est reportée pour plusieurs concentrations de deoxyHbS: (a) 0,255 g/cm³, (b) 0,236 g/cm³, (c) 0,227 g/cm³, (d) 0,218 g/cm³. (e-h) zoom sur le début des courbes du dessus. (Ferrone et al. [54])

est déclenchée en éclairant la solution avec un laser de longueur d'onde 514 nm qui photodissocie l'HbS du CO, la mesure au cours du temps de l'intensité diffusée par l'échantillon permet de suivre l'avancement de la polymérisation. Dans la pratique la méthode du saut de température est utilisée pour des solutions présentant un temps de retard supérieur à dix secondes, temps nécessaire pour atteindre l'équilibre thermique et la méthode par photolyse pour les cinétiques plus rapides. Une étude systématique a été menée par Ferrone en 1985 [54] pour des solutions d'HbS de concentration variant de 0,2 g/cm³ à 0,4 g/cm³ dans la gamme de température 5 à 50°C, les courbes de cinétique de polymérisation sont représentées sur les figures 4.17 et 4.18 et montrent bien l'extrême dépendance à la concentration du temps de retard qui varie de quelques millisecondes à plusieurs heures pour les concentrations les plus faibles.

La variation du temps nécessaire pour atteindre 10 % du signal final est représentée (voir figure 4.19) sur la gamme de concentration 0,2 – 0,4 g/cm³ pour différentes températures. Ce temps passe de quelques millisecondes à plus de 10000 secondes (plus de 2h30) lorsque la concentration d'hémoglobine S dimi-

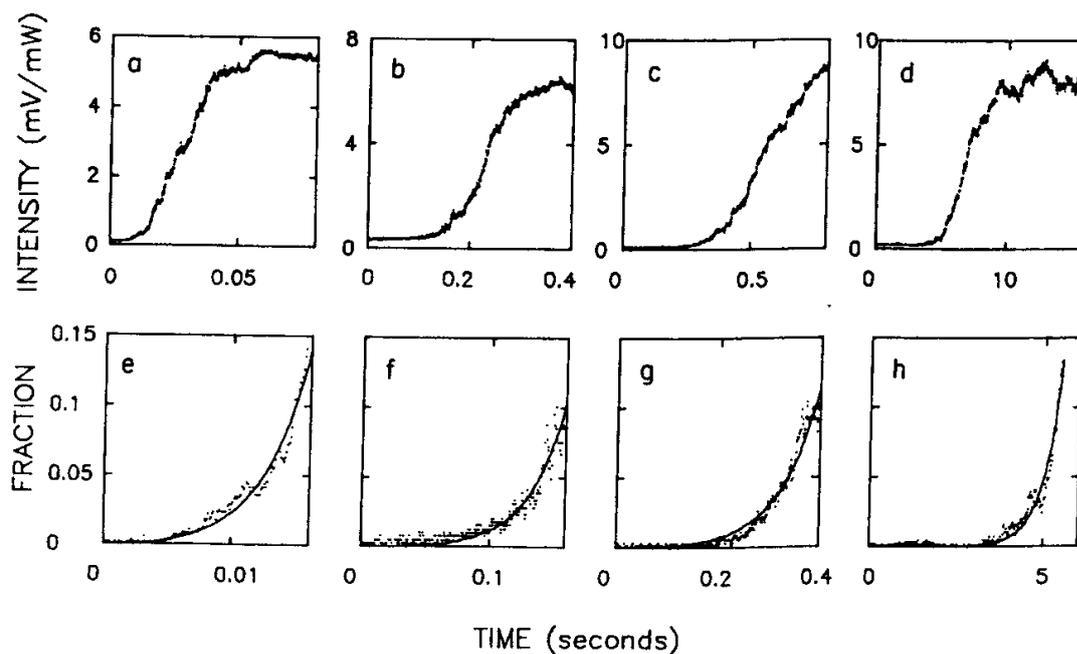


FIG. 4.18: Suivi de la cinétique de polymérisation par mesure de diffusion de la lumière lors d'expériences de photolyse à 24,9°C. L'intensité diffusée au cours du temps est reportée pour des échantillons de concentration: (a) 0,373 g/cm³, (b) 0,331 g/cm³, (c) 0,310 g/cm³, (d) 0,269 g/cm³. Le détail du début des courbes est représenté sur les figures (e-h). (Ferrone et al. [54])

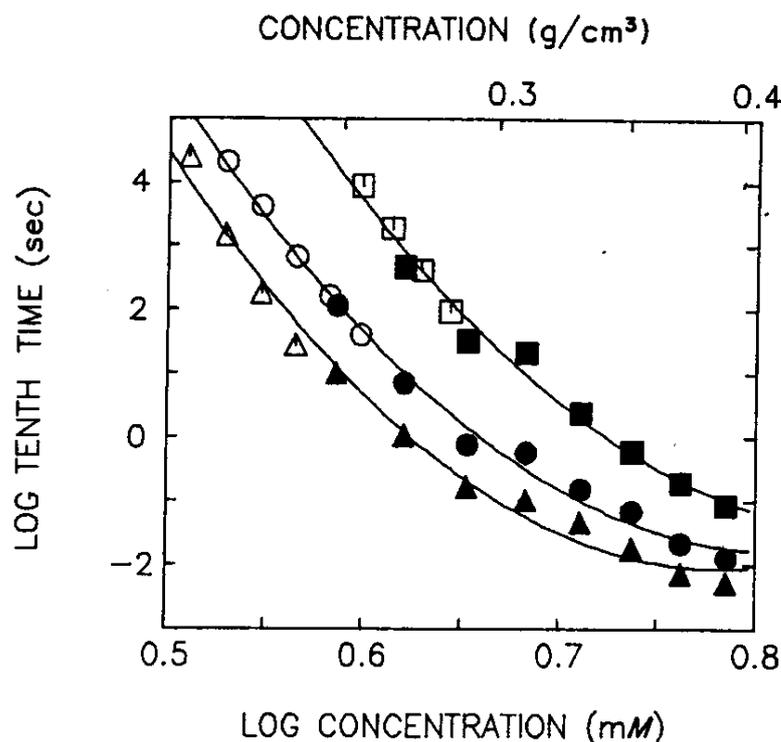


FIG. 4.19: Dépendance du temps pour atteindre 10 % de l'avancement de la réaction en fonction de la concentration d'HbS pour différentes températures: 15°C pour les carrés, 25°C pour les cercles et 35°C pour les triangles. Les données ont été obtenues par saut de température pour les symboles vides et par photolyse pour les symboles pleins. (Ferrone et al. [54])

nue d'un facteur 2. La dépendance à la concentration du temps 10 % n'est pas constante et augmente d'autant plus que la concentration diminue: dans l'intervalle 0,3 – 0,4 g/cm³, le temps 10 % est inversement proportionnel à la puissance 15 [54] de la concentration d'HbS tandis que dans l'intervalle 0,2 – 0,3 g/cm³ la dépendance augmente à la puissance 35 [54].

Ces résultats trouvent une explication dans le mécanisme de nucléation proposé par Ferrone et al. en 1985 [55]. Le premier polymère en solution se forme par un mécanisme de nucléation homogène (voir figure 4.20) puis croît par l'addition de monomères aux deux extrémités, les surfaces latérales du polymère peuvent alors servir de support pour la nucléation de nouveaux polymères appelée nucléation hétérogène (voir figure 4.20). Les interactions noyaux-surface sont favorables à la nucléation hétérogène. Durant la polymérisation, la surface du polymère croît au cours du temps, résultant en l'augmentation du taux de nucléation hétérogène. Ce

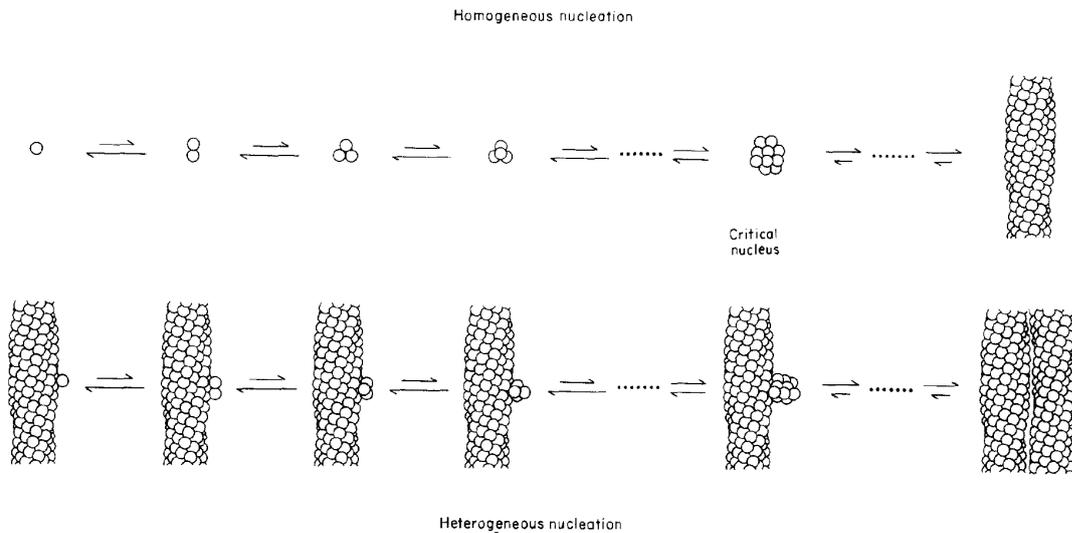


FIG. 4.20: Schéma représentant le mécanisme de nucléation homogène-hétérogène. La taille critique du noyau correspond à la concentration minimale de monomères agrégés pour laquelle le noyau est stable, le processus d'addition de monomères sur le noyau devient alors favorable. Deux types de nucléation sont possible: en solution, appelée nucléation homogène ou sur la surface d'un polymère déjà existant, appelée nucléation hétérogène. (Ferrone et al. [55])

mécanisme explique le caractère autocatalytique de la réaction qui se manifeste par un temps de retard suivi de « l'explosion » de la polymérisation.

Les temps de retards mesurés par Ferrone et al. sont comparables à ceux mesurés par Coletta et al. [105] sur des globules drépanocytaires. Ces temps doivent être comparés aux temps de circulation des globules dans la microcirculation (0,5 à 2 s) et dans la circulation totale (10 à 40 s), si bien que la majorité des globules rouges sont réoxygénés au niveau des poumons avant que la polymérisation ait lieu. L'explication de la vaso-occlusion résultant uniquement de l'obstruction stériques de la microcirculation par des globules fortement déformés à cause de la polymérisation de l'HbS n'est pas raisonnable. Les études à l'échelle cellulaire permettent d'apporter des éléments nouveaux dans la compréhension de cette maladie.

4.4 Etudes sur des cellules

4.4.1 Généralités sur le sang et la microcirculation sanguine

Compostition

Le sang est une suspension de cellules dans une solution appelée plasma, composée à 90% d'eau en poids, le reste étant principalement des protéines. Les cellules contenues dans le sang sont pratiquement toutes des globules rouges, avec des globules blancs (responsables de la réponse immunitaire) comptant pour 0,1% et des plaquettes (facteur de coagulation) comptant pour environ 5% du total des cellules sanguines [106]. On appelle hématoците la fraction volumique des globules rouges. En condition normale, l'hématoците est légèrement inférieur à 50%. En revanche, chez les personnes atteintes de la drépanocytose, l'hématoците se situe aux alentours de 30% à cause de l'hémolyse (éclatement des globules rouges) prématurée: au bout de 30 jours contre 120 jours en moyenne pour des globules sains [1].

Rhéologie du sang

Le sang est un fluide rhéofluidifiant, c'est-à-dire que sa viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente (figure 4.21). Ce comportement vient du fait qu'à faible taux de cisaillement les globules rouges s'arrangent en rouleaux (une pile de globules) en raison de la présence de fibrinogène (protéine du plasma qui favorise la coagulation). Lorsque le taux de cisaillement augmente, les rouleaux ont tendance à se casser et la viscosité du sang diminue. A des taux de cisaillement plus importants, les globules se déforment, ce qui facilite la mobilité des uns par rapport aux autres ainsi que la mobilité de la membrane par rapport au centre de masse en un mouvement de chenille de char ce qui résulte en une nouvelle diminution de la viscosité.

La fluidité du sang à des taux de cisaillement $> 100 \text{ s}^{-1}$, lorsqu'il n'y a plus d'agrégation, est comparée avec d'autres types de suspensions dont des globules drépanocytaires désoxygénés ou des sphères dures (figure 4.22). Pour une fraction volumique de 50% la solution de sphères dures cesse de s'écouler tandis que le sang sain reste fluide même à des fractions volumiques supérieures à 80%. L'évolution de la viscosité pour des globules drépanocytaires désoxygénés suit la même allure que celle des sphères dures. C'est l'observation de ce comportement qui a amené Higgins et al. [79] à s'intéresser à l'écoulement de globules drépanocytaires dans des canaux microfluidiques pour essayer de comprendre si l'origine de la vaso-occlusion n'était pas rhéologique.

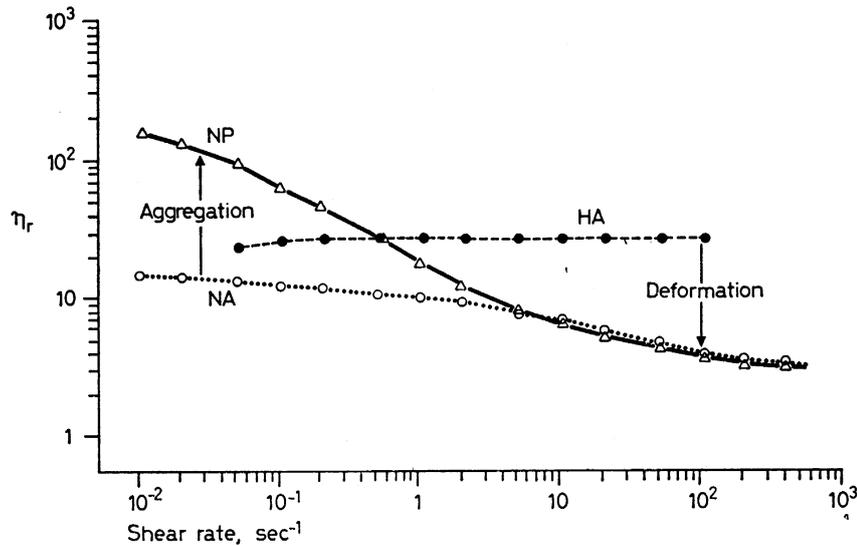


FIG. 4.21: Viscosité relative en fonction du taux de cisaillement pour trois types de solutions à 50% d'hématocrite: NP, globules Normaux dans du Plasma; NA, globules Normaux dans 11% d'Albumine (en absence de fibrinogène favorisant l'agrégation) et HA, globules artificiellement rigidifiés (fixés au glutaraldehyde) dans 11% d'Albumine. (Chien [107])

Microcirculation

La microcirculation est composée principalement par les artérioles, les veinules et les capillaires sanguins. L'écoulement du sang dans la microcirculation a lieu en régime de bas nombre de Reynolds (écoulement laminaire).

Les capillaires sanguins sont les plus petits vaisseaux du corps, leurs diamètres sont de taille similaire à celle des globules rouges ($\sim 2-5 \mu m$) et la vitesse des globules est de quelques centaines de microns par seconde. Les capillaires se jettent dans les veinules post-capillaires dont le diamètre est compris entre $8-30 \mu m$. La vitesse des globules y est également plus élevée que dans les capillaires sanguins et atteint jusqu'à quelques millimètres par seconde. L'hématocrite dans la microcirculation est compris dans la gamme 10-25%. Cette diminution de l'hématocrite résulte de l'écoulement d'une couche de plasma contre les parois des vaisseaux sanguins, les globules s'écoulant au milieu du flux (effet Fahraeus-lindqvist). Au niveau de la microcirculation, l'épaisseur de cette couche déplétée en globules de l'ordre de quelques microns n'est plus négligeable devant les diamètres caractéristiques des vaisseaux. Dans les veinules post-capillaires, l'hématocrite varie entre 20-25% [106].

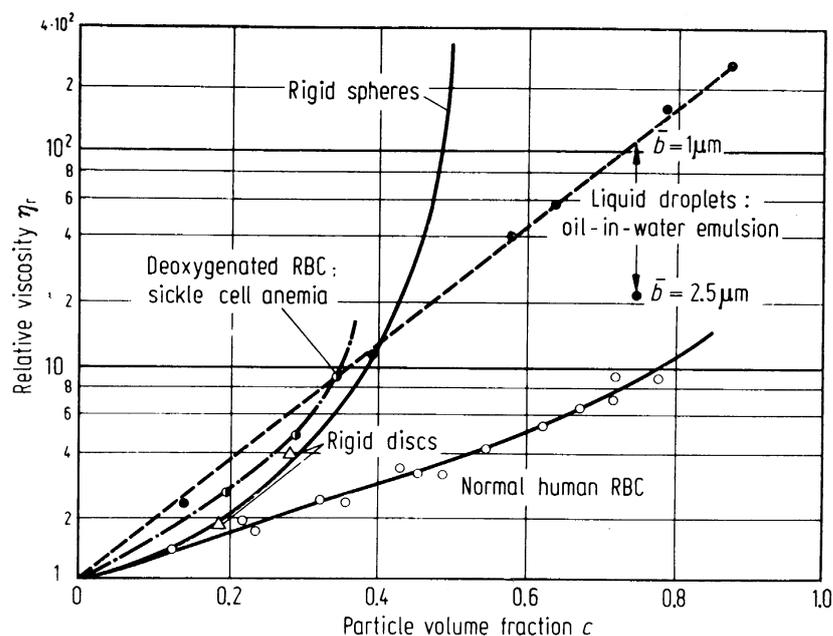


FIG. 4.22: Comparaison de la viscosité relative en fonction de la fraction volumique pour différentes suspensions: sang normal, globules drépanocytaires désoxygénés, sphères dures, gouttelettes et disques rigides. (Goldsmith [108]).

Ces données sont nécessaires pour concevoir des canaux microfluidiques se rapprochant au mieux d'un écoulement physiologique.

4.4.2 Morphologie des globules rouges drépanocytaires

Le globule rouge est une membrane composite composée d'une bicouche lipidique, de protéines membranaires et d'un cytosquelette sous-jacent à l'origine des propriétés élastiques de la membrane (figure 4.23). Celui-ci est formé par un réseau composé principalement de spectrine relié à la membrane par l'ankyrine via des interactions avec la protéine band 3 (protéine transmembranaire). Les globules rouges sains présentent une morphologie unique appelée discocyte, un disque biconcave d'environ $8\ \mu\text{m}$ de diamètre et $2\ \mu\text{m}$ de haut. Le volume moyen est de $90\ \mu\text{m}^3$ pour une surface d'environ $140\ \mu\text{m}^2$, ce qui représente un excès de surface de près de 50 % comparé à la surface d'une sphère renfermant le même volume [89]; cette caractéristique confère au globule rouge une déformabilité importante lui permettant de négocier le passage des capillaires sanguins les plus petits ($\leq 5\ \mu\text{m}$).

La polymérisation de l'HbS dans les globules drépanocytaires (ou SRBC pour

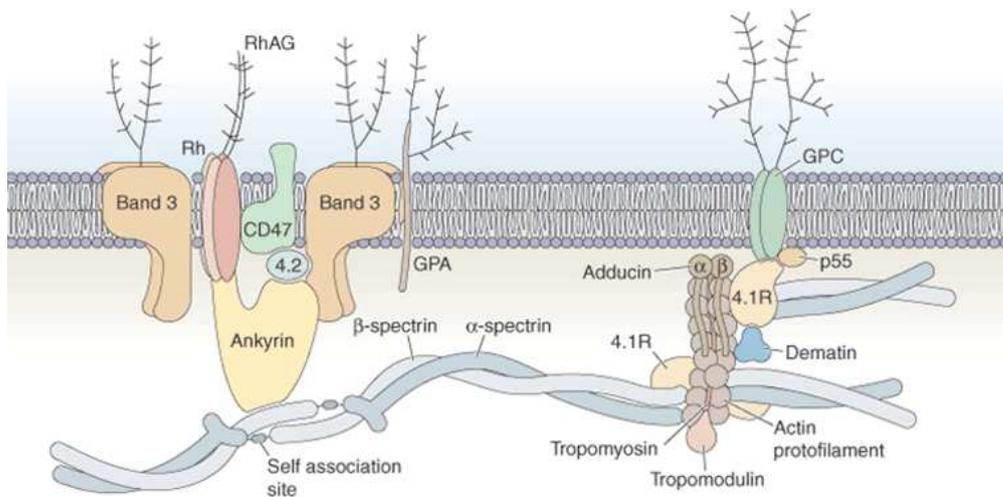


FIG. 4.23: Structure de la membrane du globule rouge. La bicouche lipidique contient de nombreuses protéines. Le cytosquelette, réseau de spectrine bidimensionnel, est ancré à la membrane par l'intermédiaire de l'ankyrine et band 3.

sickle red blood cell) est à l'origine des déformations de la membrane du globule. L'étude menée par Corbett et al. en 1995 [65] est la première à dresser une carte détaillée de cette riche morphologie. La concentration corpusculaire moyenne d'hémoglobine (CCMH) étant responsable d'une grande disparité dans la cinétique de polymérisation, les auteurs ont séparé les globules sur un gradient de densité (voir chapitre techniques expérimentales) en quatre fractions correspondant à des CCMH respectives de $31,2 \text{ g/cm}^3$, $34,5 \text{ g/cm}^3$, $38,7 \text{ g/cm}^3$ et $+40 \text{ g/cm}^3$. Les cellules désoxygénées sont imagées par microscopie à polarisation différentielle ce qui permet de déterminer la quantité d'hémoglobine totale, la quantité d'hémoglobine polymérisée et l'orientation du polymère (voir figure 4.24).

