



**HAL**  
open science

## Viscoélasticité du sang et du caillot

Etienne Ghiringhelli

► **To cite this version:**

Etienne Ghiringhelli. Viscoélasticité du sang et du caillot. Génie des procédés. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENI081 . tel-01154275

**HAL Id: tel-01154275**

**<https://theses.hal.science/tel-01154275>**

Submitted on 21 May 2015

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Mécanique des fluides, Procédés, Énergétique**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Etienne Ghiringhelli**

Thèse dirigée par **Benoît Polack**  
et codirigée par **François Caton**

préparée au sein **Laboratoire Rhéologie et Procédés UMR 5520**  
et de l'**École Doctorale Ingénierie - Matériaux Mécanique Énergétique**  
**Environnement Procédés Production**

# Viscoélasticité du sang et du caillot

Thèse soutenue publiquement le **21 mai 2014**,  
devant le jury composé de :

**M. Thomas Podgorski**

CR1, Université de Grenoble, Président

**M. Pierre Morange**

PU PH, Université Aix-Marseille, Rapporteur

**M. Xiong Wang**

PU, Université de Lorraine, Rapporteur

**M. José Maria Fullana**

PU, Université Pierre et Marie Curie, Examineur

**M. Benoît Polack**

PU PH, Université de Grenoble, Directeur de thèse

**M. François Caton**

CR1, Université de Grenoble, Co-Directeur de thèse





*À mon père.*



# Remerciements

Je souhaite particulièrement remercier le professeur Benoît Polack, directeur du laboratoire d'hématologie de Grenoble, et le docteur François Caton, chargé de recherche au CNRS, pour avoir encadré cette thèse. Leur implication de chaque instant dans ce projet, ainsi que leur perfectionnisme, leur niveau d'exigence et leurs grandes qualités humaines m'ont permis d'accomplir ce travail profondément enrichissant, malgré le lot d'épreuves en tout genre auxquelles nous avons été confrontés. Ils m'ont soutenu depuis mon premier stage de Master, et je leur en suis profondément reconnaissant.

Je remercie sincèrement le professeur Pierre Morange, directeur du laboratoire d'hématologie de l'hôpital de la Timone à Marseille, et le professeur Wang Xiong, de l'université de Lorraine, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au docteur Thomas Podgorski, de l'université de Grenoble, et le professeur José Maria Fullana, de l'université Pierre et Marie Curie, d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à la docteure Nadia El Kissi, directrice du laboratoire rhéologie et procédés, et au docteur Albert Magnin, ancien directeur de ce même laboratoire, pour m'avoir accueilli dans leur unité, pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles, et pour leur disponibilité et leur ouverture d'esprit.

Je tiens à témoigner de ma profonde reconnaissance envers le G.E.H.T. (*Groupe d'Étude sur l'Hémostase et la Thrombose*), présidé par le professeur Yves Gruel, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser le présent travail en finançant ma thèse.

Je remercie également le docteur Raphaël Marlu, du laboratoire d'hématologie de Grenoble, pour ses encouragements et sa sympathie naturelle, ainsi que Thérèse Rossini, technicienne du laboratoire d'hématologie de Grenoble. Tous deux m'ont de nombreuses fois fourni une aide précieuse en me procurant des protocoles pour réaliser les échantillons. Mes remerciements vont également à la docteure Christelle Yeromonahos, qui m'a accueilli dans le laboratoire de rhéologie lors de mon stage de Master, et qui m'a enseigné les techniques élémentaires pour la préparation des échantillons. J'ai beaucoup appris à ses côtés pendant la préparation de sa thèse, alors que je commençais la mienne au sein de la même équipe. Je remercie également Carhel Dassi, Xabel Garcia et Landry Seyve, tous trois en thèse dans notre équipe, pour leur soutien occasionnel, et pour la bonne ambiance qu'ils contribuent à faire régner dans, et hors des réunions de travail. Je tiens à remercier par la même occasion le docteur Denis Roux, la docteure Émeline Talansier, du laboratoire rhéologie et

procédés, pour leur sympathie et leur bienveillance à mon égard, ainsi que pour leur participation active dans certaines réunions de travail, qui m'ont permis d'explorer de nouvelles pistes et de tester certaines hypothèses nouvelles par leurs suggestions pertinentes.

Je veux exprimer ma reconnaissance à Didier Bleses, ingénieur d'étude au laboratoire rhéologie et procédés, qui a conçu les programmes informatiques nécessaires à la mise en œuvre de la méthode rhéométrique présentée dans ce travail, à Éric Faivre, assistant ingénieur au laboratoire de rhéologie, qui s'est toujours démené pour que nous puissions travailler dans de bonnes conditions, à la docteure Hélène Galliard, ingénieur de recherche au laboratoire rhéologie et procédés pour m'avoir formé à la rhéométrie, pour les nombreuses heures qu'elle a passé à m'aider dans la réalisation des mesures, et pour la quantité énorme de conseils qu'elle a pu me prodiguer pour que les mesures présentées dans ce travail soient de bonne qualité. Je remercie Frédéric Huguenell, ingénieur de recherche au laboratoire rhéologie et procédés, pour l'aide qu'il a pu me fournir pour la mise en place d'instruments, et surtout pour le bon temps passé en sa compagnie (« I would if I could!... »), ainsi que Mohamed Karrouch, technicien au laboratoire de rhéologie, qui n'a jamais hésité à me donner un coup de main que ce soit pour la conception mécanique ou pour réaliser des usinages. Je remercie également François Bergerot, Sylvie Garofalo et Claudine Ly-Lap (qui a malheureusement du traverser une terrible épreuve sur la fin de ce travail), tous trois assistants ingénieurs, pour leur gentillesse et leur bonne humeur, alors que nous ne leur facilitons pas les choses avec notre aversion pour les procédures administratives... De façon générale, je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire rhéologie et procédés, pour leur sympathie et pour la bonne ambiance qu'ils contribuent tous à y faire régner.

Je veux également exprimer ma reconnaissance au docteur Jean François Paliérne, de l'ENS de Lyon, pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé dans son laboratoire, afin que je puisse réaliser des mesures sur le matériel qu'il a développé.

Je remercie également mes compagnons thésards ou anciens thésards : le docteur Abdulgadir Abusaksaka pour sa générosité, Fiacre Ahonguio avec qui j'ai partagé un bureau pendant un bout de temps, et qui a du supporter mes tentatives horticoles, Nabil Ali, Mohammed Darbouli, Ozogul Hamdullah, Yao Jin qui a égaillé les pauses repas par ses commentaires lunaires et sa logique approximative, Chong Li qui s'est donné beaucoup de mal pour nous rendre plus accessible les digressions du précédent, et pour les cours de Chinois que tous deux nous ont prodigué à titre gracieux, le docteur Benoît Maisonneuve pour les pauses clopes (même sans clope), les excursions ninja toujours couronnées de succès, et les nombreux liens vers des vidéos échangés quand le travail se faisait trop laborieux, le docteur Guillaume Maitrejean qui avait pourtant essayé de me prévenir, Chourouk Mathlouti, le docteur Yannick Molméré pour avoir partagé avec nous sa grande connaissance des internets, et pour avoir régulièrement participé aux séances collectives de médisance, le docteur Nicolas Mougin pour l'intérêt qu'il peut avoir dans un tas de choses, et qui rendent toute

conversation avec lui enrichissante, Jérémy Patarin notamment pour m'avoir donné l'opportunité de travailler par la suite à Rhéonova, ainsi que les doctorants arrivés un peu plus tard, que je n'ai malheureusement pas eu le temps de mieux connaître.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma famille, et tout particulièrement à mon père Patrick Ghiringhelli que la sclérose latérale amniotrophique nous a ravi durant ma première année de thèse, et qui est pour moi une source d'inspiration de chaque instant en matière de force de caractère et de courage, et dont j'essaie de faire miens les principes. Je remercie ma mère Geneviève Ghiringhelli pour son allant et sa combativité, mes grand-mères Marie-Thérèse Ghiringhelli et Jacqueline Prêtre, mon oncle Yves Lopez et ma tante Annie Lopez, mes cousins et cousines, qui se sont intéressés à ce travail, ou qui m'ont soutenu d'une manière ou d'une autre. Bien sûr, je veux remercier tout particulièrement ma compagne Adrienne Chastaing, qui a supporté une quantité phénoménale de jérémiades en tout genre pendant cette épreuve, de réveils plus que matinaux et de couchers plus que nocturnes, des humeurs inégales et des caprices enfantins, et tout cela sans se plaindre. Elle m'a soutenu quand il le fallait, et m'a rabroué quand j'en avais besoin.



# Table des matières

<b>I. Introduction générale</b>	<b>9</b>
<b>II. Étude bibliographique</b>	<b>13</b>
<b>1. Rhéologie</b>	<b>17</b>
1.1. Introduction . . . . .	17
1.2. Rhéométrie . . . . .	17
1.2.1. Définitions : éléments de mécanique des milieux continus . . .	17
1.2.2. Lois de comportement . . . . .	19
1.2.3. Rhéométrie sur un matériau en évolution : Nombre de mutation	29
1.3. Rhéomètres . . . . .	31
1.3.1. Différents types de rhéomètres . . . . .	31
1.3.2. Différents types de géométrie . . . . .	32
1.4. Rhéologie des suspensions . . . . .	36
1.4.1. Suspensions de sphères dures . . . . .	37
1.4.2. Suspensions de particules non sphériques . . . . .	38
1.4.3. Suspensions de sphères déformables . . . . .	38
1.4.4. Suspensions d'agrégats . . . . .	38
<b>2. Le sang</b>	<b>41</b>
2.1. Introduction . . . . .	41
2.2. Rôle physiologique du sang . . . . .	41
2.3. Les différents composants sanguins . . . . .	42
2.3.1. Le plasma . . . . .	42
2.3.2. Les éléments figurés . . . . .	44
2.4. Agrégation des érythrocytes . . . . .	47
2.4.1. Forces d'interaction entre érythrocytes . . . . .	48
2.5. Paramètres influençant l'agrégation des érythrocytes . . . . .	53
2.5.1. Paramètres intrinsèques . . . . .	53
2.5.2. Paramètres extrinsèques . . . . .	56
2.6. Propriétés mécaniques du sang . . . . .	60
2.6.1. Problèmes spécifiques liés à la rhéométrie sanguine . . . . .	60