Ces mesures ont permis d'établir la classification suivante:

- cellules contenant 1 à 3 domaines, ces cellules contiennent un, deux ou trois domaines distincts contenant des polymères alignés, elles représentent jusqu'à environ 50 % des globules de la fraction la moins dense. Dans cette catégorie, on peut distinguer deux types particuliers: les cellules à constriction centrale et les sphérulites. Les cellules à constriction centrale contiennent une faible quantité de polymère au centre mais cette quantité augmente rapidement le long d'un axe vers les bords de la cellule (voir figure 4.25 B); cette morphologie semble être le résultat d'une unique nucléation homogène au centre suivi de multiples nucléations hétérogènes le long d'un axe. Les sphérulites proviennent aussi d'une nucléation centrale suivie de nombreuses

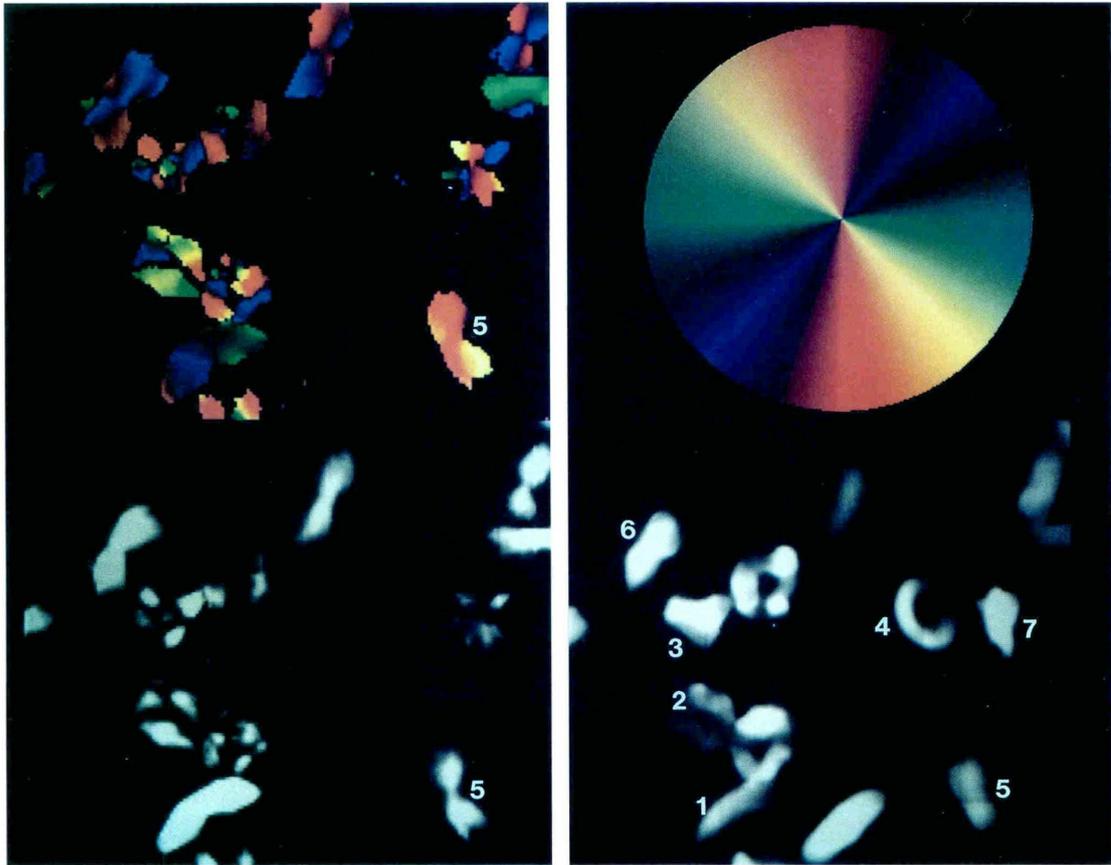


FIG. 4.24: En bas à droite: image d'absorption (proportionnelle à l'hémoglobine totale) de globules rouges. En bas à gauche le même champ que précédemment, l'intensité est proportionnelle à la quantité de polymère (différence d'absorption). Sur la partie supérieure, les couleurs codent pour l'orientation du polymère. (1) cellule simple domaine, (2) cellules contenant trois domaines, (3) cellule à domaines multiples, (4) pas de détection de polymère, (5) et (6) cellules à constriction centrale, et (7) sphérulite. (Corbett et al. [65])

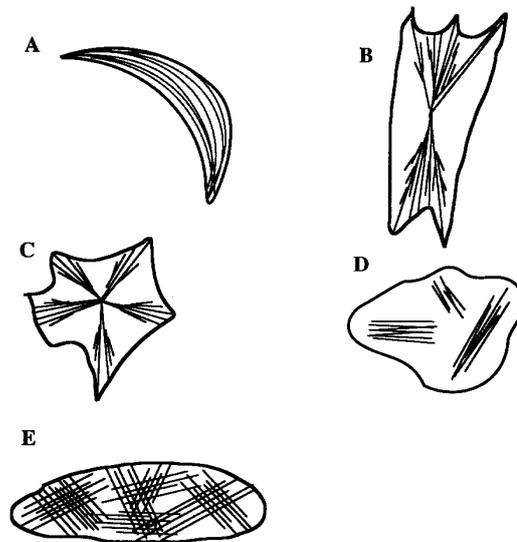


FIG. 4.25: Schéma illustrant l'arrangement des polymères à l'intérieur des SRBC. (A) forme classique un faucille d'une cellule à un seul domaine, (B) cellule à constriction centrale, (C) sphérulite, (D) cellules contenant trois domaines distincts et (E) cellules à domaines multiples. (Corbett et al. [65])

nucléations hétérogènes partant dans toutes les directions (figure 4.25 C).

- cellules à domaines multiples: ces cellules contiennent plus de trois domaines mais moins de 10, elles ont souvent un aspect grumeleux.
- cellules contenant une myriade de domaines, renfermant plus de 10 domaines et de forme « patatoïde », ces cellules sont majoritaires dans la fraction la plus dense.

Une classe de cellules particulières concerne un pourcentage de SRBCs dit irréversibles car restant déformés même en condition oxygénée. Ces cellules ne contiennent plus de polymère. La persistance de leur déformation proviendrait du découplage du réseau de spectrine avec la membrane [109]. Enfin pour compléter la description, certains globules rouges gardent leur forme discocyte même désoxygénés, renfermant seulement quelques petits domaines de polymère en périphérie.

Cette classification est établie à partir de cellules désoxygénées au repos puis fixées. Il n'existe pas de données sur des cellules désoxygénées sous cisaillement, il n'est pas certain que toute cette riche morphologie se retrouve en écoulement, ce que nous allons montrer dans le chapitre suivant.

4.4.3 Propriétés physiques des globules rouges drépanocytaires

Déformabilité

L'aptitude des globules rouges à changer de forme est cruciale pour la traversée de la microcirculation composée de capillaires de taille inférieure à celle des globules. Parmi les différents facteurs qui déterminent ou impactent cette déformabilité, on peut citer les propriétés de la membrane, la viscosité du cytoplasme (qui augmente avec la concentration d'hémoglobine), la déshydratation ou la concentration d'oxygène (responsable de la polymérisation). La déformabilité des globules rouges a été étudiée par de nombreuses techniques: les études de filtration, d'ektacytométrie (étude par diffraction) et viscosimétrie qui permettent de sonder un comportement moyen sur l'ensemble des cellules, ont démontré que les SRBCs possèdent une déformabilité moindre que celle des globules sains et ce, même en condition normale d'oxygénation [110–115]; les techniques de micropipettes permettent quand à elles de mesurer les propriétés mécaniques de cellules individuelles [116–122].

Evans et al. [119] ont comparé les propriétés mécaniques de globules rouges sains et de SRBCs oxygénés en fonction de la concentration en hémoglobine par des expériences de micropipette. Ces expériences permettent de mesurer le module élastique de cisaillement de la membrane $\mu \propto R^2 d(\Delta P)/dL$, où R est le rayon interne de la micropipette, ΔP la différence de pression appliquée et L la longueur de la langue du globule rouge pénétrant dans la micropipette. Les résultats (figure 4.26) montrent que cette quantité reste constante pour des globules sains dans la gamme de concentration $0,32 - 0,45 \text{ g/cm}^3$. Tandis que pour les SRBCs la rigidité est semblable à celle des globules sains dans la gamme $0,32 - 0,38 \text{ g/cm}^3$, mais elle augmente progressivement avec la concentration jusqu'à marquer une forte augmentation pour les globules les plus denses ($0,48 \text{ g/cm}^3$) avec une rigidité huit fois supérieure à celle correspondant aux cellules les moins denses.

Un autre paramètre intéressant, la capacité à recouvrer sa forme initiale après une déformation élongationnelle, a été caractérisée à partir du temps nécessaire à un globule étiré par deux extrémités à l'aide de micropipettes à retrouver son rapport longueur/hauteur initial. Les résultats de la figure 4.27 montrent qu'il n'y a pas de différence entre les globules sains et les SRBCs. Par contre, ce temps caractéristique est fortement dépendant de la concentration d'hémoglobine, atteignant des valeurs 20 fois supérieures pour les SRBCs irréversibles (déformés en condition normale d'oxygénation). L'hypothèse avancée, à des concentrations importantes d'HbS, celle-ci pourrait former un gel associé à la membrane, comme une sorte de croûte.

Ces résultats sont à replacer dans le contexte de la pathophysiologie de la drépa-

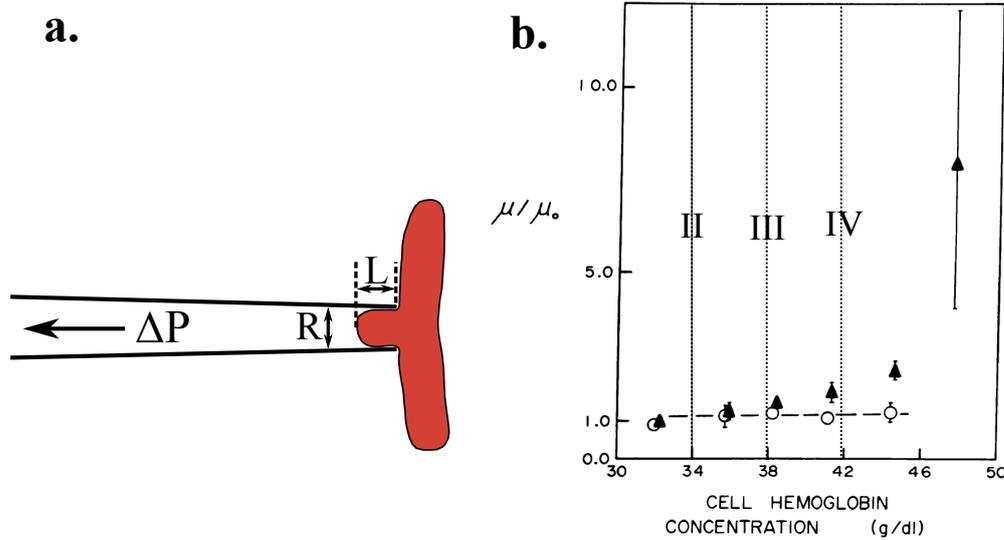


FIG. 4.26: **a.** Schéma représentant une expérience de micropipette: un globule rouge est aspiré par une différence de pression ΔP à l'entrée d'un capillaire de diamètre R , la longueur de la langue dans le capillaire est noté L . **b.** Module élastique normalisé par la valeur mesurée pour un globules sain de concentration $0,32 \text{ g/cm}^3$ en fonction de la concentration intracellulaire d'hémoglobine. Les mesures effectuées sur les globules sains sont représentées par les cercles et sur les SRBCs par les triangles. Les lignes pointillées verticales indiquent les concentrations moyennes d'HbS dans les globules pour les différentes fractions triées (voir le chapitre suivant techniques expérimentales). La mesure à $0,48 \text{ g/cm}^3$ a été faite sur un irréversible. (Evans et al. [119])

nocytose qui résulte en une distribution de densité et donc de concentration intracellulaire d'hémoglobine plus large que pour les globules sains. Le pourcentage de globules ayant une concentration supérieure à $0,37 \text{ g/cm}^3$ chez des personnes souffrant de la drépanocytose peut atteindre 50 % tandis que pour des globules rouges normaux, 90 % ont une concentration d'hémoglobine comprise dans la gamme $0,29 - 0,35 \text{ g/cm}^3$. La forte dépendance à la concentration de la déformabilité des globules oxygénés est donc un facteur important pour une meilleur compréhension de la maladie. De plus, dans la microcirculation où la pression en oxygène diminue, la formation de polymère dans les globules désoxygénés affecte davantage la déformabilité de ces derniers [120].

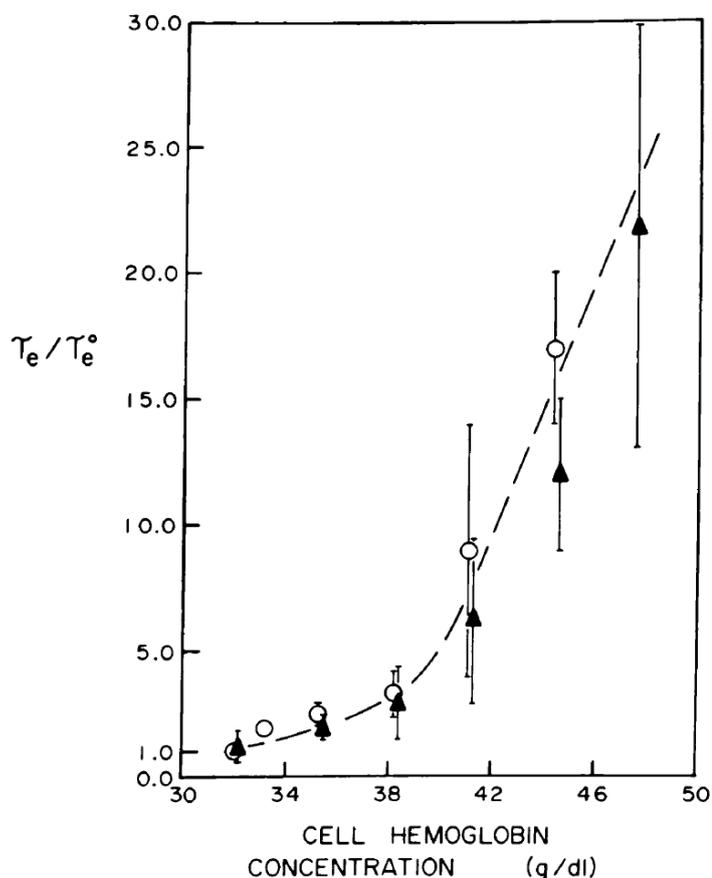


FIG. 4.27: Temps caractéristiques de recouvrement d'une déformation élongationnelle normalisé par la valeur mesurée pour un globule sain de concentration 0,32 g/cm³ en fonction de la concentration intracellulaire d'hémoglobine. Les cercles sont les mesures sur les globules sains et les triangles sur les SRBCs (Evans et al. [119])

Adhésion

Les globules rouges drépanocytaires sont connus pour être plus adhésifs que leurs homologues sains, ils participeraient à de nombreuses interactions cellules-cellules et cellules-protéines par l'intermédiaire de l'expression anormale de protéines et récepteurs sur leur membrane, qui résulterait de l'altération de celle-ci par le processus de polymérisation [63]. Des études ont montré que l'adhésion des SRBCs sur les cellules endothéliales implique des changements de la membrane et de la forme [75, 123], dépend de la densité des globules et a lieu majoritairement

dans les vénules postcapillaires [77, 123]. Kaul et al. [123] ont observé in vivo chez le rat les différents comportements adhésifs de SRBCs triés par densité: les SRBCs discocytes oxygénés et artificiellement déshydratés pour atteindre la densité des globules les plus denses, adhèrent moins puis retrouvent leur capacité d'adhésion une fois réhydratés; les SRBCs les plus denses (comprenant de nombreux irréversibles déformés) adhèrent moins mais retrouvent de l'adhérence lorsqu'ils sont hydratés artificiellement. Ces observations tendent à prouver que les irréversibles sont moins adhérents plus du fait de leur CCMH élevée (donc plus rigides) et une forme anormale que par un manque de potentiel d'adhésion.

Il a aussi été observé que les globules blancs jouent un rôle important dans le processus d'adhésion des globules drépanocytaires, des expériences sous flux dans une chambre microfluidique ont montré que les globules blancs provenant de personnes atteintes de la drépanocytose, sont plus adhérents aux cellules endothéliales que les globules blancs sains [124]. De plus les SRBCs interagiraient plutôt avec les globules blancs adhérents que directement avec l'endothélium [125]. Des études cliniques font le lien entre un nombre élevé de globules blancs et la sévérité de la pathologie [126].

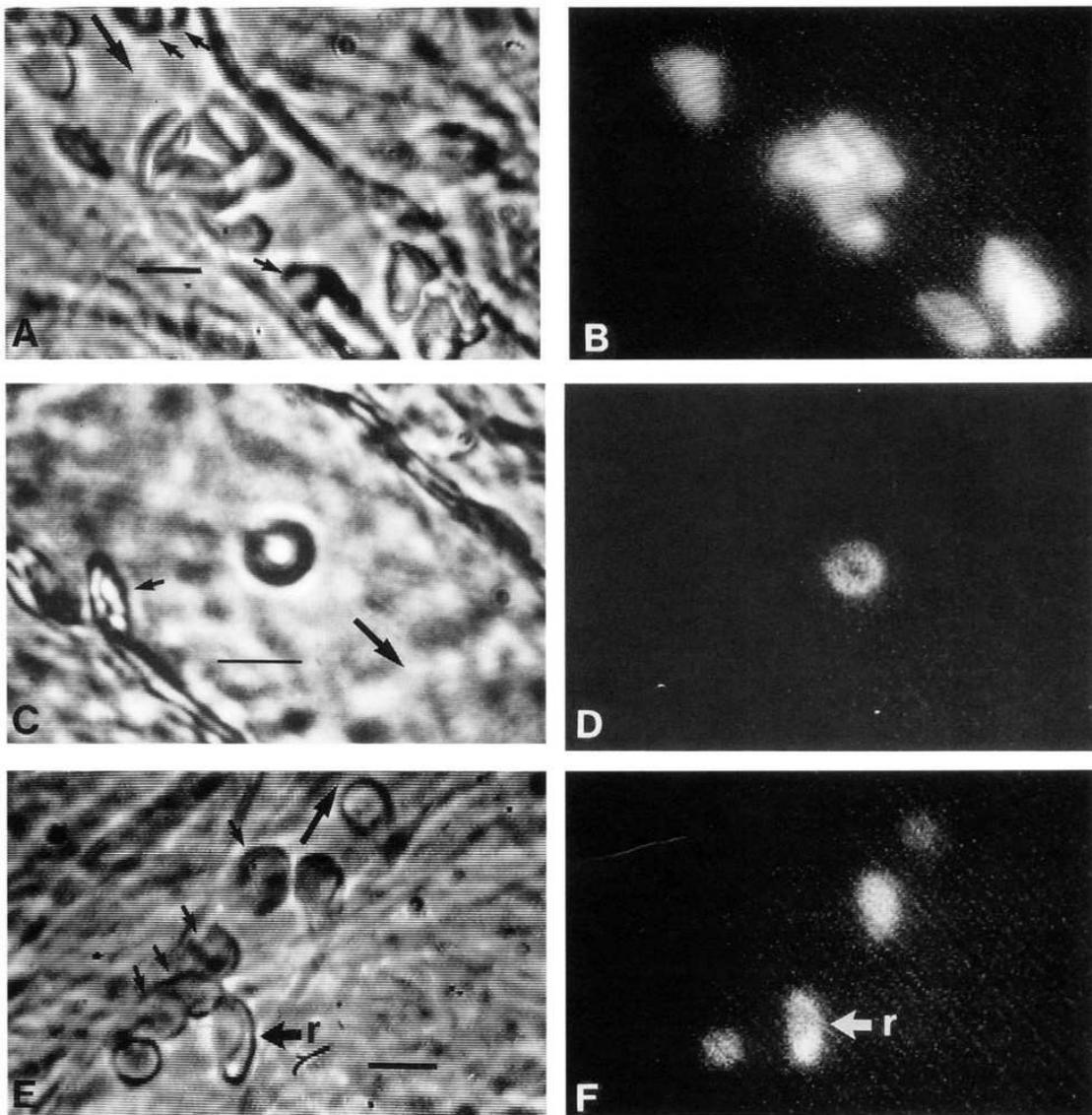


FIG. 4.28: Illustration de l'effet de la densité sur l'adhérence des SRBCs sur l'endothélium. (A et B) Mélange 1:1 de SRBCs discocytes (marqués FITC) et SRBCs discocytes déshydratés, le sens du flux est indiqué par la grosse flèche. En A des globules sont adhérents; en B le même champ que A éclairé en épifluorescence montre que la majorité des globules adhérents sont les discocytes non déshydratés, seuls 3 discocytes déshydratés sont adhérents (repérés par des petites flèches en A). (C et D) Mélange 1:1 de SRBCs discocytes déshydratés (marqués FITC) et de ISC. En C, le globule irréversible est reconnaissable à sa forme anormale. En D, le même champ éclairé en épifluorescence permet de repérer un discocyte déshydraté adhérent. (E et F) Mélange 1:1 de ISC artificiellement hydratés (marqués FITC) et de discocytes. En E, huit globules sont adhérents à l'endothélium; en F, le même champ éclairé en épifluorescence montre qu'il y a un nombre identique de ISC hydratés adhérents que de discocytes. (Kaul et al.[123])

4.4.4 Vaso-occlusion: scénarios proposés

Vaso-occlusion rhéologique

La seule étude microfluidique menée dans le but de comprendre la vaso-occlusion à l'échelle de la microcirculation est celle de Higgins et al. [79]. Les auteurs présentent un diagramme de phase décrivant les conditions nécessaires à l'observation de la vaso-occlusion en fonction de la concentration d'oxygène, de la pression pour maintenir l'écoulement et de la largeur des canaux. L'hypothèse retenue est celle du changement rhéologique d'une solution de globules désoxygénés, suffisant pour modifier l'écoulement jusqu'à complètement le stopper (figure 4.29).

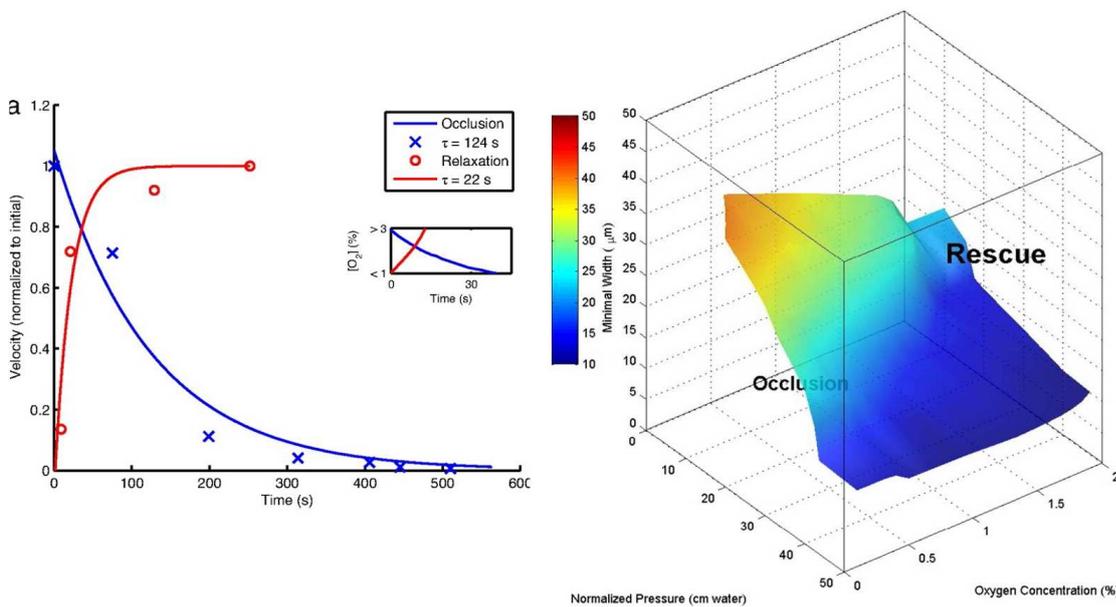


FIG. 4.29: A gauche, profil de vitesse en absence d'oxygène (croix) et lors de la désobstruction (cercle) en présence d'oxygène. A droite, espace des phases de la vaso-occlusion. L'isosurface représente en chaque point les conditions expérimentales nécessaires (pression d'injection, taux d'oxygène et largeur du canal) pour que la vaso-occlusion ait lieu au bout de 500 s. (Higgins et al. [79]).