Table des matières

2.6.2. Caractère rhéofluidifiant du sang . . . . .	61
2.6.3. Seuil d'écoulement du sang . . . . .	63
2.6.4. Viscoélasticité du sang . . . . .	67
2.6.5. Paramètres influençant la viscoélasticité du sang . . . . .	73
2.7. Écoulements sanguins . . . . .	76

**III. Rhéométrie optimale par transformée de Fourier 79**

**3. Optimal Fourier Rheometry 83**

3.1. Introduction . . . . .	83
3.2. Dispositif expérimental . . . . .	85
3.2.1. Montage expérimental . . . . .	85
3.2.2. limites expérimentales . . . . .	86
3.2.3. Sensibilité à l'environnement vibratoire . . . . .	88
3.3. Optimal Fourier Rheometry : méthode et validation . . . . .	92
3.4. Validation . . . . .	101
3.4.1. Huile silicone newtonienne : Correction d'inertie du fluide . . .	101
3.4.2. CpCl NaSal . . . . .	102

**IV. Viscoélasticité du sang 109**

**4. Viscoélasticité du sang 113**

4.1. Introduction . . . . .	113
4.2. Problèmes expérimentaux sur le sang . . . . .	114
4.2.1. Adsorption de protéines à l'interface sang-air ou sang-huile . .	114
4.2.2. Domaine linéaire . . . . .	116
4.2.3. Effets temporels . . . . .	116
4.3. Matériaux et méthodes . . . . .	117
4.4. Paramètres influençant les propriétés viscoélastiques linéaires du sang	119
4.4.1. Analyse en fonction de l'hématocrite . . . . .	119
4.4.2. Analyse en fonction de la concentration en fibrinogène . . . .	119
4.4.3. Analyse en fonction de la concentration en albumine . . . . .	122
4.4.4. Analyse en fonction de la concentration en immunoglobulines G	123
4.5. Modèle empirique . . . . .	123
4.6. Propriétés rhéologiques du sang : un fluide viscoélastique percolé . . .	125

**V. Vers le suivi des propriétés mécaniques du caillot en forma-**

<b>tion</b>	<b>139</b>
<b>5. Vers le suivi de la coagulation</b>	<b>143</b>
5.1. Introduction . . . . .	143
5.1.1. L'hémostase . . . . .	143
5.1.2. Le fibrinogène . . . . .	143
5.1.3. Processus de formation du caillot . . . . .	144
5.1.4. Suivi mécanique de la formation du caillot sanguin . . . . .	145
5.2. Matériaux et méthodes . . . . .	147
5.3. Suivi mécanique de l'évolution du caillot sanguin au cours de sa formation . . . . .	148
5.3.1. Activation par voie de contact . . . . .	148
5.3.2. Activation par adjonction de facteur tissulaire . . . . .	151
<b>VI. Conclusion générale</b>	<b>157</b>



**Première partie .**  
**Introduction générale**



Le sang est un fluide complexe, composé d'eau, de protéines en solution et de cellules en suspension. Il est mis en écoulement par la pompe relativement peu puissante qu'est le cœur (environ  $1 W$ ), dans un réseau branché composé de plusieurs milliers de kilomètres de vaisseaux mis bout à bout. Pour que cela soit réalisable, il se peut que les propriétés mécaniques du sang contribuent à la génération et/ou à l'entretien de l'écoulement. Ces propriétés sont en grande partie dues à la formation d'agrégats de globules rouges sous l'effet de protéines plasmatiques.

Malgré le nombre important d'études sur le sujet, les propriétés mécaniques du sang n'ont jamais été caractérisées *in extenso* (viscoélasticité linéaire), et les paramètres qui influencent le plus celles-ci ne sont pas clairement établis. La plupart des travaux dans le domaine portent sur le caractère rhéofluidifiant du sang.

De plus, le sang est le point de départ du caillot sanguin. Par conséquent, la caractérisation de ses propriétés mécaniques est nécessaire si l'on souhaite comprendre les propriétés mécaniques du caillot au cours de la coagulation. La formation du caillot sanguin est déclenchée par la présence d'une brèche vasculaire, qui met en contact le sang et le facteur tissulaire présent dans le sous endothélium. S'ensuit une cascade de réactions enzymatiques, conduisant *in fine* à la production de thrombine qui active le fibrinogène en fibrine, conduisant à la formation des fibres de fibrine. Ces fibres se branchent, et forment progressivement un réseau qui va emprisonner les cellules sanguines, donnant naissance au caillot.

Le rôle physiologique du caillot est d'éviter un épanchement excessif de sang en présence d'une brèche vasculaire. Le caillot doit donc résister aux contraintes générées par l'écoulement sanguin. Les propriétés mécaniques du caillot sont donc étroitement liées à sa fonction.

Les pathologies vasculaires sont la première cause de mortalité en Europe : thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire, AVC, infarctus du myocarde, etc. Dans ce contexte, déterminer les propriétés mécaniques du caillot dans ces pathologies pourrait améliorer leur prise en charge, tout d'abord en étant capable de caractériser ce qu'est une coagulation normale d'un point de vue mécanique.

Que ce soit pour l'étude des propriétés mécaniques du sang, ou du caillot en cours de formation, la rhéométrie est un outil qui s'impose naturellement. Pour autant, différentes contraintes expérimentales restreignent drastiquement le champ des techniques qu'il est possible d'employer :

- la sédimentation des globules rouges, qui provoque petit à petit la mise en place d'un gradient de concentration de ceux-ci dans l'échantillon, et entraîne donc une variation temporelle de ses propriétés mécaniques ;
- la migration de protéines plasmatiques à l'interface entre le sang et l'air (ou l'huile) induit la formation d'un film viscoélastique qui va parasiter la mesure ;
- la variabilité biologique rend difficile toute caractérisation systématique ;
- le temps caractéristique de la coagulation est de l'ordre de la minute. Or, ce laps de temps ne permet actuellement qu'un suivi monofréquentiel de la coagulation. Pourtant, un suivi multifréquentiel est requis pour déterminer les propriétés

viscoélastiques linéaires.

Il est donc nécessaire à la fois de développer une méthode de mesure adaptée à un matériau de faible viscosité évoluant rapidement dans le temps, et également de mettre au point un protocole expérimental minimisant les effets de la variabilité biologique.

Tout d'abord, nous allons rapporter les divers éléments nécessaires à la compréhension de ce travail en introduisant les techniques qui seront utilisées, et en faisant le point sur les travaux existants. Par la suite, nous présenterons la nouvelle méthode de rhéométrie que nous avons développée, baptisée Optimal Fourier Rheometry (OFR), et qui permet de mesurer de façon fiable les propriétés mécaniques d'un échantillon évoluant de manière rapide dans le temps. Cette méthode sera validée sur différents matériaux modèles. Nous exploiterons ensuite cette méthode afin de caractériser le sang dans son domaine linéaire, et nous développerons à cette occasion un « sang modèle » afin de nous affranchir au maximum de la variabilité biologique. Enfin, nous utiliserons l'OFR pour mesurer les propriétés mécaniques de caillots de sang total, formés par l'activation de la voie extrinsèque ou intrinsèque, au cours de leur formation.

**Deuxième partie .**  
**Étude bibliographique**



# Table des matières

---

<b>1. Rhéologie</b>	<b>17</b>
1.1. Introduction . . . . .	17
1.2. Rhéométrie . . . . .	17
1.2.1. Définitions : éléments de mécanique des milieux continus . . .	17
1.2.2. Lois de comportement . . . . .	19
1.2.3. Rhéométrie sur un matériau en évolution : Nombre de mutation	29
1.3. Rhéomètres . . . . .	31
1.3.1. Différents types de rhéomètres . . . . .	31
1.3.2. Différents types de géométrie . . . . .	32
1.4. Rhéologie des suspensions . . . . .	36
1.4.1. Suspensions de sphères dures . . . . .	37
1.4.2. Suspensions de particules non sphériques . . . . .	38
1.4.3. Suspensions de sphères déformables . . . . .	38
1.4.4. Suspensions d'agrégats . . . . .	38
<b>2. Le sang</b>	<b>41</b>
2.1. Introduction . . . . .	41
2.2. Rôle physiologique du sang . . . . .	41
2.3. Les différents composants sanguins . . . . .	42
2.3.1. Le plasma . . . . .	42
2.3.2. Les éléments figurés . . . . .	44
2.4. Agrégation des érythrocytes . . . . .	47
2.4.1. Forces d'interaction entre érythrocytes . . . . .	48
2.5. Paramètres influençant l'agrégation des érythrocytes . . . . .	53
2.5.1. Paramètres intrinsèques . . . . .	53
2.5.2. Paramètres extrinsèques . . . . .	56