Leur écoulement consiste en une géométrie branchée avec un canal initial de $250 \mu\text{m}$ de large qui se ramifie successivement en canaux de 60 , 30 , 15 et $7 \mu\text{m}$ de large puis se reconnectent pour aboutir à un canal final de $250 \mu\text{m}$. La vitesse des globules est mesurée au niveau du canal final: en absence d'oxygène, la vitesse diminue jusqu'à s'arrêter complètement pour des temps caractéristiques de 8-10

minutes puis, en présence d'oxygène le flux se remet en écoulement (figure 4.29).

Scénarios multi-étapes et multi-facteurs

Toutes les études récentes présentées précédemment ont permis de mieux comprendre les différents paramètres et mécanismes pouvant entrer en jeu dans la pathophysiologie de la drépanocytose, remettant en cause le paradigme développé depuis les années 1970 consistant à ne considérer que le phénomène de polymérisation intracellulaire comme responsable de l'obstruction stérique des vaisseaux. Robert Hebbel compte parmi les premiers auteurs à avoir listé les différents éléments susceptibles de jouer un rôle, et donné des pistes pour les études à venir [64, 127]. Toutes ces nouvelles données ont favorisé l'élaboration de nouveaux scénarios qui proposent une explication des différentes étapes pouvant conduire à la vaso-occlusion. On peut citer les propositions de Frenette [125], de Kaul et al. [128] ou encore Switzer et al. [81] (figures 4.30, 4.31 et 4.32)

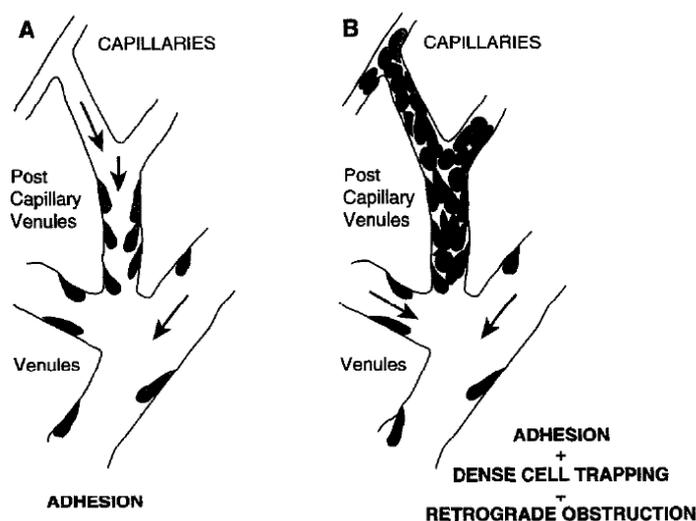


FIG. 4.30: Séquence proposée par Kaul et al. [128], occlusion rétrograde: L'adhésion des globules de densité faible et normale (réticulocytes et discocytes) dans les vénules post capillaires, induit une réduction locale du flux permettant le piégeage des globules de forte densité, en particulier les irréversibles, pouvant mener à la vaso-occlusion.

Le premier scénario proposé (figure 4.30) considère l'adhésion préalable sur les cellules endothéliales des vénules post capillaires, de globules rouges majoritairement de faible densité (concentration corpusculaire d'hémoglobine faible) donc les

plus déformables. L'accumulation de ces globules en adhésion, modifierait suffisamment le flux pour que des globules irréversibles (peu déformables) se retrouvent piégés et obstruent la circulation. Le bouchon se propage de proche en proche en remontant jusqu'au niveau des capillaires.

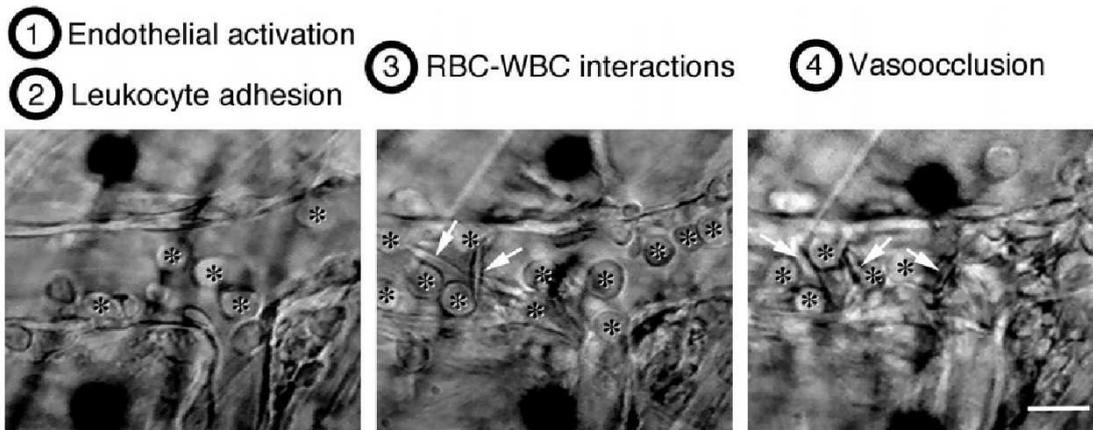


FIG. 4.31: Séquence proposée par Frenette [125], agrégation initiée par les globules blancs. Ecoulement in vivo chez le rat. (1) et (2) Dans les vécules post capillaires les globules blancs adhèrent à l'endothélium. (3) Ces globules blancs interagissent avec les globules rouges, formant des agrégats cellulaires. (4) après injection de TNF-alpha, molécule impliquée dans l'inflammation de l'endothélium, les adhésions globules rouges-globules blancs augmentent réduisant le flux sanguin jusqu'à la vaso-occlusion.

Le second scénario proposé (figure 4.31), résultant d'observations in-vivo chez le rat, envisage le rôle pouvant être joué par les globules blancs. Ceux-ci adhèrent à l'endothélium dans les vécules post-capillaires et interagissent avec les globules rouges pour former des agrégats cellulaires. L'état inflammatoire, caractéristique de la drépanocytose, promeut l'adhésion globules blancs-endothélium mais également l'adhésion globules blancs-globules rouges. La formation d'agrégats cellulaires pouvant aller jusqu'à la vaso-occlusion par accumulation.

Enfin, le dernier scénario, multifacteurs (figure 4.32), imaginé à partir de nombreuses observations indépendantes, est le plus complexe et fait intervenir l'HbS libre en solution. L'adhésion des globules rouges sur les cellules endothéliales et la plus forte concentration d'HbS libre dans le plasma sanguin, sont responsables d'un état inflammatoire qui favorise l'adhésion de globules blancs ainsi que l'agrégation de plaquettes. De plus l'hémoglobine libre en solution fixe le monoxyde d'azote qui joue un rôle de vasodilatateur [129]. La sécrétion par l'endothélium vasculaire de l'endothéline, stimulant de la prolifération cellulaire, de l'inflammation et ayant

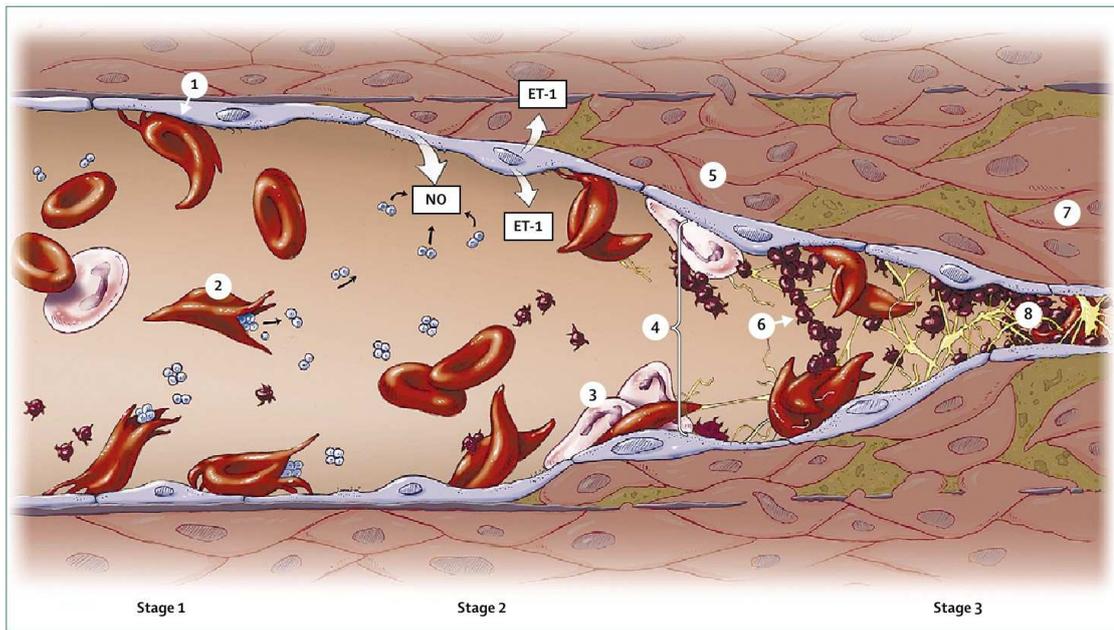


FIG. 4.32: Séquence proposée par Switzer et al. [81]: La vaso-occlusion, processus multi-facteurs. L'adhérence des SRBCs sur l'endothelium (1) et l'hémolyse plus importante des SRBCs du fait de la fragilité de leur membrane (2), induisent un état inflammatoire qui se caractérise par l'adhésion de globules blancs (3) et l'agrégation de plaquettes (6). La fixation du monoxyde d'azote (molécule vasodilatatrice) par l'hémoglobine en solution et l'augmentation de la concentration d'endothéline (molécule vasoconstrictrice) résulte en la vasoconstriction de l'artère (4) et la prolifération de cellules (5), pouvant mener jusqu'à la vaso-occlusion (8)

des effets vasoconstricteurs, diminue le diamètre du vaisseau sanguin. Tous ces effets combinés (adhésion, inflammation, vasoconstriction) pourraient mener jusqu'à la vaso-occlusion.

Chapitre 5

Techniques expérimentales

Dans ce chapitre, nous décrivons d'abord les précautions pour la conservation des échantillons sanguins ainsi que le protocole pour la séparation des globules rouges sur gradient de densité. Dans un second temps, nous décrivons les différentes étapes nécessaires pour la conception des puces microfluidiques. Nous terminons par les différentes stratégies pour désoxygéner les globules.

5.1 Echantillons sanguins

Les échantillons sanguins proviennent du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint Eloi de Montpellier. Pour chaque tubes, la concentration globulaire moyenne d'hémoglobine (CGMH) ainsi que le pourcentage d'hémoglobine S est déterminé par le laboratoire d'hématologie. Dès réception, les globules rouges sont lavés par centrifugations successives dans une solution de phosphate buffered saline (PBS) et 5 mM glucose ajustée à 300 mosm. Resuspendus à 50 % d'hématocrite, les échantillons sont utilisés au plus tard une semaine après prélèvement.

5.2 Purification de l'hémoglobine

L'hémoglobine est extraite des globules rouges afin de l'encapsuler dans les vésicules, permettant ainsi l'obtention d'objets modèles contrôlés en taille et en contenu. La purification de l'hémoglobine se fait en deux étapes principales que sont la lyse des globules rouges dans un premier temps puis la filtration afin de reconcentrer l'hémoglobine.

A partir d'un échantillon préparé comme décrit précédemment, 500 μ l de culot (hématocrite \simeq 100%) sont prélevés et mélangés à 1.5 ml d'eau désionisée. Sous l'effet du choc osmotique les globules rouges éclatent, libérant ainsi l'hémoglobine en solution. Après 20 minutes, le mélange est centrifugé à 15000 g pendant 20

minutes, les membranes sédimentent et le surnageant est récupéré. Pour reconcentrer l'hémoglobine, nous utilisons des tubes de filtration Millipore de 3 kDa (amicon ultra 0,5ml 3k). Les tubes sont préalablement rincés, pour cela 500 μ l d'eau désionisée sont introduits dans le compartiment de filtrage puis centrifugés à 15000 g pendant 20 minutes, l'eau passe alors à travers la membrane de filtration puis est récupérée dans la deuxième partie du tube. Enfin 500 μ l de la solution d'hémoglobine diluée sont centrifugés à 15000 g, après 20 minutes l'hémoglobine concentrée est récupérée dans le compartiment de filtration.

5.3 Tri des globules par densité

Pour séparer les globules en différentes fractions suivant leur densité (et donc en fonction de la concentration en hémoglobine), nous effectuons un gradient de densité sur du Percoll[®] (sigma #77237) : une solution colloïdale de particules de silice de 15 à 30 nm recouvertes par une couche monoatomique de polyvinylpyrrolidone, non toxique pour les objets biologiques. Préparer une solution de densité d et d'osmolarité 300 mosm nécessite un mélange de Percoll[®], d'eau désionisée et de chlorure de sodium à 1,5 M pour ajuster la pression osmotique. Le calcul des proportions de chaque constituant se fait à partir de la formule suivante¹:

$$V_o = V \frac{d - 1/11 \times 1,058 - (1 - 1/11)}{1,13 - 1}, \quad (5.1)$$

où V_o est le volume de Percoll[®] non dilué, V le volume total final, d la densité désirée, $1/11$ est la fraction du volume total en solution de chlorure de sodium concentré à 1,5 M et de densité 1,058, enfin 1,13 est la densité de la solution mère de Percoll[®]. On complète alors avec de l'eau désionisée pour arriver au volume final V .

Le choix d'un gradient discontinu est dicté par le souhait de séparer les globules rouges en quatre fractions principales comme décrit dans Corbett et al. [65]. Cinq solutions de densités respectives 1,085, 1,092, 1,101, 1,107 et 1,122 sont alors préparées. Dans un tube à centrifuger de 15 ml, 2 ml de chacune de ces solutions sont déposés successivement avec une seringue le plus délicatement possible pour prévenir tout mélange entre deux couches et obtenir des séparations nettes. Pour finir, 2 ml de sang lavé à 50 % d'hématocrite sont déposés sur le dessus et le tout est centrifugé à 4000 g pendant une heure. Après centrifugation nous obtenons quatre bandes de sang bien définies (voir figure 5.1), chacune de ces couches est prélevée avec une micropipette puis lavée trois fois dans une solution de PBS plus 5 mM de glucose ajusté à 300 mosm pour éliminer le Percoll[®].

¹Cell separation media: methodology and applications, GE Healthcare, 2007

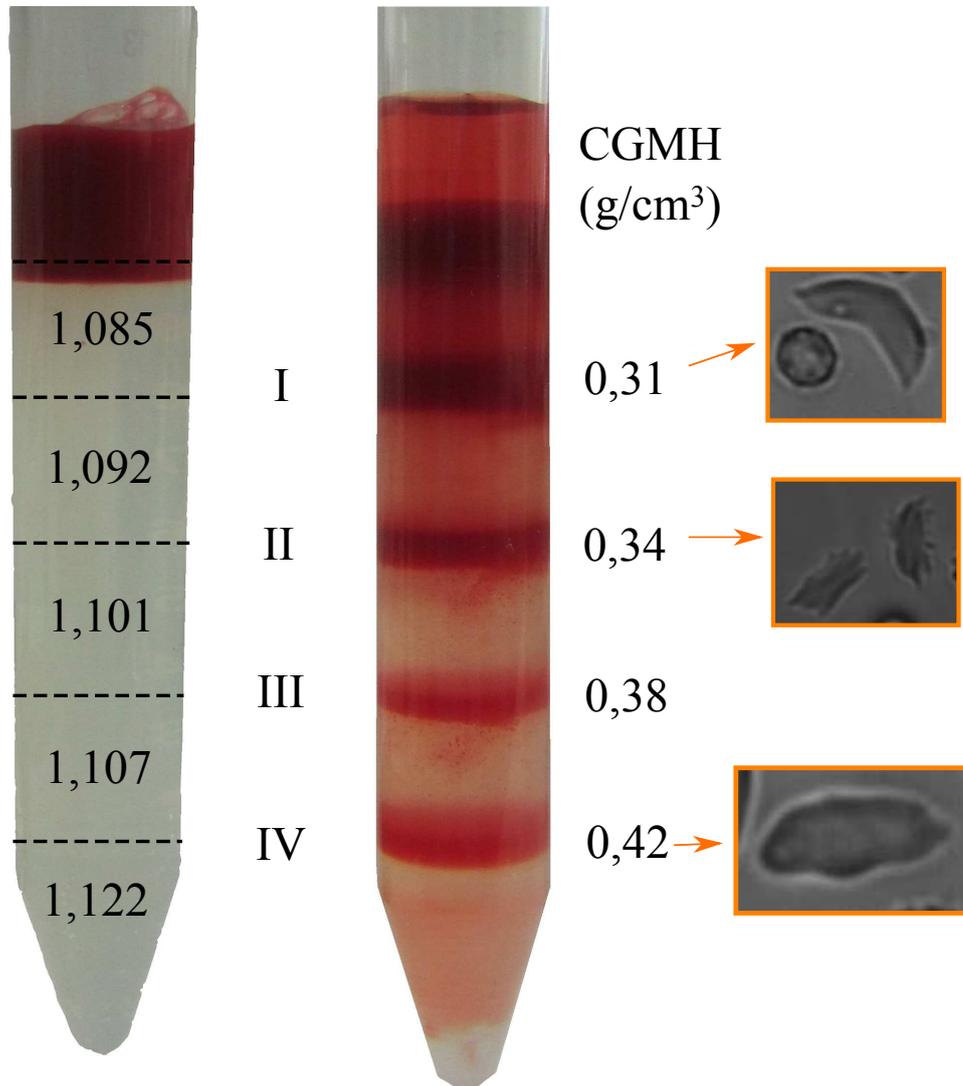


FIG. 5.1: Gradient de densité avant (gauche) et après centrifugation (droite), les bandes de sang se sont formées aux interfaces des couches de Percoll[®]. La fraction la moins dense I contient en majorité les globules qui se déformeront en faucille, la fraction II est constituée de globules qui donneront les sphérulites et plus généralement ceux dont la polymérisation sera hétérogène, la fraction III est une fraction intermédiaire et la fraction IV la plus dense contient en majorité les irréversibles. Les correspondances densité-concentration d'hémoglobine sont tirées de [65]

5.4 Microfluidique

5.4.1 Généralités à propos de la lithographie

La conception des puces microfluidiques commence par le dessin des canaux à l'aide d'un logiciel de conception assisté par ordinateur que l'on fait ensuite imprimer soit sur un film plastique pour des structures géométriques supérieures à $10\mu m$ (impression à 25000 dpi, Outputcity), soit sur des plaques de quartz par dépôt de chrome pour des éléments de plus grande finesse. La réalisation des canaux sur wafer de silicium a lieu en salle blanche afin de se protéger de la poussière, le processus de fabrication demande de suivre un certain nombre d'étapes détaillées ci-après.

- dépôt d'une couche de résine photosensible sur le wafer de silicium
- une première cuisson pour durcir la résine
- insolation aux UV de la résine à travers le masque
- un recuit pour finir de durcir la résine
- passage dans un bain de développeur pour dissoudre la résine non polymérisée
- rinçage au fixateur

La première étape consiste à déposer une couche de résine photosensible sur le wafer de silicium (figure 5.2a). La société MicroChem propose toute une gamme de résines de différentes viscosités, utilisées suivant l'épaisseur que l'on souhaite atteindre. On retiendra la SU8-2025 pour la confection de canaux de $30\mu m$ d'épaisseur destinés à l'étude de la circulation à grande échelle. Etaler à la tournette à la vitesse de 3000 tours par minute pendant 30 secondes quelques millilitres de résine sur le wafer permet d'obtenir une couche homogène de la hauteur souhaitée.

Une première cuisson permet de durcir la résine: 2 minutes à $65^\circ C$ suivi de 5 minutes à $95^\circ C$ pour l'épaisseur de $30\mu m$. La succession de $65^\circ C$ et $95^\circ C$ permet une montée en température plus douce afin de minimiser les contraintes dans le matériau.

La résine est alors insolée aux UV à travers le masque sur lequel sont dessinés les canaux, les parties non masquées polymérisent (figure 5.2b). Le dosage de l'énergie est important; une trop longue exposition résulte en des murs obliques tandis que dans le cas contraire les canaux n'adhèrent pas au wafer. Après une série d'essais, 210 mJ/cm^2 pour une épaisseur de $30\mu m$ donnent des résultats convenables.

Une fois l'insolation effectuée, le wafer est directement placé sur plaque chauffante pour finir de durcir la résine: 1 minute à $65^\circ C$ suivi de 5 minutes à $95^\circ C$ pour $30\mu m$.

L'étape de développement permet de dissoudre la résine non polymérisée, le wafer est plongé dans un bain de développeur vendu par MicroChem durant 4-5 minutes (figure 5.2d). Agiter le wafer dans le bain permet d'aider le développement des structures les plus confinées.

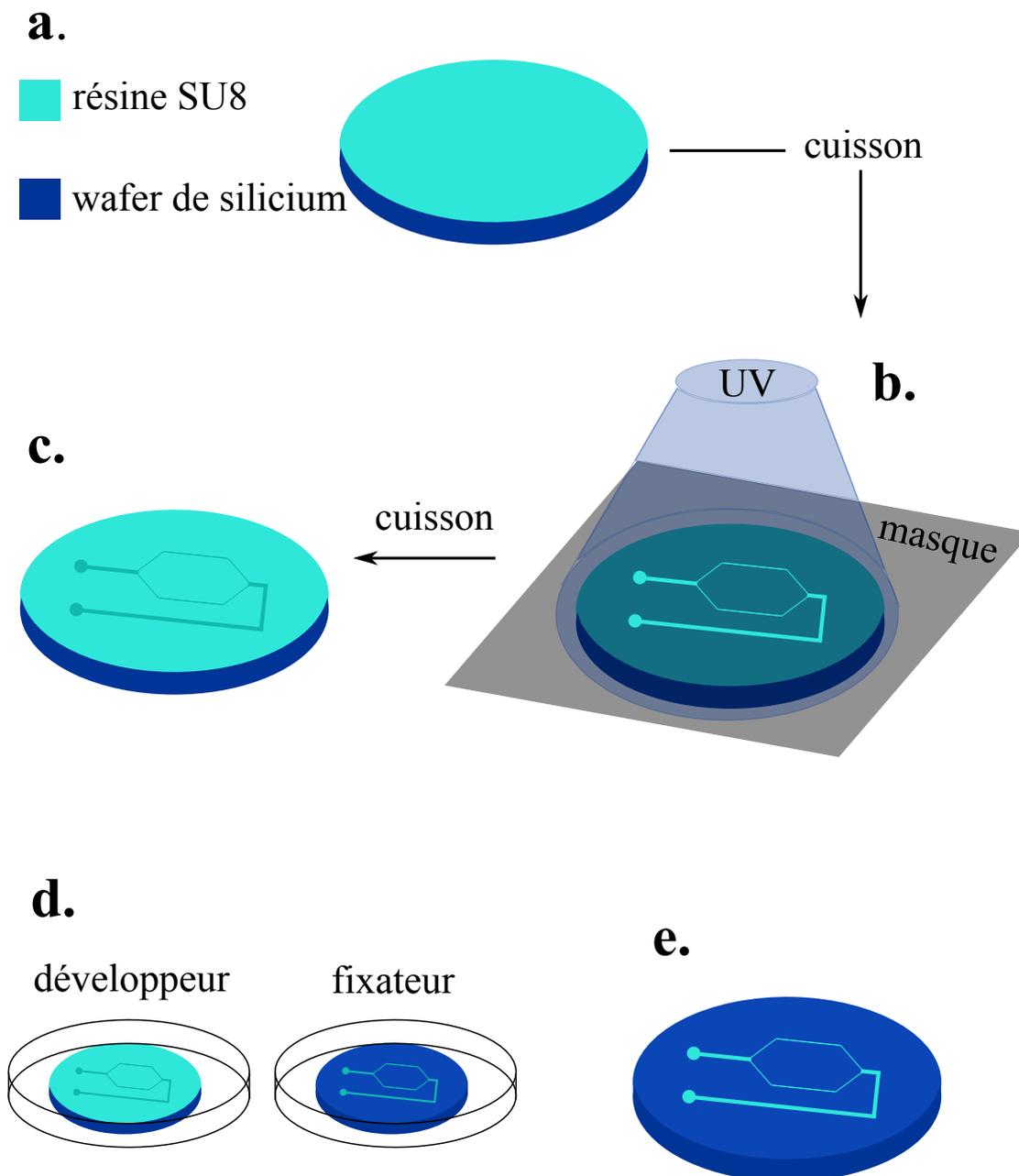


FIG. 5.2: **a.** Couche de résine SU8 déposée par spin coating sur un wafer de silicium. **b.** Après une première cuisson pour durcir la résine, exposition au UV de la résine à travers le masque sur lequel sont dessinés les canaux. **c.** Après un recuit, on voit apparaître les canaux sur la résine. **d.** Passage dans un premier bain de développeur pour éliminer la résine non exposée, puis dans un second bain de fixateur. **e.** Au final on obtient les canaux sur le wafer de silicium.

Pour finir, un rinçage à l'isopropanol permet d'arrêter le développement et de fixer la résine polymérisée et après un séchage à l'azote, on vérifie la qualité des canaux sous microscope.

5.4.2 Construction des canaux en résine photosensible

L'utilisation de la colle NOA81 (Norland) pour la confection des canaux microfluidiques se justifie par le besoin d'obtenir un matériau étanche aux gaz. De plus elle présente de bonnes qualités optiques en faisant ainsi la candidate idéale pour notre application. La mise en œuvre avec cette colle n'est pas aussi directe que dans le cas traditionnel du polydiméthylsiloxane (PDMS); dénommée microfluidic stickers cette élégante technique à été développée par Denis Bartolo et al. [130] en 2008.

En premier lieu, l'étape de lithographie précédemment décrite est effectuée, les canaux devant apparaître en creux dans la résine SU8. Du PDMS liquide (sylgard 184) est versé sur les canaux, dégazé puis cuit à 70°C pendant une heure. Une fois réticulé le PDMS est démoulé et les canaux apparaissent alors en positif, ce pavé de PDMS constitue le moule initial pour la fabrication des canaux en colle.

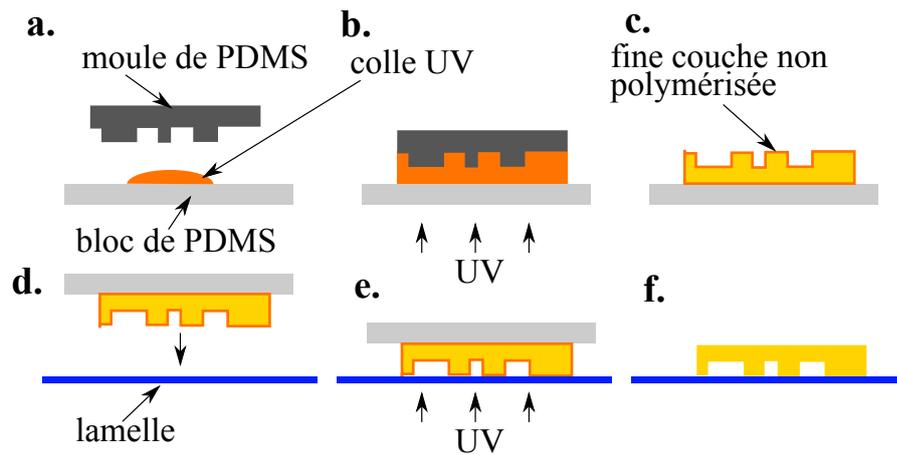


FIG. 5.3: **a.** La colle est déposée sur le bloc de PDMS plat et le moule est posé par dessus. **b.** Insolation aux UV pendant trois minutes. **c.** Le moule de PDMS est retiré, laissant apparaître une fine couche de colle non polymérisée. **d.** Le tout est collé contre une lamelle de verre. **e.** Insolation aux UV pour polymériser la fine couche de colle en contact avec le verre. **f.** Le bloc de PDMS est finalement retiré.

Un bloc de PDMS plat est utilisé comme substrat et des calles en PET de 250 μm d'épaisseur sont disposées sur le pourtour. De la colle NOA81 est versée sur cette surface puis le moule de PDMS est déposé délicatement, pour éviter la

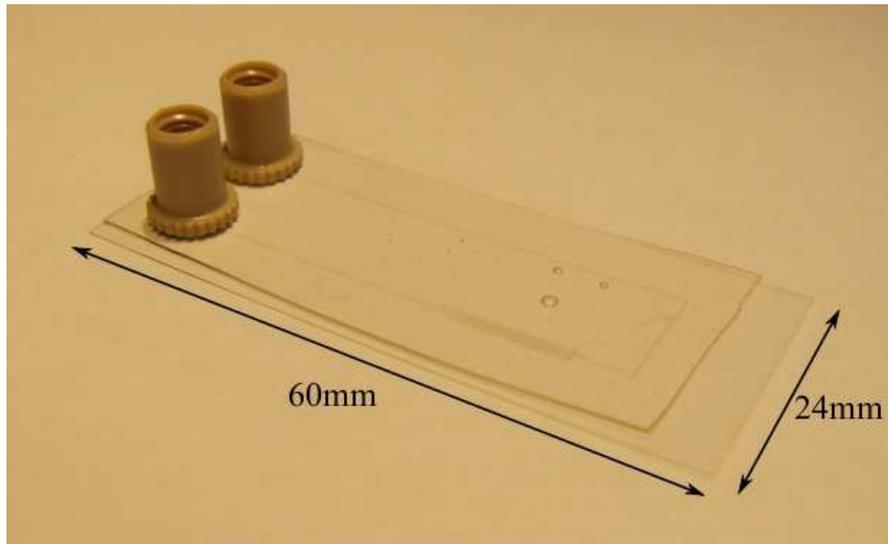


FIG. 5.4: Canaux en polymère photosensible collés sur une lamelle de verre. Des connectiques NanoPort de chez Upchurch scientific sont utilisées pour l'entrée et la sortie

formation de bulles d'air, face canaux sur la colle. On a ainsi une couche de colle d'épaisseur contrôlée de $250 \mu m$ prise entre deux blocs de PDMS, le tout est insolé aux UV pendant trois minutes pour faire polymériser la colle. A l'interface colle-PDMS, la porosité du PDMS à l'oxygène, inhibiteur de la polymérisation, laisse une fine couche de quelques centaines de nanomètre de colle non polymérisée. Le moule de PDMS sur la face supérieure peut donc être retiré, laissant apparaître les canaux dans la colle; les trous dans la colle pour effectuer la future connectique sont réalisés à ce stade à l'aide d'un emporte pièce de 1 mm de diamètre (dans notre cas un trépan à biopsie).

La phase finale consiste à coller sur une lamelle de verre préalablement traitée au plasma d'oxygène, la face encore collante comportant les canaux. Après une exposition supplémentaire de 15 minutes aux UV pour finir de polymériser la colle, le substrat de PDMS peut être retiré et la puce microfluidique ainsi obtenue est laissée une nuit à $70^\circ C$ pour consolider les propriétés mécaniques de la colle.

La connectique doit être la moins poreuse possible au gaz, les tubes et connecteurs fabriqués en polyétheréthercétone (Upchurch Scientific) répondent à ce critère. Les connecteurs sont collés sur la puce avec de la NOA81.

5.4.3 Construction des canaux en PDMS

Le PDMS étant poreux à l'oxygène [131], la méthode retenue pour contrôler le taux d'oxygène consiste à superposer deux réseaux de canaux: le premier comportant les canaux pour faire circuler les globules rouges et, collé dessus, le second dans lequel est injecté le gaz ou mélange gazeux souhaité. La géométrie est la suivante: après l'injection le fluide passe par "la chambre de désoxygénation", une section longue de 2 cm et large de 4 mm soutenue par de nombreux plots pour éviter un effondrement, puis par une série de seize canaux en parallèle long de 1 cm et large de $30 \mu m$. Le canal de gaz se compose d'un unique serpentin de $500 \mu m$ de large et $80 \mu m$ de haut couvrant toute la surface de la puce (voir figure 5.5).

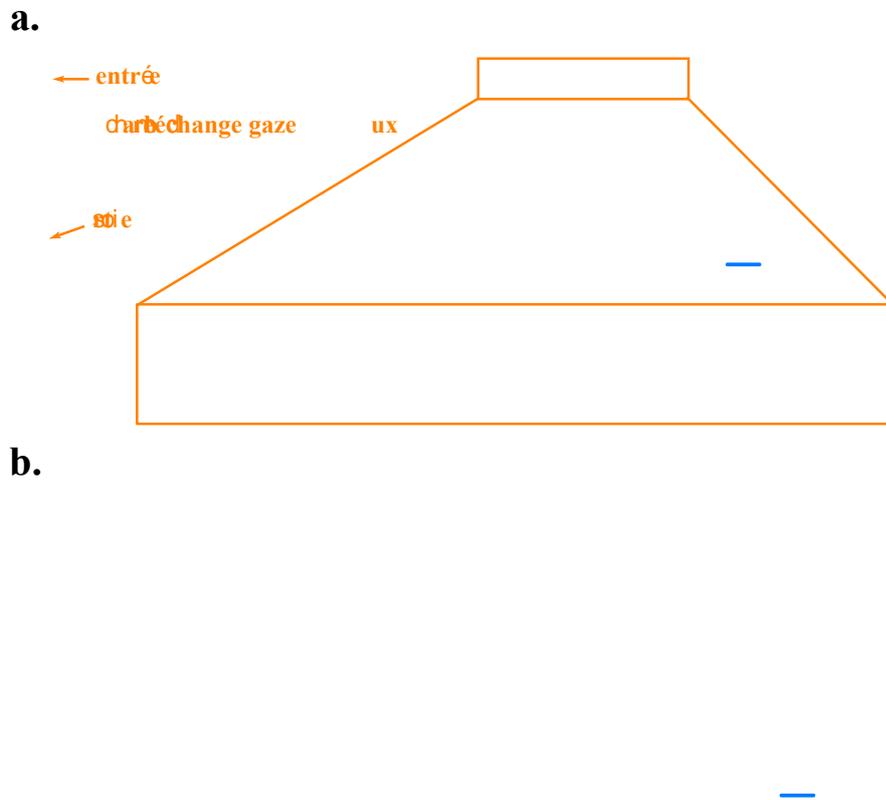


FIG. 5.5: **a.** Géométrie du masque des canaux pour la circulation des globules rouges, l'échange gazeux à lieu dans la chambre de désoxygénation. Dans le cadre, zoom de la partie comprenant les canaux de $30 \mu m$. Les plots assurent le bon maintien du PDMS. **b.** Masque pour la fabrication du canal de gaz superposé sur les canaux de circulation des globules. L'échelle en bleu représente 2 mm

Pour la confection de cette puce, les deux écoulements sont moulés séparément. La partie pour les globules rouges devant être fine afin de favoriser les échanges gazeux, on étale à la tournette du PDMS (sylgard 184) sur le wafer à 1000 trs/min pendant 30s ce qui permet d'atteindre une épaisseur d'environ $60\ \mu\text{m}$. Le canal de gaz est quant à lui moulé dans une épaisseur de 5 mm. Le PDMS est ensuite réticulé en le faisant cuire à 70°C pendant une heure. Une fois à température ambiante la membrane de $60\ \mu\text{m}$ est délicatement décollée puis transférée sur une surface plastique qui n'adhère pas au PDMS. Le canal de gaz est lui aussi décollé et l'on perce les trous d'entrée et sortie du gaz. On traite alors au plasma la face contenant le canal de gaz pendant 30s ainsi que le dessus de la membrane pendant moins d'une seconde, on dépose alors le canal de gaz sur la membrane qui grâce au traitement plasma adhèrent ensemble. On décolle facilement les deux épaisseurs de la surface plastique et l'on perce les trous pour l'injection et l'évacuation des globules. La surface de la membrane contenant les canaux est à son tour traitée au plasma moins d'une seconde puis le tout est collée sur une lamelle de verre préalablement nettoyée à l'acide sulfochromique et traité 30s au plasma. La puce ainsi obtenue est laissée à 70°C pendant au minimum une heure pour finaliser les liaisons Si-O-Si. La modification induite par le traitement plasma, de la surface du PDMS, rend celui ci plus imperméable à l'oxygène [131]; pour cette raison le traitement de la membrane est réduit au minimum de temps.

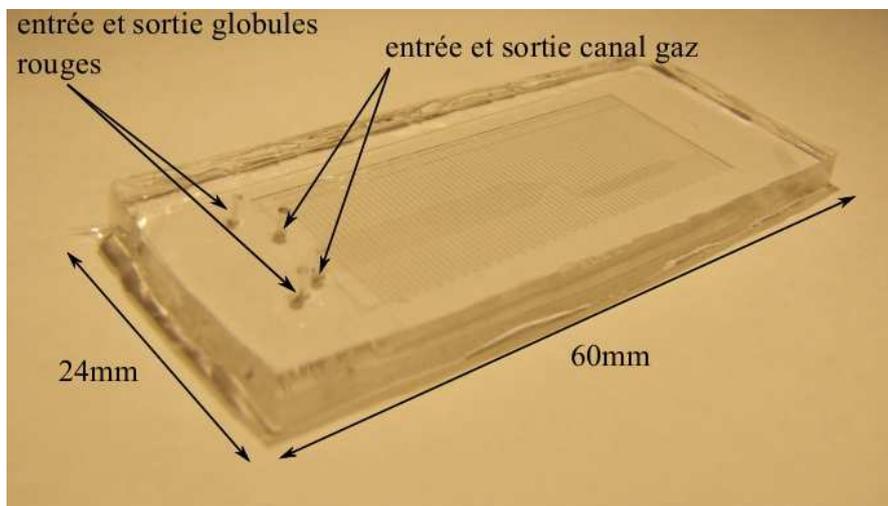


FIG. 5.6: Puce confectionnée en PDMS, les deux réseaux d'écoulement pour les globules et le gaz sont superposés et collés sur une lamelle de verre.

5.4.4 Désoxygénation

Pour optimiser le taux d'échange gazeux dans les puces en PDMS, la surface d'échange doit être la plus importante possible et l'épaisseur de PDMS séparant le liquide du gaz, fine. Les canaux ayant une hauteur de $30 \mu m$, l'épaisseur de la membrane séparant l'écoulement des globules du canal de gaz est d'environ $30 \mu m$. Avant d'injecter la solution de globules, on laisse circuler le gaz pendant 30 minutes afin de saturer le PDMS. Ce dispositif permet de désoxygéner les globules sous cisaillement.

Dans les puces en colle NOA, la désoxygénation se fait en statique: on injecte le gaz par la connectique de sortie de la puce, le gaz circule dans l'écoulement purgeant par la même occasion la puce, ressort par l'entrée et fini par buller dans la chambre de pressurisation où sont stockés les globules. On laisse le gaz circuler pendant 30 minutes avant d'inverser la différence de pression pour mettre en écoulement les globules.

Chapitre 6

Drépanocytose: une étude microfluidique de la vaso-occlusion

Dans ce chapitre, nous rapportons les observations effectuées lors de l'écoulement de globules drépanocytaires dans les canaux microfluidiques. Ensuite, nous discutons ces observations dans le contexte des études déjà réalisées et précisons quels sont, selon nous, les paramètres importants qui pourraient jouer un rôle dans la vaso-occlusion.

6.1 Dispositif expérimental

L'observation des globules en écoulement dans les puces microfluidiques s'accomplit sous microscope, la température autour de la puce étant maintenue à 37°C par un flux d'air chaud. Les puces en PDMS comprennent quatre entrées-sorties desservant le circuit de gaz et les microcanaux pour l'écoulement des globules. Le canal de gaz est alimenté directement à partir d'un contrôleur de pression (Fluigent) et les globules sont injectés via une chambre de pressurisation.

Les globules rouges sont suspendus à 25 % d'hématocrite (fraction volumique) dans une solution de PBS + 5 mM de glucose ajustée à 300 mosm. Sauf cas contraire clairement explicité, les globules rouges utilisés proviennent de la fraction n°2 du gradient de densité. D'une concentration moyenne de 0,34 g/cm³ en hémoglobine, ces globules une fois désoxygénés statiquement, adoptent en majorité des formes en « faucille » et en « feuille d'érable » (nucléation hétérogène).

La géométrie de l'écoulement a déjà été décrite dans le chapitre « Techniques expérimentales ». Brièvement, les globules circulent d'abord dans une section longue de 2 cm et large de 4 mm qui permet d'effectuer l'échange gazeux. La partie cen-

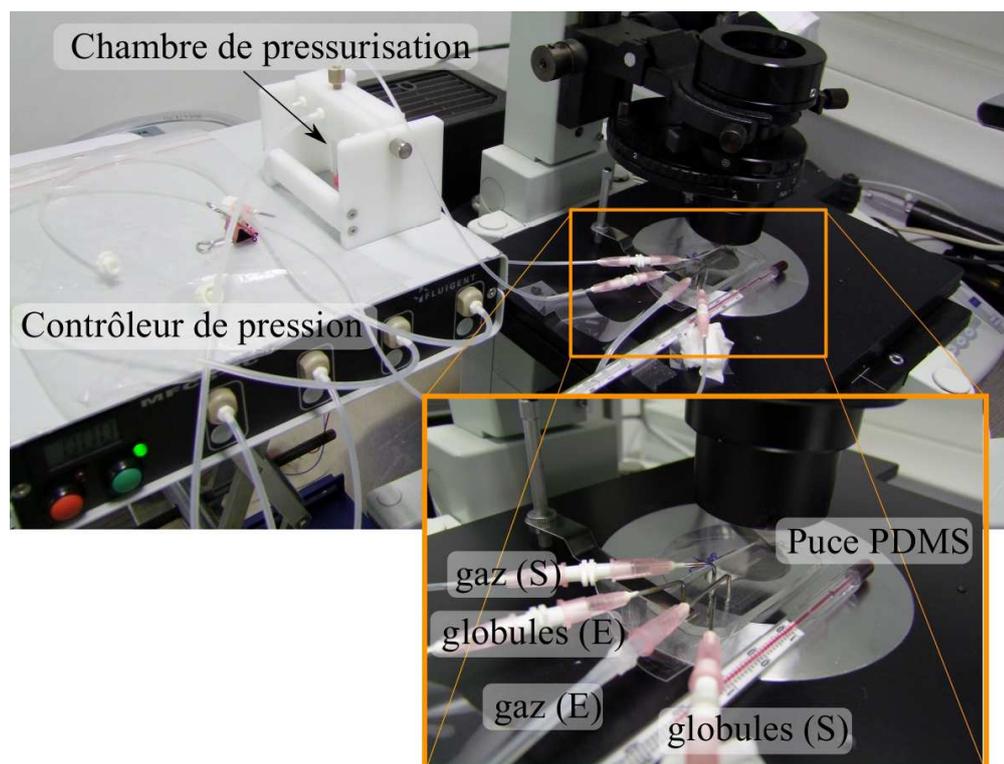


FIG. 6.1: Dispositif expérimental: la puce microfluidique, fixée sur la platine du microscope, comporte quatre connectiques d'entrée (E)-sortie (S). La solution de globules est injectée à partir de la chambre de pressurisation, elle même reliée au contrôleur de pression. Le canal de gaz est alimenté en azote directement à partir du contrôleur de pression.

trale de l'écoulement consiste en 15 canaux parallèles long de 1 cm et large de $30 \mu\text{m}$. Ces canaux sont précédés et suivis par une section longue de 1 mm et contenant un réseau de plots triangulaires de $60 \mu\text{m}$ d'arête dont la fonction est d'éviter l'effondrement de la surface supérieure sur la lamelle de verre, l'épaisseur des canaux mesurant seulement $30 \mu\text{m}$.

Les canaux ont été conçus de façon à recréer un écoulement proche des conditions d'hématocrite et de vitesse de la microcirculation. Les vitesses caractéristiques des globules rouges dans les canaux de $30 \mu\text{m}$ sont de l'ordre $0,8\text{-}2 \text{ mm/s}$ pour mimer la circulation dans les veinules post-capillaire. Au niveau du réseau de plots triangulaires, les vitesses sont de l'ordre de $100\text{-}300 \mu\text{m/s}$ comme pour un écoulement dans les capillaires sanguins.