*TABLE DES MATIÈRES*

2.6.	Propriétés mécaniques du sang . . . . .	60
2.6.1.	Problèmes spécifiques liés à la rhéométrie sanguine . . . . .	60
2.6.2.	Caractère rhéofluidifiant du sang . . . . .	61
2.6.3.	Seuil d'écoulement du sang . . . . .	63
2.6.4.	Viscoélasticité du sang . . . . .	67
2.6.5.	Paramètres influençant la viscoélasticité du sang . . . . .	73
2.7.	Écoulements sanguins . . . . .	76

---

# 1. Rhéologie

## 1.1. Introduction

La rhéologie étudie le lien entre la déformation, ou l'écoulement de la matière et les contraintes qu'ils subissent ou génèrent. L'invention du terme rhéologie est attribué à Eugène Bingham et Markus Reiner, à partir du verbe grec «  $\rho\epsilon\omega$  » qui signifie « couler ». La naissance de la rhéologie est liée la nécessité de décrire les propriétés d'une large gamme de matériaux dont le comportement est intermédiaire entre le fluide et le solide, et qui ne rentre ni dans le cadre de la théorie de l'élasticité Hookéenne, ni dans celui de la mécanique des fluides Newtonienne. Ces deux lois apparaissent en rhéologie comme des cas limites. Il convient de distinguer rhéologie et rhéométrie. En effet, la rhéométrie s'attache à mesurer les propriétés de l'écoulement des matériaux, tandis que la rhéologie a pour but de mettre à jour les équations constitutives des matériaux, reliant contraintes et déformations.

La rhéologie trouve de nombreuses applications dans la vie courante. Dans l'industrie, elle est largement utilisée dans les domaines pétroliers, cosmétiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires etc.

Cette partie est largement inspirée de l'ouvrage de Macosko *Rheology : principles, measurements, and applications* [Macosko, 1994].

## 1.2. Rhéométrie

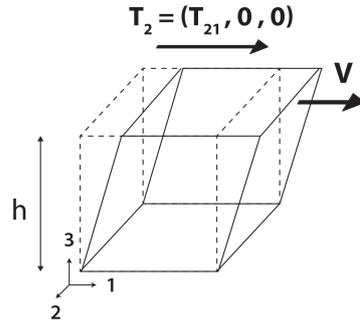
### 1.2.1. Définitions : éléments de mécanique des milieux continus

#### 1.2.1.1. Écoulements cisailés

Lorsqu'un matériau en mouvement ne glisse pas sur une paroi, il existe nécessairement un gradient de cisaillement à proximité de celle-ci. Par conséquent, la rhéologie en cisaillement simple permet de déterminer les propriétés d'un matériau en écoulement.

La façon la plus simple d'introduire le cisaillement est de considérer le cas le plus élémentaire : le cisaillement simple plan. On se place donc dans le cas particulier d'un matériau confiné entre deux plans parallèles distants d'une hauteur  $h$  (voir figure 1.1). Le plan du dessus est mobile et animé d'un mouvement de translation uniaxiale à la vitesse  $V$  selon l'axe  $x_1$ . Le plan du dessous est fixe. Supposons que

## 1. Rhéologie



**Figure 1.1.:** Schéma représentant un écoulement de type cisaillement plan simple.

l'écoulement est laminaire, et qu'il n'y a pas de glissement au niveau des plans. Nous avons alors :

$$\begin{aligned}v_1(x_2 = 0) &= 0 \\v_1(x_2 = h) &= V\end{aligned}$$

Dans ces conditions, la déformation du matériau s'effectue par un glissement relatif des différentes couches infinitésimales constituant le matériau sans transfert de matière d'une couche à l'autre. L'écoulement est plan, et seule la composante de vitesse selon  $x_1$  est non nulle. Le profil de vitesse est donc défini par :

$$v_1(x_2) = \frac{V}{h}x_2$$

Le taux de cisaillement  $\dot{\gamma}$  est alors défini par :

$$\dot{\gamma} = \frac{V}{h}$$

Avec un raisonnement de proche en proche, on peut déterminer que le mouvement relatif de chaque couche de matériau induit une force de friction qui correspond à la force nécessaire pour mouvoir le plan supérieur. La contrainte de cisaillement est donnée par :

$$\tau = \frac{F}{A}$$

Où  $F$  est la force nécessaire pour mouvoir le plan supérieur, et  $A$  l'aire du plan supérieur.

La viscosité de cisaillement  $\eta$  d'un matériau peut être définie comme le rapport entre la contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Dans le plus simple des cas, le fluide est Newtonien. La viscosité de cisaillement est donc une constante, et la contrainte de cisaillement est directement proportionnelle au taux de cisaillement.

Pour des fluides complexes en revanche, la relation entre contrainte et taux de cisaillement n'est pas aussi simple. Notamment, le cisaillement peut induire des forces normales, et la contrainte de cisaillement subie par le matériau peut être une fonction du taux de cisaillement et du temps. Il est néanmoins possible de définir la viscosité apparente de cisaillement par la relation :

$$\eta(\dot{\gamma}, t) = \frac{\tau(\dot{\gamma}, t)}{\dot{\gamma}}$$

## 1.2.2. Lois de comportement

### 1.2.2.1. Lois d'écoulement et de déformation de fluides visqueux

Dans l'ensemble des fluides visqueux existants, on rencontre un grand nombre de lois de comportement différentes. Il en existe deux grandes familles :

- Les lois indépendantes du temps (voir ci-dessous),
- Les lois dépendantes du temps (comportement thixotrope, comportement rhéopexe).