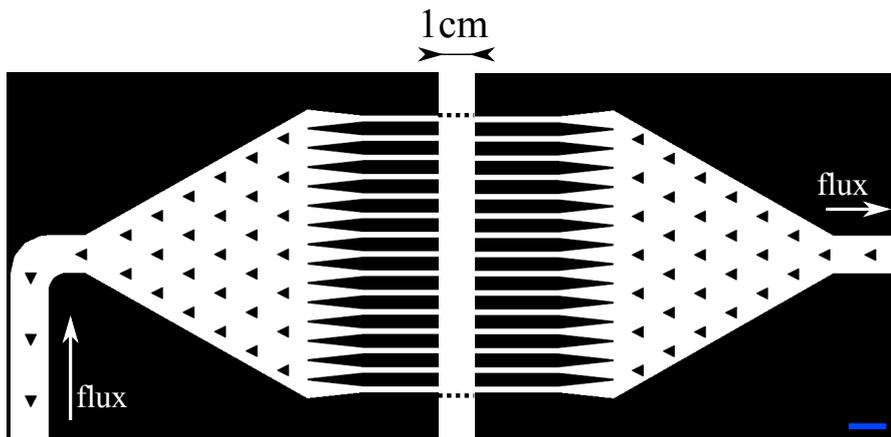


FIG. 6.2: Géométrie de la partie centrale de l'écoulement pour les globules. La partie gauche est reliée à l'échangeur de gaz et la partie droite à la sortie. La répartition de l'écoulement entre les 15 canaux de $30 \mu m$ se fait à partir de la section précédente en forme d'entonnoir et longue de 1 mm. Les plot triangulaires préviennent l'effondrement de la structure. La même géométrie est utilisée à la sortie des canaux pour canaliser le flux vers la sortie. L'échelle représente $200 \mu m$.

6.2 Forme des globules rouges drépanocytaires sous écoulement

La représentation de globules drépanocytaires polymérisés en forme de faucille, majoritaires dans la microcirculation, et responsables d'une obstruction stérique n'est pas fidèle à un écoulement physiologique. La comparaison que nous avons réalisée entre un écoulement de globules désoxygénés préalablement à la mise en écoulement et des globules désoxygénés durant leur écoulement, illustre bien la différence de morphologie des globules lorsque la désoxygénation des globules s'effectue sous cisaillement (figure 6.3). Lorsque les globules sont désoxygénés au repos, l'hémoglobine S polymérise et forme de longues fibres qui déforment les globules. Une fois en écoulement ces globules gardent leur forme allongée (figure 6.3a). Au contraire, lorsque les globules sont désoxygénés sous cisaillement durant leur écoulement, les formes en faucilles sont rares et la très grande majorité des globules garde une forme discocyte avec un aspect « grumeleux » pour certains (figure 6.3b). Les images provenant d'études *in vivo* [123, 125] montrent bien que les globules possèdent dans leur très grande majorité une forme discocyte et seuls quelques rares globules présentent la forme en faucille. Ce qui n'exclut pas que des globules fortement déformés se retrouvent piégés dans un bouchon mais ce n'est pas le passage d'un flux de globules en faucille s'enchevêtrant qui est à l'origine

de la vaso-occlusion. D'ailleurs lorsque nous avons fait circuler une telle solution de globules dans des canaux de $30\ \mu\text{m}$, à aucun moment nous n'avons observé la formation de bouchons. Dans la suite de notre étude nous utiliserons donc les puces microfluidiques à deux niveaux qui permettent de désoxygéner les globules au cours de leur écoulement dans les canaux.

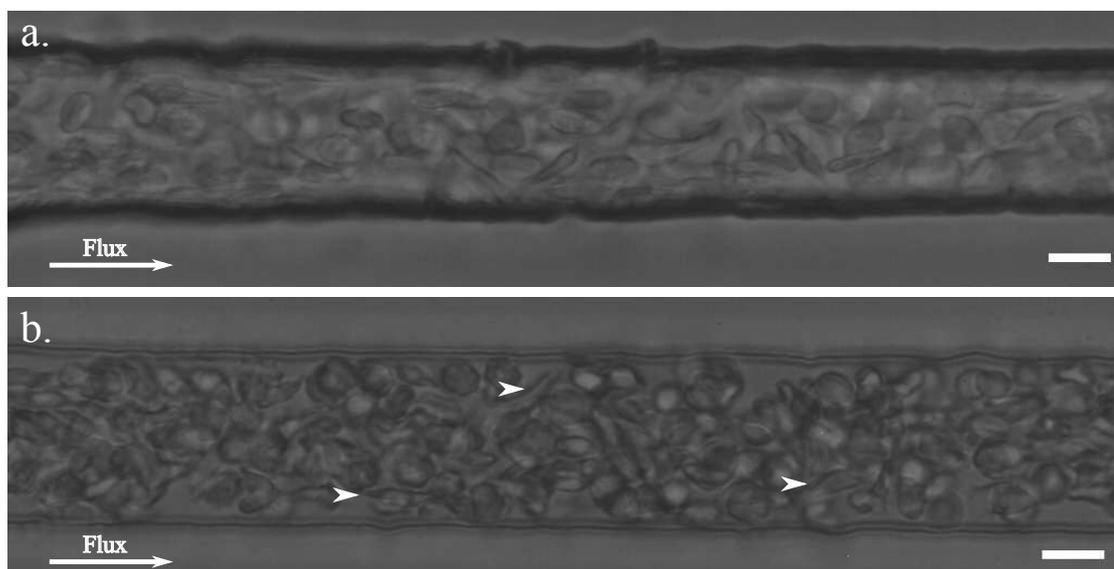


FIG. 6.3: Globules drépanocytaires (fraction 2, échantillon global 79,7% d'HbS) en écoulement dans des canaux à un hématoците de 25%. **a.** Les globules ont été désoxygénés préalablement à leur mise en écoulement: on observe la présence de très nombreux globules adoptant la forme caractéristique en faucille. **b.** Les globules sont désoxygénés durant leur écoulement: les formes en faucille sont rares (indiqué par les flèches). L'échelle représente $10\ \mu\text{m}$

6.3 Formation d'agrégats cellulaires dans des canaux microfluidiques

L'idée initiale était de vérifier si le changement de la rhéologie de globules drépanocytaires désoxygénés était suffisante pour initier la vaso-occlusion. Mais, l'observation de la formation d'agrégats à certains endroits de l'écoulement nous a amené à s'intéresser de plus près à ces structures.

Lors de l'écoulement de globules drépanocytaires, des agrégats se forment à partir des plots triangulaires de soutènement. Pour déterminer les facteurs pouvant favoriser cette agrégation nous avons fait varier plusieurs paramètres comme

le nombre de globules blancs, la présence d'hémoglobine libre S ou A en solution. Dans chaque cas, nous avons également réalisé l'expérience avec des globules sains comme témoins. Les schémas de la figure 6.4 récapitulent les différents cas rencontrés. Afin de comparer les différentes structures, nous avons mesuré la longueur de ces agrégats au cours du temps, en prenant comme référence la base du plot triangulaire (figure 6.5).

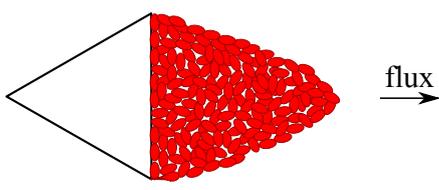
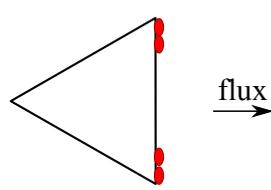
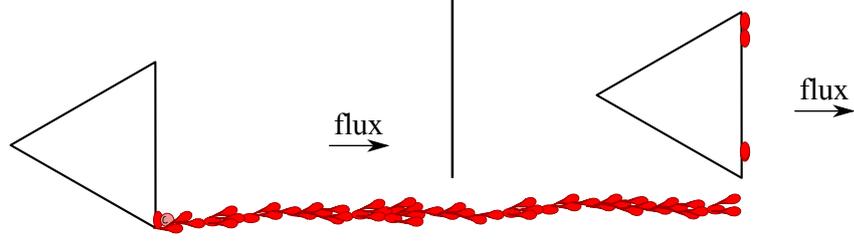
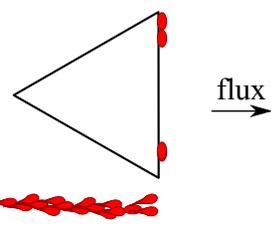
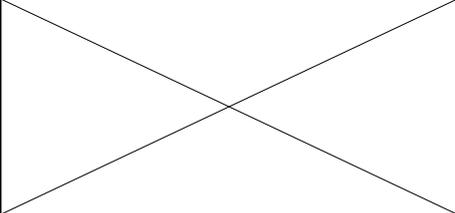
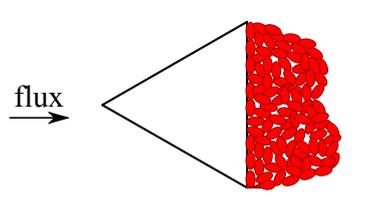
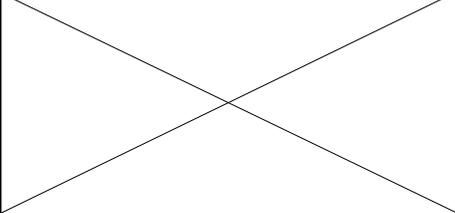
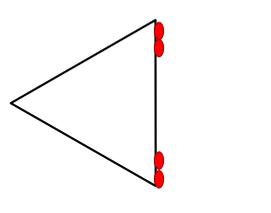
Fraction 2	Globules drépanocytaires	Globules sains
PBS+5mM glucose		
+ ≈0.1% globules blancs		
HbS libre en solution		
HbA libre en solution		

FIG. 6.4: Cartographie des différents types d'agrégats de globules qui se forment durant l'écoulement, le flux se dirige de la gauche vers la droite. Les globules sains ne forment pas d'agrégats sauf lorsque l'on rajoute de l'HbS en solution. Avec des globules drépanocytaires, la morphologie est très dépendante de la présence de globules blancs.

6.3.1 Globules rouges drépanocytaires sous écoulement

Nous avons suivi la formation d'agrégats dans le cas de globules rouges drépanocytaires appartenant à la fraction 2, injectés à 25% d'hématocrite qui correspond à l'hématocrite dans les veinules. Les globules sont désoxygénés durant l'écoulement. La figure 6.5 illustre la morphologie des agrégats au cours du temps et l'évolution de la longueur est reportée sur la figure 6.6. Au départ, seulement deux ou trois globules sont en adhésion derrière le plot (figure 6.5a), et ce pendant les 15 à 20 premières minutes (figure 6.6). Un agrégat se développe à partir de chacun des deux coins du plot comme représenté sur 6.5b. Après une heure d'écoulement les deux se rejoignent pour ne former plus qu'un. Cet agrégat continue de croître pour finalement atteindre une longueur stable pouvant atteindre une cinquantaine de microns (figure 6.5c). De rares globules présentant une déformation importante sont visibles dans les agrégats.

Nous avons également testé le rôle de l'oxygène sur la formation de tels agrégats. En partant de l'agrégat formé en condition désoxygénée, nous injectons de l'air à la place de l'azote dans le canal de gaz. Dans un premier temps l'agrégat change de forme, probablement en raison de la dépolymérisation de l'HbS dans les globules. Une partie des globules se détachent de l'agrégat qui diminue en taille (figure 6.6), puis, l'agrégat se reconstitue jusqu'à recouvrer sa taille précédemment atteinte en absence d'oxygène (figure 6.6). Plus généralement, la présence d'oxygène n'empêche pas la formation d'agrégats dans l'écoulement: même lorsque l'écoulement débute en condition oxygénée, nous observons la croissance d'agrégats. Le caractère adhésif des globules drépanocytaires ne dépend donc pas des conditions d'oxygénation.

La réalisation de la même expérience avec des globules sains de même concentration globulaire moyenne d'hémoglobine, $0,34 \text{ g/cm}^3$ (fraction 2), montre qu'il n'y a pas de formation d'agrégat mais juste 2-3 globules adhésifs au plot de PDMS (figure 6.6). C'est donc bien la nature adhésive des globules drépanocytaires qui est responsable de la formation de ces agrégats.

6.3.2 Rôle de l'hémoglobine S libre en solution

Une des caractéristiques des personnes atteintes de la drépanocytose est la concentration plus élevée d'HbS libre dans le plasma. Cette HbS fixe le monoxyde d'azote, molécule vasodilatatrice, entraînant ainsi la vasoconstriction des vaisseaux sanguins. Nous avons voulu tester si l'HbS libre était aussi un facteur pouvant modifier les propriétés d'adhésion des globules rouges.

Nous avons suivi la formation d'agrégats pour des globules sains suspendus à 25% d'hématocrite dans le surnageant de globules drépanocytaires: après trois-quatre jours de conservation de globules HbS dans du PBS+5 mM glucose, cer-

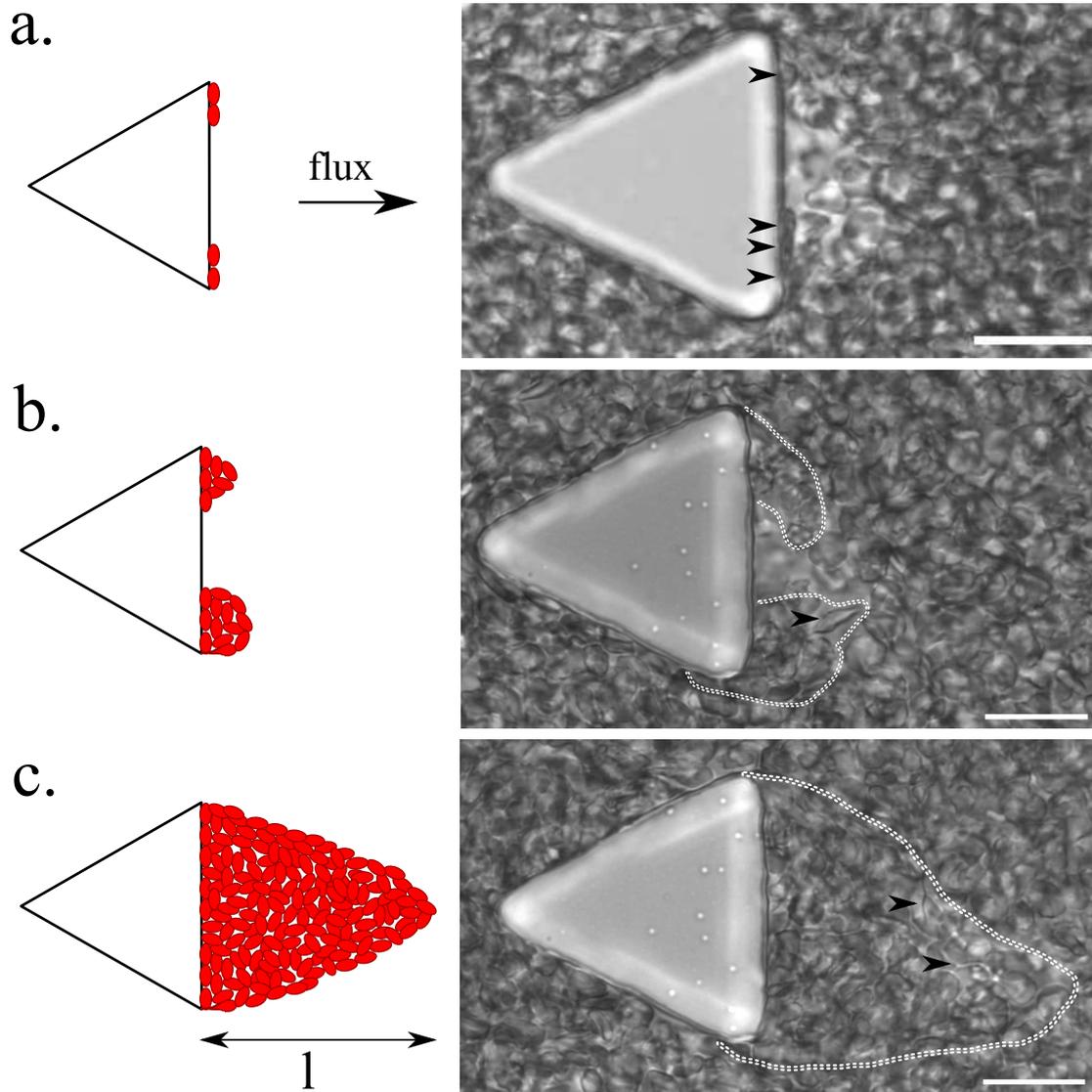


FIG. 6.5: Formation d'un agrégat au cours du temps pour des globules provenant de la fraction 2 (échantillon global 58% HbS), le flux est de gauche à droite. **a.** $t=5$ min, les globules en adhésion derrière le plot de PDMS sont indiqués par les flèches. **b.** $t=35$ min, à chaque extrémité du plot un agrégat s'est formé (délimité par les pointillés), on distingue un globule en forme de faucille en bout d'agrégat (flèche). **c.** $t=80$ min, les deux agrégats se sont rejoints pour n'en former qu'un seul qui garde alors un taille stable (les flèches signalent les formes en faucille visibles dans l'agrégat). La longueur mesurée correspond à la longueur maximale. L'échelle représente $20 \mu\text{m}$.

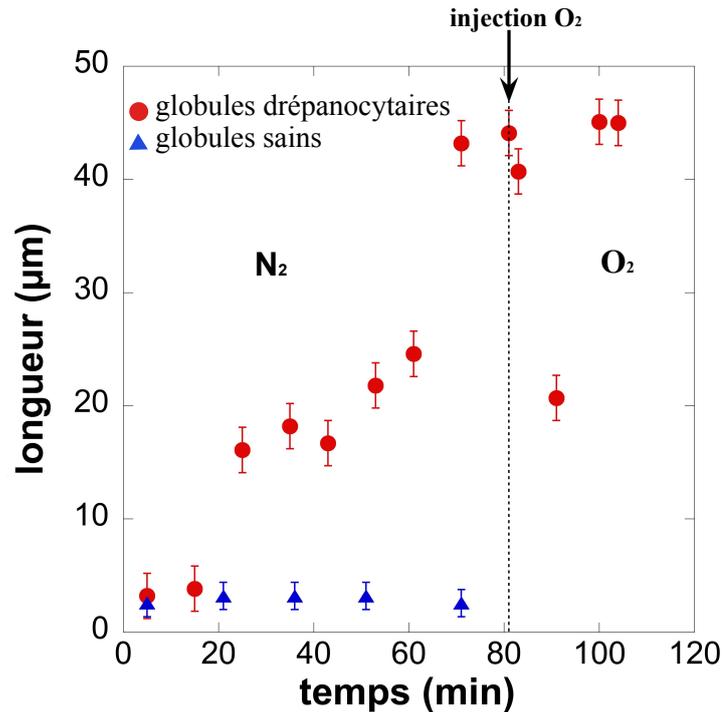


FIG. 6.6: Evolution au cours du temps de la longueur des agrégats de globules. Cercles rouge, données pour des globules drépanocytaires de la fraction 2 (échantillon global 58% HbS), l'agrégat croît jusqu'à atteindre une valeur d'environ $44 \mu\text{m}$. Lorsque l'azote est remplacée par de l'air à 81 minutes, l'agrégat se réarrangeant, de nombreux globules se détachent, puis l'agrégat croît de nouveau pour finalement atteindre la même longueur que désoxygéné. Triangles bleu, expérience témoin avec des globules sains de densité similaire aux globules HbS précédent, seulement un ou deux globules adhèrent au plot de PDMS.

tains s'hémolysent, relachant leur HbS en solution qui donne une couleur rosée au surnageant. C'est donc cette solution contenant de l'HbS libre qui a été utilisée pour suspendre les globules sains. La figure 6.7 rapporte l'évolution de la formation d'agrégats dans de telle conditions. Tout comme pour les globules drépanocytaires, les agrégats commencent à croître significativement qu'après une vingtaine de minutes, puis atteignent une valeur stable au bout de 80 minutes. Il est à noter que la longueur finale, $18 \pm 1,5 \mu\text{m}$, reste inférieure aux tailles observées dans le cas de globules drépanocytaires (une cinquantaine de microns). La même expérience réalisée avec de l'HbA libre en solution à la place de l'HbS, montre que l'on n'a pas de formation d'agrégats comparables à ceux obtenus précédemment (figure 6.7).

Il semblerait donc que la nature même de l'HbS confère au globules des proprié-

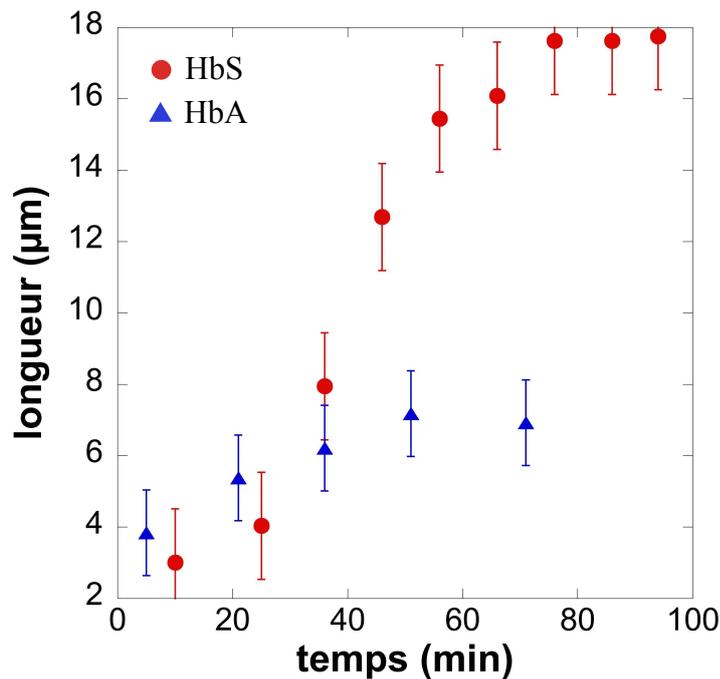


FIG. 6.7: Rôle de l'HbS libre en solution: évolution de la longueur des agrégats cellulaires au cours du temps. Cercles rouges, globules sains (fraction 2) auxquels le surnageant de globules HbS contenant de l'hémoglobine libre a été ajouté. Un agrégat se forme et atteint une longueur moyenne stable de $18 \mu m$ (longueur moyennée sur 10 agrégats). Triangles bleus, globules sains auxquels a été ajouté de l'HbA en solution. Seulement un ou deux globules adhèrent derrière le plot de PDMS.

tés d'adhésion plus forte que la normale. L'HbS libre a certainement interagi avec la membrane des globules, sinon nous n'aurions pas observé la formation d'agrégats comme dans le cas avec l'HbA. Toutefois la présence d'HbS libre en solution est insuffisante pour obtenir des structures de taille comparable à celles obtenues avec des globules drépanocytaires. Leur caractère adhésif, encore mal compris, résulte donc de nombreux autres paramètres comme par exemple la présence de protéines pro adhésives sur la surface de leur membrane, résultant de l'altération de celle-ci par les cycles de polymérisation-dépolymérisation [64].