Les comportements indépendants du temps et les comportements dépendants du temps sont tout deux dus aux modifications de structure interne du matériau. La différence réside dans les temps caractéristiques des modifications de celle-ci. Si les modifications sont rapides, alors le temps n'apparaîtra pas explicitement dans les équations d'écoulement. En revanche, si les modifications sont lentes, la viscosité apparente mesurée dépendra du temps.

Dans la suite de ce travail, nous ne ferons référence qu'à des comportements indépendants du temps. Par conséquent, seuls ceux-ci seront plus amplement développés dans cette partie.

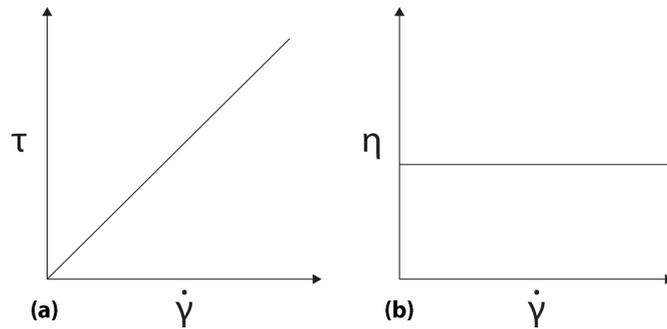
Il est à noter que certains matériaux peuvent présenter plusieurs types de comportements sur une large gamme de taux de cisaillement.

De nombreux modèles rhéologiques ont été proposés pour décrire le comportement visqueux des matériaux. Nous n'en ferons pas ici un catalogue exhaustif.

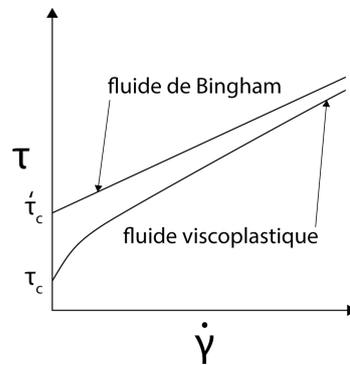
#### 1.2.2.1.1. Comportement Newtonien

Un fluide Newtonien a une viscosité apparente qui ne dépend pas du taux de cisaillement appliqué (voir figure 1.2 (b)). La contrainte varie en fonction du taux de cisaillement appliqué de façon linéaire (voir figure 1.2 (a)).

## 1. Rhéologie



**Figure 1.2.:** (a). Relation entre viscosité et taux de cisaillement typique d'un fluide Newtonien. (b). Relation entre contrainte et taux de cisaillement typique d'un fluide Newtonien.



**Figure 1.3.:** Relation entre contrainte et taux de cisaillement typique d'un fluide viscoplastique.

La loi de comportement Newtonien s'écrit :

$$\eta = \text{constante}$$

La viscosité  $\eta$  ne dépend ni du temps, ni du taux de cisaillement.

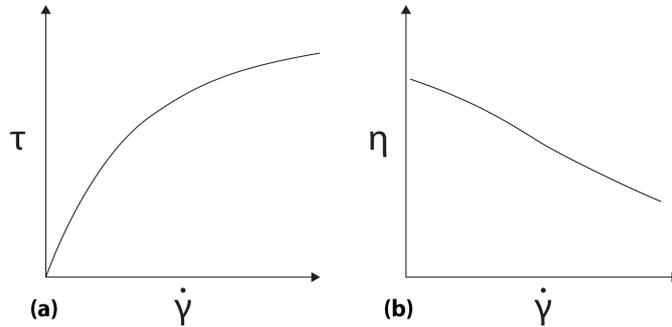
### 1.2.2.2. Comportement viscoplastique : fluide à seuil

Un matériau est dit viscoplastique lorsque son rhéogramme présente l'aspect caractéristique de la figure 1.3.

On peut ajuster le rhéogramme des fluides viscoplastiques pas la loi d'Herschel-Bulkley :

$$\tau = \tau_c + k\dot{\gamma}^n \quad (1.1)$$

Dans ce cas,  $n$  est appelé indice d'écoulement et  $k$  consistance. Ce sont des paramètres empiriques.



**Figure 1.4.:** (a). Relation entre contrainte et taux de cisaillement typique d'un fluide rhéofluidifiant. (b). Relation entre viscosité et taux de cisaillement typique d'un fluide rhéofluidifiant.

Les fluides de Bingham représentent un cas particulier de fluides viscoplastiques, pour lesquels  $n = 1$ . La relation 1.1 s'écrit alors :

$$\tau = \tau'_c + k\dot{\gamma}$$

Les matériaux viscoplastiques sont également appelés *fluides à seuil*. En effet, il est nécessaire d'exercer une contrainte supérieure à une valeur critique  $\tau_c$  pour provoquer un écoulement. Cette dernière est appelée contrainte seuil.

De nombreux matériaux de la vie courante sont considérés comme des fluides à seuil, notamment le dentifrice, certaines peintures etc.

### 1.2.2.2.1. Comportement rhéofluidifiant

Un matériau est dit rhéofluidifiant (ou pseudo-plastique) lorsque sa viscosité diminue quand le taux de cisaillement augmente (voir figure 1.4).

La majorité des matériaux ont un comportement rhéofluidifiant. L'origine de celui-ci dépend du type de matériau. Par exemple, pour une suspension de particules anisométriques, la rhéofluidification résulte de l'orientation des particules selon les lignes de courant de l'écoulement, réduisant ainsi la dissipation hydrodynamique. Pour des suspensions agrégées, la rhéofluidification résulte de la destruction des agrégats par le cisaillement.

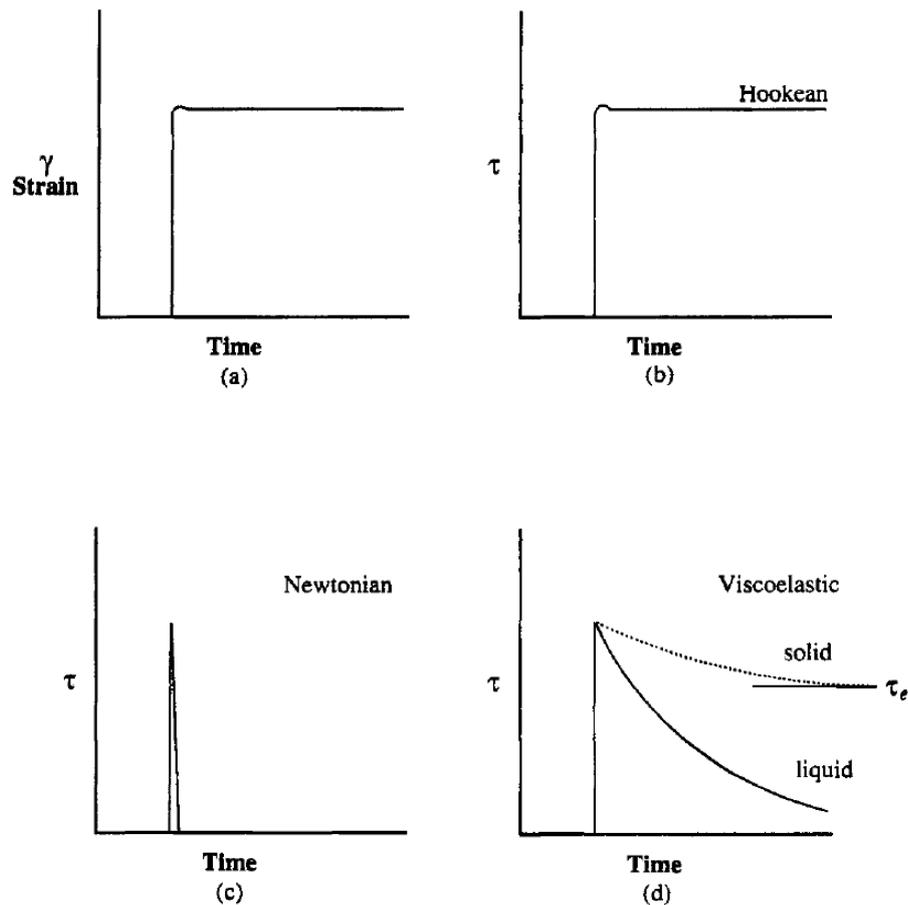
Il existe énormément de modèles pour décrire le caractère rhéofluidifiant, comme par exemple la loi d'Ostwald :

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \text{ avec } n < 1$$

### 1.2.2.3. Viscoélasticité

Les lois qui relient contraintes et déformations pour un solide Hookéen et pour un fluide Newtonien sont bien connues depuis le XVIIIème siècle, grâce aux travaux

## 1. Rhéologie



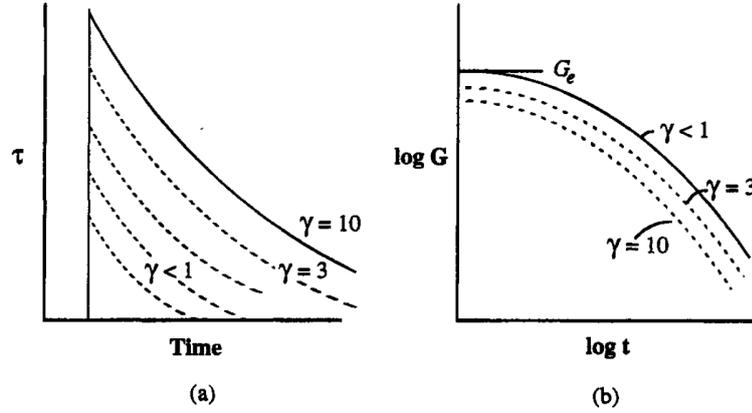
**Figure 1.5.:** Contraintes caractéristiques en réponse à la déformation temporelle appliquée (a) pour : (b) un solide Hookéen parfait, (c) un fluide Newtonien et (d) un matériau viscoélastique (d'après [Macosko, 1994]).