6.3.3 Rôle des globules blancs

Ces dernières années, la recherche des nombreux facteurs, autre que la polymérisation, pouvant jouer un rôle dans la pathophysiologie de la drépanocytose, a amené différents groupes à s'intéresser aux globules blancs. Il a déjà été observé *in vivo* que les interactions globule rouge-globule blanc sont importantes durant la circulation dans les vénules post capillaires [125]. De plus les globules blancs provenant de personnes atteintes de la drépanocytose seraient plus adhésifs que la normale [124].

Nous avons donc ajouté aux globules drépanocytaires provenant de la fraction 2, environ 0,1% de globules blancs récupérés à l'issue de l'opération de tri par gradient de densité. Une fois sous écoulement, les structures formées sont radicalement différentes de celles obtenues dans les expériences précédentes. La figure 6.8 illustre la morphologie typique de ces structures formant de longues traînes à partir des plots de PDMS et dont les globules sont agencés en « grappe ». Il est possible de distinguer des globules blancs dans l'agrégat mais un marquage fluorescent de leurs membranes serait plus indiqué pour pouvoir repérer leurs positions dans ces structures.

Ces structures pouvant atteindre plusieurs centaines de microns de long, fluctuent dans le flux. Une autre observation intéressante concerne le fait que lorsque les globules arrivent dans l'écoulement, ils ne sont jamais déjà en adhésion entre eux, c'est donc dans l'écoulement et à certains endroits uniquement (au coins des plots) que les globules s'agrègent entre eux.

Sur la figure 6.9 est reportée la longueur de ces longues traînes, avec comme référence l'évolution d'un agrégat en absence de globules blancs et le test témoin avec uniquement des globules sains. Les données pour la longueur des agrégats en présence des globules blancs ne représentent pas l'évolution au cours du temps du même agrégat mais la longueur de différents agrégats formés à un temps donné. En effet, il est difficile de suivre l'évolution d'un agrégat car contrairement au cas des globules drépanocytaires seuls, ces traînes se constituent dès les premières minutes de l'écoulement et croissent en quelques secondes. Leur longueur est toujours de plusieurs fois supérieure que lorsqu'il n'y a pas de globules blancs, démontrant que les globules blancs sont bien un des facteurs à prendre en compte.

Ces longs agrégats peuvent également casser mais il n'y a pas eu de formation de bouchons lors de leur traversée des canaux de 30 μm de large. Toutefois la vitesse dans le canal a fortement diminué, et la présence d'un tel agrégat dans le canal fait office de filtre, les globules s'accumulant en amont de l'agrégat tandis qu'en aval, le canal se déplete en globules.

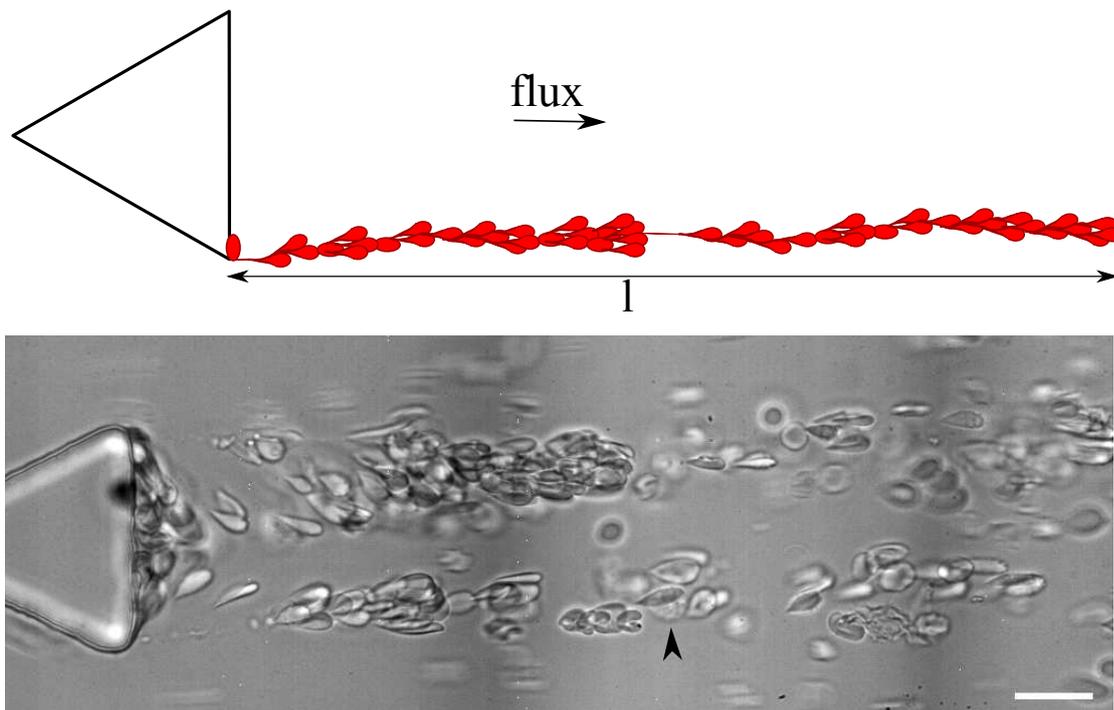


FIG. 6.8: Globules provenant de la fraction 2 (échantillon global 58% d'HbS) auxquels $\simeq 0,1\%$ de globules blancs ont été ajoutés. Les agrégats formés en présence de globules blanc forment de longues traînes pouvant atteindre plusieurs centaines de microns de long. Ces agrégats se forment à mi-hauteur du canal et fluctuent dans le courant. Nous distinguons sur la photo le tube de membrane entre le plot de PDMS et le premier globule ainsi qu'un globule blanc au milieu de l'agrégat (flèche). La photo a été prise à la fin lorsqu'il n'y a plus de globules dans l'écoulement, ce qui permet de bien discerner les globules constituant l'agrégat. L'échelle représente $20 \mu m$.

6.4 Vaso-occlusion ?

6.4.1 Vaso-occlusion et désobstruction

Bien que de nombreux facteurs jouant un rôle dans la pathophysiologie de la drépanocytose aient été identifiés et discutés [64, 127, 128, 132], la vaso-occlusion reste toujours inexplicée et imprévisible. Une étude de la vaso-occlusion dans des canaux microfluidiques a déjà été menée [79], cependant plusieurs points méritent d'être éclaircis. Premièrement, les globules dans l'écoulement circulent en amas composés d'une dizaine de globules environ (voir figure 6.10), ce qui est plutôt

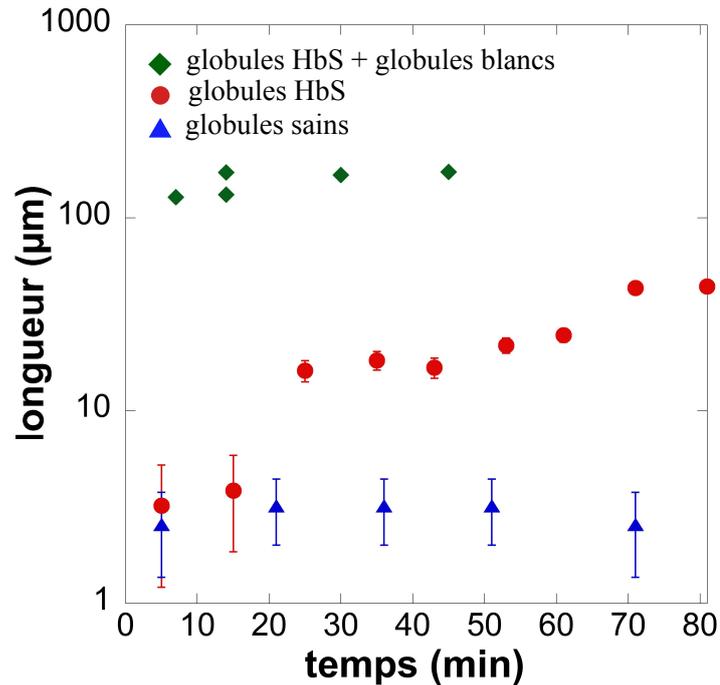


FIG. 6.9: Comparaison de la longueur d'agrégats lorsque $\simeq 0,1\%$ de globules blancs sont ajoutés (losanges vert) avec comme référence l'évolution pour un agrégat de globules HbS (cercles rouge) et seulement des globules sains (triangles bleu). Les données concernant le cas avec globules blancs ne correspondent pas à l'évolution au cours du temps d'un même agrégat, mais à la longueur d'agrégats observés à un temps donné.

surprenant car nous n'avons jamais observé ce genre de comportement. Cependant le sang qu'ils utilisent est parfois ancien (jusqu'à 60 jours) donc les globules sont certainement altérés. En absence d'oxygène, les auteurs observent un ralentissement progressif du flux jusqu'à l'arrêt complet après une dizaine de minutes. Par contre, les sites de vaso-occlusion ne sont pas décrits, ni le mécanisme menant à cette vaso-occlusion (initiation à partir d'adhésion sur les parois, obstruction stérique, rôle des amas dans l'écoulement ...). Nous pensons que des globules drépanocytaires rigidifiés par la présence de polymère et circulant en amas d'une trentaine de microns dans des microcanaux de taille comparable n'est pas étrange à l'arrêt de l'écoulement. Le flux repart lorsque de l'oxygène est injecté à la place de l'azote.

Nous avons observé à deux reprises ce type de comportement avec des échantillons sanguins contenant plus de 90% d'HbS: une partie des canaux s'est obstruée sans

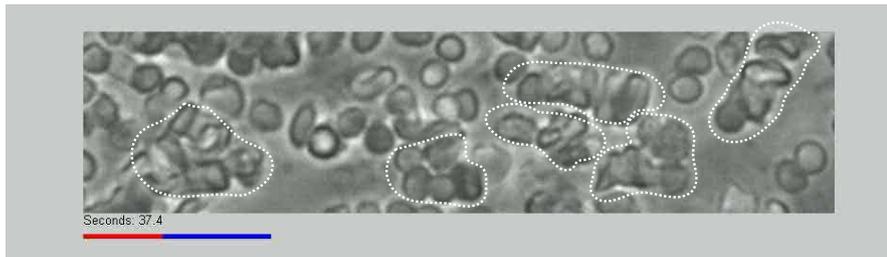


FIG. 6.10: Globules en écoulement dans un canal microfluidique, les globules forment des amas qui circulent dans l'écoulement (Higgins et al. [79]).

que l'on observe comment cela s'est produit, mais lorsque nous avons réoxygéné l'écoulement, toute la partie à l'arrêt s'est remise en écoulement. Il semblerait que la dépolymérisation rendant les globules plus déformables, modifie suffisamment les interactions entre eux pour que le bouchon se remette en écoulement. Cependant on peut s'interroger sur la pertinence d'un tel scénario *in vivo*. En effet si l'on pense qu'un tel bouchon de globules rendus rigides par la présence de polymère s'est formé dans une partie de la circulation où la pression partielle en oxygène est très faible, quelles seraient alors les sources d'oxygène nécessaires à la dépolymérisation ?

6.4.2 La vaso-occlusion: une obstruction stérique ?

Le bouchage de la microcirculation, et en particulier des capillaires sanguins les plus fins par des globules fortement déformés est peu probable. Nous avons observé que la morphologie des globules désoxygénés sous écoulement est assez différente de celle au repos. En écoulement, les globules drépanocytaires gardent une forme quasi-discocyte avec pour certains, un aspect grumeleux. A une échelle de $30 \mu m$, correspondant au diamètre typique des veinules post capillaires, nous n'avons jamais observé d'occlusion engendrée par une obstruction stérique. Que ce soit lors de la circulation de globules désoxygénés en écoulement ou bien même lors de l'écoulement de globules préalablement désoxygénés et donc adoptant en très grande majorité la forme caractéristique en faucille (figure 6.3).

6.4.3 Adhésion des globules drépanocytaires

Les globules rouges drépanocytaires sont régulièrement décrits comme étant plus adhésifs que leurs homologues sains [75, 123, 127]. Les expériences que nous avons menées avec des globules sains en présence d'HbS libre en solution montrent que les globules sains sont aussi capables de former des agrégats cellulaires alors

que dans le cadre de globules sains avec de l'HbA libre en solution nous n'observons pas la formation de telles structures. L'HbS semble jouer un rôle dans les propriétés adhésives des globules drépanocytaires. Des études montrent que l'HbS interagit avec la membrane des globules [133, 134] et peut se lier de façon irréversible à la membrane même en conditions d'oxygénation [134]. Deux types d'interaction seraient impliqués: une interaction électrostatique avec la protéine band III de la membrane du globule rouge et une interaction hydrophobe impliquant très certainement la valine substituée située à la position $\beta 6$. La valine $\beta 6$ est située sur la surface de la protéine, la molécule d'hémoglobine comporte deux résidus susceptibles de se lier avec la membrane d'un globule rouge. Dans ce cas, on peut imaginer que les globules drépanocytaires puissent adhérer entre eux pour former des agrégats.

6.4.4 Agrégats cellulaires

La morphologie des agrégats cellulaires est très dépendante de la présence de quelques globules blancs dans l'écoulement (figure 6.11). Bien que l'on observe la présence des globules blancs dans les agrégats, nous ne savons pas si ils sont à la base de la structure. Néanmoins une étude récente [135] montre que les globules blancs adhèrent préférentiellement au niveau des bifurcations, de plus cette préférence est indépendante de l'état de l'endothélium et résulterait de l'hydrodynamique au niveau des bifurcations.

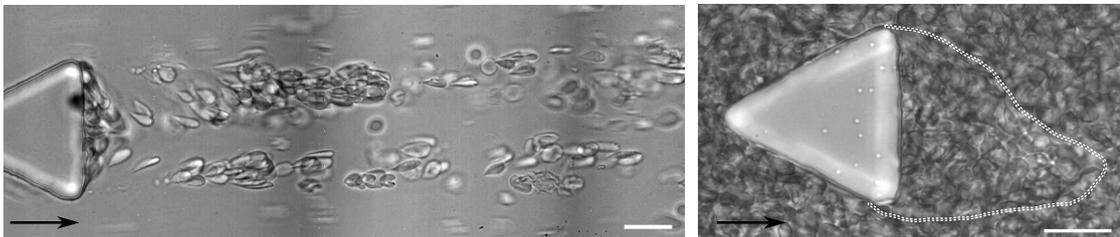


FIG. 6.11: Différence de morphologie des agrégats cellulaires en présence de globules blancs (à gauche) et en absence de globules blancs (à droite). L'échelle représente $20 \mu m$.

Les différences observées en présence de globules blancs ne sont pas complètement inattendues: la drépanocytose est caractérisée par un état inflammatoire chronique [132]. De plus, plusieurs études cliniques rapportent que la sévérité de cette maladie est directement liée au taux de globules blancs [136–138]. A noter que le nombre de globules blancs est plus faible chez les populations africaines. Il

est raisonnable d'imaginer qu'un taux plus faible résulterait d'un avantage évolutif pour des populations concernées par une haute prévalence de la mutation HbS.

La formation d'agrégats que nous avons pu observer est conditionnée par la présence d'un écoulement en coin. Il n'y a pas d'adhésion entre globules initiée à partir de la surface du verre ou de la surface de PDMS supérieure. Le fait que ces structures se forment à partir d'un mur au niveau de changement de direction important du flux, rappelle les observations décrivant l'adhésion de globules au niveau de bifurcations [125, 128] *in vivo* (figure 6.12). La photo de la figure 6.12b est intéressante car l'angle de la bifurcation est similaire à l'angle que l'on retrouve au niveau des plots de PDMS, l'agrégat qui en résulte est assez important.

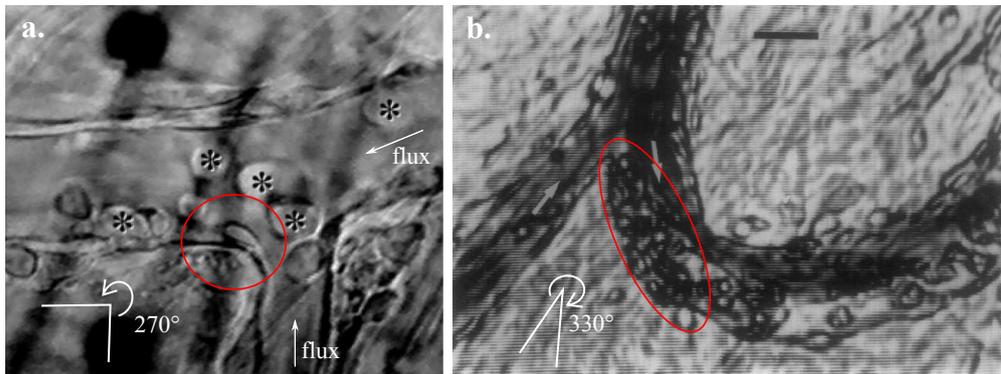


FIG. 6.12: **a.** Adhésion de globules drépanocytaires au niveau d'une bifurcation dans une veinule post capillaire. Les cellules marquées d'un astérisque sont des globules blancs (Frenette et al. [125]). **b.** Formation d'un agrégat au niveau d'une bifurcation, les flèches indiquent le sens de l'écoulement (Kaul et al. [128]).

Nous ne connaissons pas les mécanismes à l'origine de la croissance de ces agrégats. Cependant, des études récentes portant sur la croissance de biofilms de bactéries, dénommés « streamers », déjà observée dans des canaux microfluidiques [139, 140], fait penser par plusieurs aspects à la croissance des agrégats cellulaires en présence de globules blancs: ces « streamers » débutent leur croissance au niveau de changements de direction important du flux, et plus le changement de direction est brusque plus les « streamers » qui se développent sont importants en taille pour une échelle de temps donnée (figure 6.13).

De façon similaire nous observons la formation d'agrégats de globules au niveau des coins des plots de PDMS qui représentent un angle de 320° . Ailleurs dans l'écoulement où il y a également des changements de direction mais plus faible comme à l'entrée ou à la sortie des canaux de $30 \mu m$, nous n'observons pas de telles structures. De plus les « streamers » se développent à mi hauteur dans

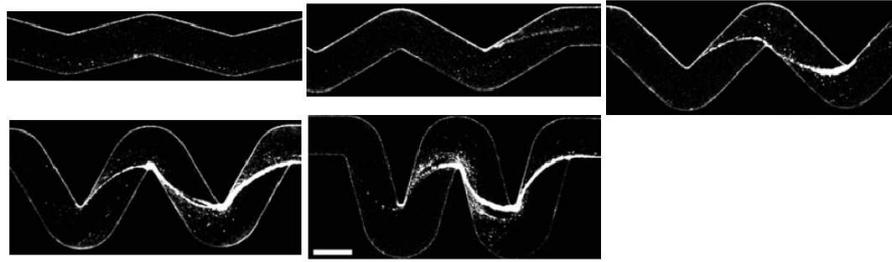


FIG. 6.13: Images confocale de streamers sous flux illustrant l'importance de l'angle sur leur croissance. L'échelle représente $200 \mu m$ (Rusconi et al. [139])

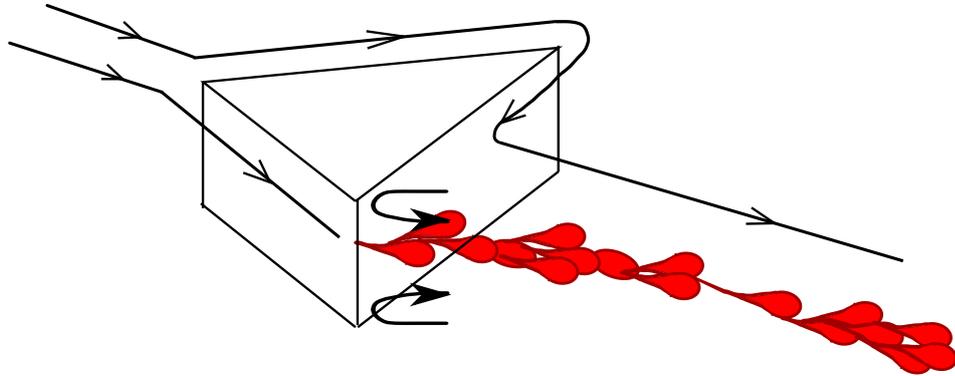


FIG. 6.14: Schéma des lignes de courants autour d'un plot de PDMS illustrant l'hypothèse d'un flux secondaire local comme initiateur de l'adhésion à mi hauteur de l'écoulement.

l'écoulement. L'explication proposée [140] est la suivante: bien qu'étant à faible nombre de Reynolds, il existe une perturbation locale du flux au niveau des coins, dont l'amplitude est proportionnelle à l'importance de l'angle de changement de direction du flux. Cette perturbation génère un flux secondaire avec une composante verticale dirigée du bas vers le milieu de l'écoulement et une autre dirigée du haut vers le milieu de l'écoulement, initiant ainsi la croissance des « streamers » à mi-hauteur. La figure 6.14 illustre ce que pourrait donner cette perturbation locale dans le cas de la croissance des agrégats de globules au niveau des plots de PDMS, sachant que nous observons effectivement que les agrégats contenant en particulier des globules blancs, « flottent » dans l'écoulement.

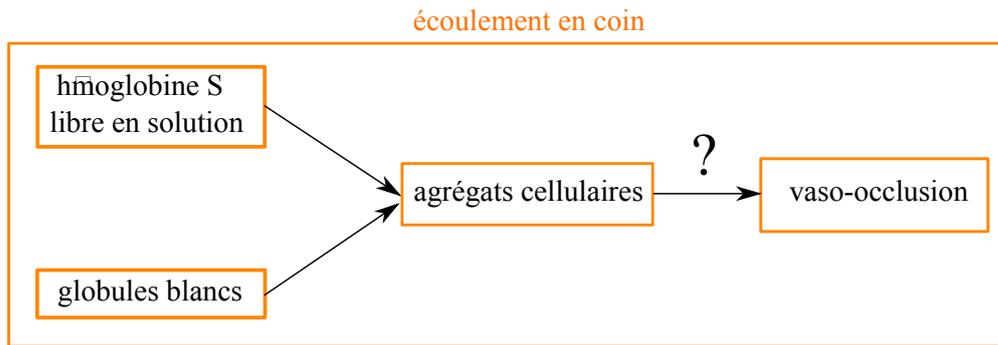


FIG. 6.15: Rôle joué par les différents paramètres testés.

6.5 Conclusion

Notre étude permet de bien découpler l'influence des différents paramètres (oxygène, globules blancs, hémoglobine libre, géométrie), la figure 6.15 résume le rôle joué par chacun. Les globules drépanocytaires sont naturellement plus adhésifs que les globules sains. L'hémoglobine S libre en solution est pour partie responsable de cette caractéristique. De plus les globules blancs sont un facteur déterminant dans la formation de longues structure dans l'écoulement. Ces structures lorsqu'elles cassent peuvent ralentir drastiquement la vitesse de l'écoulement même si cela n'a jamais conduit à l'obstruction totale d'un canal.

Quelle est la pertinence de la géométrie de nos canaux ? L'idée de départ était de tester si nous pouvions observer l'obstruction stérique de globules en forme de faucille enchevêtrés dans des canaux de petite taille ($30 \mu m$) pour vérifier le scénario si souvent décrit pour avancer une explication à la vaso-occlusion. Les plots de PDMS étant destinés uniquement au soutènement de la puce. Ce scénario a vite été écarté et la formation inattendue d'agrégats cellulaire au niveau des plots nous a conduit à nous intéresser à ces structures.

Les expériences réalisées n'ont pas permis de conclure quant aux mécanismes menant jusqu'à la vaso-occlusion, néanmoins les rôles de certains paramètres ont été mis en lumière. Il serait intéressant par exemple de contruire des écoulements microfluidiques comportant un réseau de bifurcations avec des canaux de largeur différente se « jetant » les uns dans les autres et d'observer le comportement des agrégats cellulaires dans une telle géométrie.

Conclusions et perspectives

Le travail effectué durant cette thèse a permis de développer tous les outils nécessaires à l'étude de la vaso-occlusion dans le cas d'une maladie génétique: la drépanocytose.

La première partie relative à la fabrication de vésicules pour la conception de globules rouges artificiels s'est révélée plus riche que prévu. Le travail réalisé au cours de cette thèse a consisté pour la majeure partie du temps, à la mise au point de cette technique qui, de par ses nombreux avantages, est toute indiquée pour la construction de systèmes biomimétiques. Simple et rapide à mettre en œuvre, elle permet la production à haut rendement de vésicules contrôlées en taille et en contenu. Les vésicules ainsi formées, possèdent une membrane sans défaut dont nous avons fait varier la composition parmi une gamme importante de lipides. De plus, il est possible de travailler à des concentrations salines physiologiques. Cette méthode est utilisée dans plusieurs laboratoires, pour l'étude de la dynamique du cytosquelette (groupe d'Andreas Bausch), pour la reconstruction de divisomes (groupes de Petra Schwillie et German Rivas), pour l'encapsulation d'ADN (Annie Viallat)...

La deuxième partie constitue une étude préliminaire de la vaso-occlusion liée à la drépanocytose. L'emploi des techniques microfluidiques nous a permis de recréer des écoulements mimant les conditions physiologiques, et de découpler l'influence des différents paramètres (taux d'oxygène, présence des globules blancs, hémoglobine libre, géométrie). Nous avons montré que la géométrie de l'écoulement est une condition nécessaire pour la formation d'agrégats cellulaires. Le caractère adhésif des globules drépanocytaires est en partie dû à l'hémoglobine libre en solution résultant de l'hémolyse plus importante de ces globules malades. La morphologie des agrégats est grandement dépendante de la présence en solution des globules blancs dans l'écoulement, les structures formées pouvant mesurer jusqu'à plusieurs centaines de microns de long.

Bien que nous n'ayons jamais observé de vaso-occlusion initiée par ces agrégats cellulaires, il serait intéressant de construire des microcanaux reproduisant plus fidèlement des portions stratégiques de la microcirculation. Par exemple, concevoir des puces comportant un réseau de bifurcations avec des canaux de largeurs

différentes se « jetant » les uns dans les autres afin d'observer le comportement des agrégats cellulaires dans une telle géométrie.

Nous avons également observé que les globules désoxygénés sous écoulement ne se déforment pas en faucille. Nous pourrions utiliser des vésicules encapsulant des solutions d'HbS de concentration bien calibrée pour observer la formation de polymères sous cisaillement.

Appendices

Annexe A

Détermination de la vitesse d'approche en régime de Taylor

Aux faibles nombres de Bond, on peut considérer les interfaces fluides (EAS/LOS et LOS/DAS) comme non déformables et se ramener ainsi au problème de l'approche d'une sphère dure sur un plan rigide.

A.1 Géométrie du problème

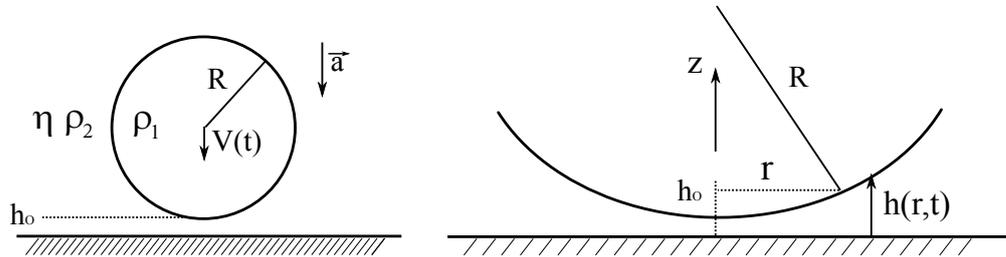


FIG. A.1: Schéma représentant une sphère de rayon R approchant un plan à des petites distances: $h_0 \ll R$, avec h_0 la distance minimale entre la sphère et le plan.

La dynamique d'approche est gouvernée par le déplacement du fluide dans l'espace compris entre la sphère et le plan. La pression est maximum lorsque $r=0$ et décroît rapidement lorsque $r \rightarrow R$, nous pouvons donc imaginer que la géométrie proche du minimum ($r \rightarrow 0$) sera la plus importante. D'après la figure A.1 on peut écrire:

$$R + h_0 = h(r, t) + \sqrt{R^2 - r^2}, \quad (\text{A.1})$$

soit pour $r \ll R$:

$$\begin{aligned} h(r, t) &\approx R + h_O - R \left[1 - \frac{1}{2} \left(\frac{r}{R} \right)^2 + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{R} \right)^4 \right] \\ &\approx h_O \left[1 + \frac{r^2}{2Rh_O} - \frac{1}{8} \frac{r^4}{R^3 h_O} \right]. \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

A partir de l'équation A.2, nous pouvons déterminer une longueur caractéristique pour laquelle la géométrie de l'espace entre la sphère et le plan varie de façon significative (c'est-à-dire la distance pour laquelle h varie d'un facteur 2):

$$\frac{h(r, t)}{h_O} = 1 + \frac{r^2}{2Rh_O} \Rightarrow \text{longueur caractéristique } l = \sqrt{Rh_O} \quad (\text{A.3})$$

A.2 Champs des vitesses et de pression

Pour des distances sphère-plan $\ll R$, en utilisant l'approximation de lubrification, nous considérons donc le champ de vitesse $\vec{u} = (u_r, u_z)$ avec $|u_r| \gg |u_z|$. Dans de telles conditions, l'équation de Navier Stokes et la condition d'incompressibilité s'écrivent respectivement:

$$-\frac{\partial p}{\partial r} + \eta \frac{\partial^2 u_r}{\partial z^2} = 0, \quad (\text{A.4})$$

$$\frac{\partial p}{\partial z} = 0, \quad (\text{A.5})$$

$$\frac{1}{r} \frac{\partial(r u_r)}{\partial r} + \frac{\partial u_z}{\partial z} = 0. \quad (\text{A.6})$$

L'équation A.5 indique que la pression ne varie pas dans la hauteur sphère-plan, par conséquent $p(r, t)$. En intégrant l'équation A.4, nous obtenons le champ des vitesses:

$$u_r(r, z, t) = \frac{1}{2\eta} \frac{\partial p}{\partial r} z^2 + C_1(r, t)z + C_2(r, t). \quad (\text{A.7})$$

En tenant compte des conditions aux limites $u_r = 0$ à $z = 0$ et $u_r = 0$ à $z = h(r, t)$, les fonctions C_1 et C_2 peuvent être explicités et nous obtenons:

$$u_r(r, z, t) = \frac{1}{2\eta} \frac{\partial p}{\partial r} z(z - h). \quad (\text{A.8})$$

Nous intégrons à présent la condition d'incompressibilité dans l'interstice:

$$\int_0^{h(r,t)} \frac{1}{r} \frac{\partial(ru_r)}{\partial r} dz + V(t) = 0, \quad (\text{A.9})$$

avec $V(t) = u_z(r, h, t) = \frac{dh_O}{dt}$ la vitesse de la sphère. En injectant l'équation A.7 dans cette expression, nous obtenons:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(rh^3 \frac{\partial p}{\partial r} \right) = 12\eta V(t), \quad (\text{A.10})$$

que nous intégrons une première fois:

$$h^3 \frac{\partial p}{\partial r} = 6\eta V r. \quad (\text{A.11})$$

En utilisant l'expression A.2, nous déterminons complètement le gradient de pression dans l'espace entre la sphère et le plan:

$$\frac{\partial p}{\partial r} = \frac{6\eta V r}{h_0^3 \left(1 + \frac{r^2}{2Rh_0}\right)^3}. \quad (\text{A.12})$$

Finalement, en intégrant l'équation précédente, nous obtenons le champ de pression:

$$p(r, t) = C - \frac{3\eta V R}{h_0^2 \left(1 + \frac{r^2}{2h_0 R}\right)^2}. \quad (\text{A.13})$$

Pour des distances caractéristiques supérieures à $\sqrt{Rh_0}$, la fonction dans le terme de droite diminue rapidement. En conséquence nous choisirons comme pression de référence constante p_O , la pression pour $r = R$, ainsi:

$$p(r, t) - p_O = -\frac{3\eta V R}{h_0^2 \left(1 + \frac{r^2}{2h_0 R}\right)^2}. \quad (\text{A.14})$$

A.3 Force résistive exercée sur la sphère

La principale contribution à la force hydrodynamique résistive qui s'applique sur la sphère est due à la pression dans l'espace entre la sphère et le plan et peut être calculée de la façon suivante:

$$\begin{aligned}
F &\approx - \int_{gap} (p - p_O) \vec{n} \vec{e}_z dS \\
&\approx - \frac{3\eta V R}{h_O^2} \cdot 2\pi \int_0^R \frac{r}{\left(1 + \frac{r^2}{2h_O R}\right)^2} dr \\
&\approx - \frac{6\pi\eta V R^2}{h_O}.
\end{aligned} \tag{A.15}$$

A.4 Calcul de la vitesse en régime de Taylor

La vitesse d'une sphère approchant un plan rigide, peut être explicité en écrivant l'équilibre entre la force résistive calculée précédemment et la force centrifuge ($4/3 \Delta\rho\pi R^3 a$), et nous obtenons finalement:

$$V = \frac{2\Delta\rho a R h}{9\eta}. \tag{A.16}$$

C'est cette vitesse, caractéristique du régime de Taylor, que nous utilisons pour décrire l'approche de gouttelettes d'une interface fluide dans le cadre des faibles nombres de Bond.

Annexe B

Protocole détaillé de dispersion des lipides dans l'huile minérale

B.1 Contrôle de l'humidité

La dispersion des lipides dans l'huile minérale est un point critique pour la production de vésicules, une maîtrise fine de cette étape permet de plus l'obtention de vésicules sans défaut et en grande quantité. Une attention particulière doit être portée aux conditions d'humidité tout au long du processus de dispersion. Pour cela nous utilisons une poche à gant (atmosbag Sigma Aldrich) dans laquelle l'humidité relative est maintenue autour de 10% en insufflant de l'azote.

B.2 Dissolution des lipides dans le chloroforme méthanol

Dans la poche à gants, nous commençons par dissoudre les lipides achetés sous forme de poudre dans un mélange chloroforme/méthanol 9:1 v/v à 50 mg/ml pour de l'Egg-PC. Cette solution est conservée à -20°C et nous l'utilisons uniquement après trois semaines de repos. Nous avons déterminé ce délai de façon empirique, l'utilisation de cette solution préalablement à ce repos résulte en l'échec de la dispersion des lipides dans l'huile minérale, en outre cette solution est utilisable pendant plusieurs mois après dissolution.

B.3 Préparation de la LOS

B.3.1 Formation du film de lipides

Pour la formation du film de lipides nous utilisons un flacon en verre de 25 ml. Pour le rendre complètement étanche nous enroulons du ruban de téflon sur le pas de vis. Juste avant de l'utiliser, nous soufflons de l'azote à l'intérieur pour le sécher complètement et le fermons hermétiquement. Une fois dans la poche à gants, 160 μl d'Egg-PC de la solution mère (précédemment décrite) sont déposés dans le flacons ainsi qu'environ 200 μl de mélange chloroforme/méthanol afin de s'assurer que le fond du flacons soit complètement recouvert de fluide. Le flacon est alors déposé dans un dessiccateur (s'assurer que le robinet est en position fermée avant d'ouvrir la poche à gant), et le vide est fait pendant une vingtaine de minutes. Rapidement (≈ 5 min), un film de lipide de couleur blanche devrait apparaître sur le fond du flacon. Après 20 minutes, ce film est clairement visible et possède un aspect « **blanc givré** ». Si tel n'est pas le cas, alors inutile de continuer, laisser sous vide pendant plus longtemps (même plusieurs heures) ne résoudra pas le problème.

B.3.2 Dispersion dans l'huile minérale

Le dessiccateur étant ramené dans la poche à gant, nous pouvons casser le vide et déposer sans attendre les 20 ml d'huile minérale (Sigma Aldrich # M3516) sur le film de lipides afin d'obtenir une concentration finale en lipides de 0,5 mM. Le flacon est alors hermétiquement fermé et laissé au repos sur la paillasse pendant une heure. L'huile minérale va alors gonfler le film de lipides que l'on devrait voir apparaître de plus en plus clairement au cours du temps.

Pour disperser les lipides dans l'huile minérale, nous vortexons la solution une vingtaine de secondes puis la soniquons pendant une heure en s'assurant que la température ne dépasse pas les 40°C en ajoutant de la glace si besoin. Dès les premières minutes de sonication, nous pouvons observer le film de lipides se détacher du fond. En sortie de sonication la solution doit être complètement transparente, celle-ci est alors laissée au repos à l'ambiante pendant toute une nuit avant utilisation. Le lendemain la solution doit être trouble, c'est le signe que des agrégats de lipides de taille micrométrique se sont formés. La solution est alors prête pour utilisation.

Au cours du temps les agrégats de lipides évoluent, leur taille augmentant ils finissent par sédimenter au fond de la solution au bout de 3 jours environs. Il est possible de soniquer à nouveau cette solution pour resuspendre les lipides, mais la qualité des vésicules produites est moindre, et cette solution moins stable dans le temps. De façon plus générale ce protocole peut être utilisé sans ajustement pour dissoudre de nombreux lipides (voir tableau 3.1).

Liste des abréviations

CDICE Continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation

HbS Hémoglobine S

oxyHbS Hémoglobine S dans la conformation oxygénée

deoxyHbS Hémoglobine S dans la conformation désoxygénée

HbA Hémoglobine A

LOS Lipid in Oil Solution

DAS Dispersing Aqueous solution

EAS Encapsulated Aqueous Solution

CP Continuous Phase

NA Numerical Aperture

AFM Atomic Force Microscopy

SRBC Sickle Red Blood Cell

CCMH Concentration Corpusculaire Moyenne d'Hémoglobine

PBS Phosphate Buffered Saline

PDMS PolyDiMethylSiloxane

Bibliographie

1. *Sickle cell hemoglobin polymerization.*, vol. 40, pp. 63–279. Adv Protein Chem, 1990.
2. H. Bunn, “Mechanisms of disease - pathogenesis and treatment of sickle cell disease,” *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, vol. 337, pp. 762–769, SEP 11 1997.
3. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, and E. Tsuchida, “Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers,” *ARTIFICIAL ORGANS*, vol. 33, pp. 139–145, FEB 2009. 45th Annual Meeting of the Japanese-Society-for-Artificial-Organs/2nd Meeting of the International-Federation-for-Artificial-Organs, Osaka, JAPAN, OCT 28-31, 2007.
4. T. Chang, “Therapeutic applications of polymeric artificial cells,” *NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY*, vol. 4, pp. 221–235, MAR 2005.
5. T. Allen and P. Cullis, “Drug delivery systems: Entering the mainstream,” *SCIENCE*, vol. 303, pp. 1818–1822, MAR 19 2004.
6. D. Lasic, “Novel applications of liposomes,” *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY*, vol. 16, pp. 307–321, JUL 1998.
7. T. Taylor, P. Davidson, B. Bruce, and J. Weiss, “Liposomal nanocapsules in food science and agriculture,” *CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION*, vol. 45, no. 7-8, pp. 587–605, 2005.
8. A. Madene, M. Jacquot, J. Scher, and S. Desobry, “Flavour encapsulation and controlled release - a review,” *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, vol. 41, pp. 1–21, JAN 2006.
9. M. Fidorra, A. Garcia, J. H. Ipsen, S. Haertel, and L. A. Bagatolli, “Lipid domains in giant unilamellar vesicles and their correspondence with equilibrium thermodynamic phases: A quantitative fluorescence microscopy imaging approach,” *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, vol. 1788, pp. 2142–2149, OCT 2009.

10. S. Veatch and S. Keller, "Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 85, pp. 3074–3083, NOV 1 2003.
11. A. Viallat, J. Dalous, and M. Abkarian, "Giant lipid vesicles filled with a gel: Shape instability induced by osmotic shrinkage," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 86, pp. 2179–2187, APR 2004.
12. P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, and P. Stano, "Giant vesicles: Preparations and applications," *CHEMBIOCHEM*, vol. 11, pp. 848–865, MAY 3 2010.
13. P. Luisi, F. Ferri, and P. Stano, "Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review," *NATURWISSENSCHAFTEN*, vol. 93, pp. 1–13, JAN 2006.
14. S. Nomura, K. Tsumoto, T. Hamada, K. Akiyoshi, Y. Nakatani, and K. Yoshikawa, "Gene expression within cell-sized lipid vesicles," *CHEMBIOCHEM*, vol. 4, pp. 1172–1175, NOV 7 2003.
15. V. Noireaux and A. Libchaber, "A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 101, pp. 17669–17674, DEC 21 2004.
16. D. Merkle, N. Kahya, and P. Schwille, "Reconstitution and anchoring of cytoskeleton inside giant unilamellar vesicles," *CHEMBIOCHEM*, vol. 9, pp. 2673–2681, NOV 3 2008.
17. L.-L. Pontani, J. van der Gucht, G. Salbreux, J. Heuvingh, J.-F. Joanny, and C. Sykes, "Reconstitution of an actin cortex inside a liposome," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 96, pp. 192–198, JAN 7 2009.
18. L. Limozin and E. Sackmann, "Polymorphism of cross-linked actin networks in giant vesicles," *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, vol. 89, OCT 14 2002.
19. A. Bangham, M. Standish, and J. Watkins, "Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 13, no. 1, pp. 238–&, 1965.
20. J. Reeves and R. Dowben, "Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles," *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, vol. 73, no. 1, pp. 49–&, 1969.
21. M. Angelova and D. Dimitrov, "Liposome electroformation," *FARADAY DISCUSSIONS*, vol. 81, pp. 303+, 1986.

22. S. Pautot, B. Frisken, and D. Weitz, "Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion," *LANGMUIR*, vol. 19, pp. 2870–2879, APR 1 2003.
23. A. Yamada, T. Yamanaka, T. Hamada, M. Hase, K. Yoshikawa, and D. Baigl, "Spontaneous transfer of phospholipid-coated oil-in-oil and water-in-oil micro-droplets through an oil/water interface," *LANGMUIR*, vol. 22, pp. 9824–9828, NOV 21 2006.
24. H. C. Shum, D. Lee, I. Yoon, T. Kodger, and D. A. Weitz, "Double emulsion templated monodisperse phospholipid vesicles," *LANGMUIR*, vol. 24, pp. 7651–7653, AUG 5 2008.
25. J. C. Stachowiak, D. L. Richmond, T. H. Li, A. P. Liu, S. H. Parekh, and D. A. Fletcher, "Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 105, pp. 4697–4702, MAR 25 2008.
26. K. Funakoshi, H. Suzuki, and S. Takeuchi, "Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow," *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, vol. 129, pp. 12608+, OCT 24 2007.
27. S. Ota, S. Yoshizawa, and S. Takeuchi, "Microfluidic formation of monodisperse, cell-sized, and unilamellar vesicles," *ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION*, vol. 48, no. 35, pp. 6533–6537, 2009.
28. S. Pautot, B. Frisken, and D. Weitz, "Engineering asymmetric vesicles," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 100, pp. 10718–10721, SEP 16 2003.
29. L. Mathivet, S. Cribier, and P. Devaux, "Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an ac electric field," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 70, pp. 1112–1121, MAR 1996.
30. K. S. Horger, D. J. Estes, R. Capone, and M. Mayer, "Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength," *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, vol. 131, pp. 1810–1819, FEB 11 2009.
31. D. Estes and M. Mayer, "Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber," *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-BIOMEMBRANES*, vol. 1712, pp. 152–160, JUN 30 2005.

32. T. Pott, H. Bouvrais, and P. Meleard, "Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions," *CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS*, vol. 154, pp. 115–119, AUG 2008.
33. L.-R. Montes, A. Alonso, F. M. Goni, and L. A. Bagatolli, "Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 93, pp. 3548–3554, NOV 2007.
34. D. Estes and M. Mayer, "Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids," *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES*, vol. 42, pp. 115–123, MAY 10 2005.
35. M. Le Berre, A. Yamada, L. Reck, Y. Chen, and D. Baigl, "Electroformation of giant phospholipid vesicles on a silicon substrate: Advantages of controllable surface properties," *LANGMUIR*, vol. 24, pp. 2643–2649, MAR 18 2008.
36. A. Diguët, M. Le Berre, Y. Chen, and D. Baigl, "Preparation of phospholipid multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate," *SMALL*, vol. 5, pp. 1661–1666, JUL 17 2009.
37. T. Hamada, Y. Miura, Y. Komatsu, Y. Kishimoto, M. Vestergaard, and M. Takagi, "Construction of asymmetric cell-sized lipid vesicles from lipid-coated water-in-oil microdroplets," *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*, vol. 112, pp. 14678–14681, NOV 27 2008.
38. A. Utada, E. Lorenceau, D. Link, P. Kaplan, H. Stone, and D. Weitz, "Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device," *SCIENCE*, vol. 308, pp. 537–541, APR 22 2005.
39. S. Matosevic and B. M. Paegel, "Stepwise synthesis of giant unilamellar vesicles on a microfluidic assembly line," *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, vol. 133, pp. 2798–2800, MAR 9 2011.
40. Y. Tan, K. Hettiarachchi, M. Siu, and Y. Pan, "Controlled microfluidic encapsulation of cells, proteins, and microbeads in lipid vesicles," *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, vol. 128, pp. 5656–5658, MAY 3 2006.
41. S. Pautot, B. Frisken, J. Cheng, X. Xie, and D. Weitz, "Spontaneous formation of lipid structures at oil/water lipid interfaces," *LANGMUIR*, vol. 19, pp. 10281–10287, NOV 25 2003.

42. P. Umbanhowar, V. Prasad, and D. Weitz, "Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream," *LANGMUIR*, vol. 16, pp. 347–351, JAN 25 2000.
43. M. Hoorfar and A. W. Neumann, "Recent progress in axisymmetric drop shape analysis (adsa)," *ADVANCES IN COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, vol. 121, pp. 25–49, SEP 13 2006.
44. J. Li, V. Fainerman, and R. Miller, "Adsorption kinetics of phospholipids at the chloroform/water interface studied by drop volume and pendant drop techniques," *LANGMUIR*, vol. 12, pp. 5138–5142, OCT 16 1996.
45. J. Li, R. Miller, and H. Mohwald, "Characterisation of phospholipid layers at liquid interfaces .1. dynamics of adsorption of phospholipids at the chloroform/water interface," *COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS*, vol. 114, pp. 113–121, AUG 20 1996. Bubble and Drop 95 Workshop, EMPOLI, ITALY, MAY, 1995.
46. R. Vandenbergert and P. Joos, "Dynamic surface tensions of sodium myristate solutions," *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY*, vol. 83, no. 17, pp. 2244–2248, 1979.
47. M. Manga, *The motion of deformable drops and bubbles at low Reynolds number: Applications to selected problems in geology and geophysics*. PhD thesis, Harvard, 1994.
48. P. Kralchevsky and K. Nagayama, *Particles at fluid interfaces and membranes*, ch. 5,6. Elsevier, 2001.
49. E. Basheva, T. Gurkov, I. Ivanov, G. Bantchev, B. Campbell, and R. Borwankar, "Size dependence of the stability of emulsion drops pressed against a large interface," *LANGMUIR*, vol. 15, pp. 6764–6769, SEP 28 1999.
50. M. Manga and H. Stone, "Low-reynolds-number motion of bubbles, drops and rigid spheres through fluid-fluid interfaces," *JOURNAL OF FLUID MECHANICS*, vol. 287, pp. 279–298, MAR 25 1995.
51. C. Huh and L. Scriven, "Hydrodynamic model of steady movement of a solid/liquid/fluid contact line," *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE*, vol. 35, no. 1, pp. 85–&, 1971.
52. J. Neel, "The inheritance of sickle cell anemia," *SCIENCE*, vol. 110, no. 2846, pp. 64–66, 1949.

53. L. Pauling, H. Itano, S. Singer, and I. Wells, "Sickle cell anemia, a molecular disease," *SCIENCE*, vol. 110, no. 2865, pp. 543–548, 1949.
54. F. Ferrone, J. Hofrichter, and W. Eaton, "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization .1. studies using temperature-jump and laser photolysis techniques," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 183, no. 4, pp. 591–610, 1985.
55. F. Ferrone, J. Hofrichter, and W. Eaton, "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization .2. a double nucleation mechanism," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 183, no. 4, pp. 611–631, 1985.
56. Z. Cao and F. Ferrone, "A 50th order reaction predicted and observed for sickle hemoglobin nucleation," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 256, pp. 219–222, FEB 23 1996.
57. G. Christoph, J. Hofrichter, and W. Eaton, "Understanding the shape of sickled red cells," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 88, pp. 1371–1376, FEB 2005.
58. A. Mozzarelli, J. Hofrichter, and W. Eaton, "Delay time of hemoglobin-s polymerization prevents most cells from sickling invivo," *SCIENCE*, vol. 237, pp. 500–506, JUL 31 1987.
59. G. Agarwal, J. Wang, S. Kwong, S. Cohen, F. Ferrone, R. Josephs, and R. Briehl, "Sickle hemoglobin fibers: Mechanisms of depolymerization," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 322, pp. 395–412, SEP 13 2002.
60. R. Briehl, "Nucleation, fiber growth and melting, and domain formation and structure in sickle-cell hemoglobin gels," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 245, pp. 710–723, FEB 3 1995.
61. O. Galkin and P. Vekilov, "Mechanisms of homogeneous nucleation of polymers of sickle cell anemia hemoglobin in deoxy state," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 336, pp. 43–59, FEB 6 2004.
62. J. Wang, M. Turner, G. Agarwal, S. Kwong, R. Josephs, F. Ferrone, and R. Briehl, "Micromechanics of isolated sickle cell hemoglobin fibers: Bending moduli and persistence lengths," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 315, pp. 601–612, JAN 25 2002.
63. S. Embury, "The not-so-simple process of sickle cell vasoocclusion," *MICROCIRCULATION*, vol. 11, pp. 101–113, MAR-APR 2004.

64. R. Hebbel, "Beyond hemoglobin polymerization - the red-blood-cell membrane and sickle disease pathophysiology," *BLOOD*, vol. 77, pp. 214–237, JAN 15 1991.
65. J. Corbett, W. Mickols, and M. Maestre, "Effect of hemoglobin concentration on nucleation and polymer formation in sickle red-blood-cells," *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 270, pp. 2708–2715, FEB 10 1995.
66. D. Kaul, M. Fabry, P. Windisch, S. Baez, and R. Nagel, "Erythrocytes in sickle-cell-anemia are heterogeneous in their rheological and hemodynamic characteristics," *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, vol. 72, no. 1, pp. 22–31, 1983.
67. G. Nash, C. Johnson, and H. Meiselman, "Mechanical-properties of oxygenated red-blood-cells in sickle-cell (hbss) disease," *BLOOD*, vol. 63, no. 1, pp. 73–82, 1984.
68. G. Nash, C. Johnson, and H. Meiselman, "Influence of oxygen-tension on the viscoelastic behavior of red-blood-cells in sickle-cell disease," *BLOOD*, vol. 67, pp. 110–118, JAN 1986.
69. T. Itoh, S. Chien, and S. Usami, "Effects of hemoglobin concentration on deformability of individual sickle cells after deoxygenation," *BLOOD*, vol. 85, pp. 2245–2253, APR 15 1995.
70. M. Clark, J. Guatelli, N. Mohandas, and S. Shoet, "Influence of red-cell water-content on the morphology of sickling," *BLOOD*, vol. 55, no. 5, pp. 823–830, 1980.
71. N. Mohandas, M. Rossi, and M. Clark, "Association between morphological distortion of sickle cells and deoxygenation-induced cation permeability increase," *BLOOD*, vol. 68, pp. 450–454, AUG 1986.
72. C. Brugnara, H. Bunn, and D. Tosteson, "Regulation of erythrocyte cation and water-content in sickle-cell-anemia," *SCIENCE*, vol. 232, pp. 388–390, APR 18 1986.
73. E. Evans and N. Mohandas, "Membrane-associated sickle hemoglobin - a major determinant of sickle erythrocyte rigidity," *BLOOD*, vol. 70, pp. 1443–1449, NOV 1987.
74. T. Itoh, S. Chien, and S. Usami, "Deformability measurements on individual sickle cells using a new system with po2 and temperature control," *BLOOD*, vol. 79, pp. 2141–2147, APR 15 1992.

75. N. Mohandas and E. Evans, "Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial-cells - requirement for both cell-membrane changes and plasma factors," *BLOOD*, vol. 64, no. 1, pp. 282–287, 1984.
76. G. Barabina, L. McIntire, S. Eskin, D. Sears, and M. Udden, "Endothelial-cell interactions with sickle-cell, sickle trait, mechanically injured, and normal erythrocytes under controlled flow," *BLOOD*, vol. 70, pp. 152–157, JUL 1987.
77. D. Kaul, M. Fabry, and R. Nagel, "Microvascular sites and characteristics of sickle-cell adhesion to vascular endothelium in shear-flow conditions - pathophysiological implications," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 86, pp. 3356–3360, MAY 1989.
78. P. Abbyad, P.-L. Tharaux, J.-L. Martin, C. N. Baroud, and A. Alexandrou, "Sickling of red blood cells through rapid oxygen exchange in microfluidic drops," *LAB ON A CHIP*, vol. 10, no. 19, pp. 2505–2512, 2010.
79. J. M. Higgins, D. T. Eddington, S. N. Bhatia, and L. Mahadevan, "Sickle cell vasoocclusion and rescue in a microfluidic device," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 104, pp. 20496–20500, DEC 18 2007.
80. G. Serjeant, C. Ceulaer, R. Lethbridge, J. Morris, A. Singhal, and P. Thomas, "The painful crisis of homozygous sickle-cell disease - clinical-features," *BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY*, vol. 87, pp. 586–591, JUL 1994.
81. J. Switzer, D. Hess, F. Nichols, and R. Adams, "Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future," *LANCET NEUROLOGY*, vol. 5, pp. 501–512, JUN 2006.
82. O. Castro, D. Brambilla, B. Thorington, C. Reindorg, R. Scott, P. Gillette, J. Vera, P. Levy, R. Johnson, L. McMahon, O. Platt, K. Ohenefrempong, F. Gill, E. Vichinsky, B. Lubin, G. Bray, J. Kelleher, S. Leiken, A. Bank, S. Piomelli, W. Rosse, T. Kinney, L. Lessin, J. Smith, Y. Khakoo, H. Dosik, S. Diamond, R. Bellevue, W. Wang, J. Wilimas, P. Milner, A. Brown, S. Miller, R. Rieder, W. Lande, S. Embury, W. Mentzer, D. Wethers, R. Grover, M. Koshy, N. Talishy, C. Pegelow, P. Klug, M. Steinberg, A. Kraus, H. Zarkowsky, C. Dampier, H. Pearson, K. Ritchey, P. Levy, D. Gallagher, A. Koranda, Z. Fluornoygill, E. Jones, S. Mckinlay, E. Wright, L. Colangelo, S. Kasabula, M. Gaston, J. Verter, and C. Reid, "The acute chest syndrome in sickle-cell disease - incidence and risk-factors," *BLOOD*, vol. 84, pp. 643–649, JUL 15 1994.

83. F. Hunefeld, "Der chemismus in der tierescher organization," 1840.
84. T. Svedberg and R. Fahraeus, "A new method for the determination of the molecular weight of the proteins," *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, vol. 48, pp. 430–438, JAN 1926.
85. L. Pauling, H. Itano, S. Singer, and I. Wells, "Sickle cell anemia, a molecular disease," *SCIENCE*, vol. 110, no. 2865, pp. 543–548, 1949.
86. M. Perutz, M. Rossmann, A. Cullis, H. Muirhead, G. Will, and A. North, "Structure of haemoglobin - 3-dimensional fourier synthesis at 5.5-a resolution, obtained by x-ray analysis," *NATURE*, vol. 185, no. 4711, pp. 416–422, 1960.
87. W. Eaton, E. Henry, J. Hofrichter, and A. Mozzarelli, "Is cooperative oxygen binding by hemoglobin really understood?," *NATURE STRUCTURAL BIOLOGY*, vol. 6, pp. 351–358, APR 1999.
88. H. Muirhead, J. Cox, Mazzarel.L, and M. Perutz, "Structure and function of haemoglobin .3. a 3-dimensional fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5.5 a resolution," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 28, no. 1, pp. 117–&, 1967.
89. D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*. 2004.
90. I. Sherman, "The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from the sickle cell trait," *BULLETIN OF THE JOHNS HOPKINS HOSPITAL*, vol. 67, pp. 309–324, 1940.
91. G. Dykes, R. Crepeau, and S. Edelstein, "3-dimensional reconstruction of the 14-filament fibers of hemoglobin-s," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 130, no. 4, pp. 451–472, 1979.
92. R. Josephs, H. Jarosch, and S. Edelstein, "Polymorphism of sickle-cell hemoglobin fibers," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 102, no. 3, pp. 409–426, 1976.
93. B. Carragher, D. Bluemke, B. Gabriel, M. Potel, and R. Josephs, "Structural-analysis of polymers of sickle-cell hemoglobin .1. sickle hemoglobin fibers," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 199, pp. 315–331, JAN 20 1988.
94. E. Padlan and W. Love, "Refined crystal-structure of deoxyhemoglobin-s .2. molecular-interactions in the crystal," *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 260, no. 14, pp. 8280–8291, 1985.

95. R. Nagel, R. Bookchin, J. Johnson, D. Labie, H. Wajcman, W. Isaacsodeye, G. Honig, G. Schilirq, J. Crookston, and K. Matsutomo, "Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin-f and hemoglobin-a-2 on the polymerization of hemoglobin-s," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 76, no. 2, pp. 670–672, 1979.
96. J. Hofrichter, P. Ross, and W. Eaton, "Supersaturation in sickle-cell hemoglobin solutions," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 73, no. 9, pp. 3035–3039, 1976.
97. R. Williams, "Concerted formation of gel of hemoglobin-s - (hemoglobin-a sickle-cell anemia-ultracentrifugation-protein association)," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, vol. 70, no. 5, pp. 1506–1508, 1973.
98. Z. Kam and J. Hofrichter, "Quasi-elastic laser-light scattering from solutions and gels of hemoglobin-s," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 50, pp. 1015–1020, NOV 1986.
99. P. Ross, R. Briehl, and A. Minton, "Temperature-dependence of nonideality in concentrated-solutions of hemoglobin," *BIOPOLYMERS*, vol. 17, no. 9, pp. 2285–2288, 1978.
100. M. Goldberg, M. Husson, and H. Bunn, "Participation of hemoglobins a and f in polymerization of sickle hemoglobin," *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, vol. 252, no. 10, pp. 3414–3421, 1977.
101. J. Harris, "Studies on the destruction of red blood cells .8. molecular orientation in sickle cell hemoglobin solutions," *PROCEEDINGS OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, vol. 75, no. 1, pp. 197–201, 1950.
102. H. Sunshine, J. Hofrichter, F. Ferrone, and W. Eaton, "Oxygen binding by sickle-cell hemoglobin polymers," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 158, no. 2, pp. 251–273, 1982.
103. J. Hofrichter, "Ligand-binding and the gelation of sickle-cell hemoglobin," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 128, no. 3, pp. 335–&, 1979.
104. S. Gill, R. Benedict, L. Fall, R. Spokane, and J. Wyman, "Oxygen binding to sickle-cell hemoglobin," *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 130, no. 2, pp. 175–189, 1979.

105. M. Coletta, J. Hofrichter, F. Ferrone, and W. Eaton, "Kinetics of sickle hemoglobin polymerization in single red-cells," *NATURE*, vol. 300, no. 5888, pp. 194–197, 1982.
106. Y. Fung, *Biomechanics, mechanical properties of living tissues*. Springer, 1993.
107. S. Chien, "Shear dependence of effective cell volume as a determinant of blood viscosity," *SCIENCE*, vol. 168, no. 3934, pp. 977–&, 1970.
108. H. Goldsmith, "The microrheology of human erythrocyte suspensions," in *Theoretical and Applied Mechanics Proc. 13th UTAM Congress* (Springer, ed.), 1972.
109. S. Liu, L. Derick, S. Zhai, and J. Palek, "Uncoupling of the spectrin-based skeleton from the lipid bilayer in sickled red-cells," *SCIENCE*, vol. 252, pp. 574–576, APR 26 1991.
110. M. Sorette, M. Lavenant, and M. Clark, "Ektacytometric measurement of sickle-cell deformability as a continuous function of oxygen-tension," *BLOOD*, vol. 69, pp. 316–323, JAN 1987.
111. C. Allard, N. Mohandas, and M. Bessis, "Red-cell deformability changes in hemolytic-anemias estimated by diffractometric methods (ektacytometry) - preliminary-results," *BLOOD CELLS*, vol. 3, no. 1, pp. 209–221, 1977.
112. P. Klug, L. Lessin, and P. Radice, "Rheological aspects of sickle-cell disease," *ARCHIVES OF INTERNAL MEDICINE*, vol. 133, no. 4, pp. 577–590, 1974.
113. M. Messer and J. Harris, "Filtration characteristics of sickle cells - rates of alteration of filterability after deoxygenation and reoxygenation, and correlations with sickling and unsickling," *JOURNAL OF LABORATORY AND CLINICAL MEDICINE*, vol. 76, no. 4, pp. 537–&, 1970.
114. S. Chien, S. Usami, and J. Bertles, "Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia," *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, vol. 49, no. 4, pp. 623–&, 1970.
115. J. Jandl, W. Castle, and R. Simmons, "Red cell filtration and pathogenesis of certain hemolytic anemias," *BLOOD*, vol. 18, no. 2, pp. 133–&, 1961.
116. T. Itoh, S. Chien, and S. Usami, "Effects of hemoglobin concentration on deformability of individual sickle cells after deoxygenation," *BLOOD*, vol. 85, pp. 2245–2253, APR 15 1995.

117. G. Nash, C. Johnson, and H. Meiselman, "Rheologic impairment of sickle rbc's induced by repetitive cycles of deoxygenation-reoxygenation," *BLOOD*, vol. 72, pp. 539–545, AUG 1988.
118. E. Evans and N. Mohandas, "Membrane-associated sickle hemoglobin - a major determinant of sickle erythrocyte rigidity," *BLOOD*, vol. 70, pp. 1443–1449, NOV 1987.
119. E. Evans, N. Mohandas, and A. Leung, "Static and dynamic rigidities of normal and sickle erythrocytes - major influence of cell hemoglobin concentration," *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, vol. 73, no. 2, pp. 477–488, 1984.
120. G. Nash, C. Johnson, and H. Meiselman, "Influence of oxygen-tension on the viscoelastic behavior of red-blood-cells in sickle-cell disease," *BLOOD*, vol. 67, pp. 110–118, JAN 1986.
121. G. Nash, C. Johnson, and H. Meiselman, "Mechanical-properties of oxygenated red-blood-cells in sickle-cell (hbss) disease," *BLOOD*, vol. 63, no. 1, pp. 73–82, 1984.
122. C. Smith, J. Kuettner, D. Tukey, S. Burris, and J. White, "Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes," *BLOOD*, vol. 58, no. 1, pp. 71–77, 1981.
123. D. Kaul, D. Chen, and J. Zhan, "Adhesion of sickle cells to vascular endothelium is critically dependent on changes in density and shape of the cells," *BLOOD*, vol. 83, pp. 3006–3017, MAY 15 1994.
124. E. M. Finnegan, A. Turhan, D. E. Golan, and G. A. Barabino, "Adherent leukocytes capture sickle erythrocytes in an in vitro flow model of vaso-occlusion," *AMERICAN JOURNAL OF HEMATOLOGY*, vol. 82, pp. 266–275, APR 2007.
125. P. Frenette, "Sickle cell vasoocclusion: Heterotypic, multicellular aggregations driven by leukocyte adhesion," *MICROCIRCULATION*, vol. 11, pp. 167–177, MAR-APR 2004.
126. C. Anyaegbu, I. Okpala, Y. Aken'Ova, and L. Salimonu, "Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia (sca)," *EUROPEAN JOURNAL OF HAEMATOLOGY*, vol. 60, pp. 267–268, APR 1998.

127. R. P. Hebbel, "Adhesion of sickle red cells to endothelium: Myths and future directions,"
128. D. Kaul, M. Fabry, and R. Nagel, "The pathophysiology of vascular obstruction in the sickle syndromes," *BLOOD REVIEWS*, vol. 10, pp. 29–44, MAR 1996.
129. C. Reiter and M. Gladwin, "An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy," *CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY*, vol. 10, pp. 99–107, MAR 2003.
130. D. Bartolo, G. Degre, P. Nghe, and V. Studer, "Microfluidic stickers," *LAB ON A CHIP*, vol. 8, no. 2, pp. 274–279, 2008.
131. H. Shiku, T. Saito, C. Wu, T. Yasukawa, M. Yokoo, H. Abe, T. Matsue, and H. Yamada, "Oxygen permeability of surface-modified poly(dimethylsiloxane) characterized by scanning electrochemical microscopy," *CHEMISTRY LETTERS*, vol. 35, pp. 234–235, FEB 5 2006.
132. E. Chiang and P. Frenette, "Sickle cell vaso-occlusion," *HEMATOLOGY-ONCOLOGY CLINICS OF NORTH AMERICA*, vol. 19, pp. 771+, OCT 2005.
133. A. Aprelev, M. Rotter, Z. Etzion, R. Bookchin, R. Briehl, and F. Ferrone, "The effects of erythrocyte membranes on the nucleation of sickle hemoglobin," *BIOPHYSICAL JOURNAL*, vol. 88, pp. 2815–2822, APR 2005.
134. N. Shaklai, V. Sharma, and H. Ranney, "Interaction of sickle-cell hemoglobin with erythrocyte-membranes," *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA-BIOLOGICAL SCIENCES*, vol. 78, no. 1, pp. 65–68, 1981.
135. N. Tousi, B. Wang, K. Pant, M. F. Kiani, and B. Prabhakarandian, "Preferential adhesion of leukocytes near bifurcations is endothelium independent," *MICROVASCULAR RESEARCH*, vol. 80, pp. 384–388, DEC 2010.
136. T. Kinney, L. Sleeper, W. Wang, R. Zimmerman, C. Pegelow, K. Ohene-Frempong, D. Wethers, J. Bello, E. Vichinsky, F. Moser, D. Gallagher, M. DeBaun, O. Platt, and S. Miller, "Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: A risk factor analysis," *PEDIATRICS*, vol. 103, pp. 640–645, MAR 1999.
137. O. Platt, D. Brambilla, W. Rosse, P. Milner, O. Castro, M. Steinberg, and P. Klug, "Mortality in sickle-cell disease - life expectancy and risk-factors for early death," *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, vol. 330, pp. 1639–1644, JUN 9 1994.

138. E. Vichinsky, L. Styles, L. Colangelo, E. Wright, O. Castro, B. Nickerson, R. Johnson, L. McMahon, O. Platt, F. Gill, K. Frempong, S. Leikin, E. Vichinsky, B. Lubin, A. Bank, S. Piomelli, W. Rosse, J. Falletta, T. Kinney, L. Lessin, J. Smith, Y. Khakoo, R. Scott, C. Reindorf, H. Dosik, S. Diamond, R. Bellevue, W. Wang, J. Wilimas, P. Milner, A. Brown, S. Miller, R. Rieder, P. Gillette, W. Lande, S. Embury, W. Mentzer, D. Wethers, R. Grover, M. Koshy, N. Talishy, C. Pegelow, P. Klug, M. Steinberg, A. Kraus, H. Zarkowsky, C. Dampier, H. Pearson, A. Ritchey, P. Levy, D. Gallagher, A. Koranda, Z. FlournoyGill, E. Jones, S. McKinlay, B. Thorington, D. Brambilla, M. Gaston, C. Reid, D. Bonds, and J. Verter, "Acute chest syndrome in sickle cell disease: Clinical presentation and course," *BLOOD*, vol. 89, pp. 1787–1792, MAR 1 1997.
139. R. Rusconi, S. Lecuyer, N. Autrusson, L. Guglielmini, and H. A. Stone, "Secondary flow as a mechanism for the formation of biofilm streamers," *BIO-PHYSICAL JOURNAL*, vol. 100, pp. 1392–1399, MAR 16 2011.
140. R. Rusconi, S. Lecuyer, L. Guglielmini, and H. A. Stone, "Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers," *JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY INTERFACE*, vol. 7, pp. 1293–1299, SEP 6 2010.