respectifs de Hooke et Newton. La relaxation de contrainte est un essai classique en rhéologie (voir section 1.2.2.4). Soumis à un échelon de déformation, un solide Hookéen ne relaxe pas la contrainte (voir figure 1.5 (b)). À l'opposé, un fluide Newtonien relaxe la contrainte très rapidement (voir figure 1.5 (c)).

De façon générale, les matériaux ne répondent à une sollicitation mécanique ni selon la loi d'état d'un solide Hookéen, ni selon celle d'un fluide Newtonien. En d'autres termes, lorsqu'une déformation est appliquée, le matériaux relaxe la contrainte avec une certaine échelle de temps (voir figure 1.5 (c)). C'est cette réponse dépendante du temps qui est appelée *viscoélasticité*.

On dira d'un matériau viscoélastique que c'est un *fluide viscoélastique* s'il relaxe complètement la contrainte. Un *solide viscoélastique* ne relaxera qu'une partie de la contrainte, et atteindra de façon asymptotique une valeur résiduelle.

En pratique, les données de relaxation de contrainte peuvent être traduites en



**Figure 1.6.:** (a). Relaxation de contrainte pour un échantillon de polydiméthylsiloxane pour différentes valeurs de déformation. (b). Module de cisailment temporel correspondant aux relaxations de contrainte en (a). Les données à faible déformation donnent toutes un module  $G$  temporel identique (d'après [Macosko, 1994]).

module de relaxation en utilisant la relation ci-dessous :

$$G(t, \gamma) = \frac{\tau(t, \gamma)}{\gamma}$$

Lorsque la déformation est en dessous d'un seuil critique  $\gamma_c$ , toutes les mesures donnent une même dépendance temporelle du module de relaxation (voir figure 1.6). La plage de déformation pour laquelle le module de relaxation ne dépend pas de la déformation appliquée  $[0 ; \gamma_c]$  est appelée *domaine linéaire* du matériau. C'est également la plage de contrainte pour laquelle la déformation varie de façon linéaire avec la contrainte.

On peut alors écrire :

$$G(t) = \frac{\tau(t)}{\gamma} \text{ pour } \gamma \in [0 ; \gamma_c]$$

Une autre façon plus mathématique de définir le comportement linéaire d'un matériau est de dire que son équation rhéologique d'état  $\gamma = f(\tau)$  est linéaire. Cela signifie que :

$$\forall [\tau_1; \tau_2], \forall \lambda \in \mathbb{R} \begin{cases} f(\tau_1 + \tau_2) = f(\tau_1) + f(\tau_2) \\ f(\lambda \tau_1) = \lambda f(\tau_1) \end{cases}$$

Tous les matériaux présentent en pratique un comportement linéaire, à condition que les déformations qu'on lui impose soient assez faibles.

Lorsque  $\gamma > \gamma_c$ , le module de relaxation n'est plus indépendant de la contrainte. Cette phase dans laquelle le module de relaxation dépend de la contrainte est appelée *viscoélasticité non-linéaire* du matériau.

## 1. Rhéologie

Dans le régime linéaire, les matériaux supportent les déformations sans aucune altération de leur microstructure. C'est pourquoi on peut caractériser une mesure dans le domaine linéaire de mesure non destructrice ou non invasive. Dans le régime non linéaire, en revanche, le comportement des matériaux peut résulter entre autres de modifications microstructurelles, ou de non linéarités dans les interactions au sein de la microstructure.

Supposons qu'une faible variation de la déformation entraîne une faible variation de la contrainte mesurée sur un matériau :

$$d\tau = Gd\gamma$$

Ce que l'on peut écrire de la façon suivante :

$$d\tau = G \frac{d\gamma}{dt} dt = G\dot{\gamma} dt$$

En intégrant cette équation jusqu'à l'instant  $t$ , on obtient :

$$\tau = \int_{-\infty}^t G(t-t')\dot{\gamma}(t')dt'$$

Et en posant  $s = t - t'$ , on a :

$$\tau = \int_0^{\infty} G(s)\dot{\gamma}(t-s)ds \quad (1.2)$$

Cette équation décrit la viscoélasticité linéaire de manière générale. La contrainte est donc l'intégrale sur le temps passé du produit du module de relaxation et du taux de déformation.

### 1.2.2.4. Fonctions matérielles

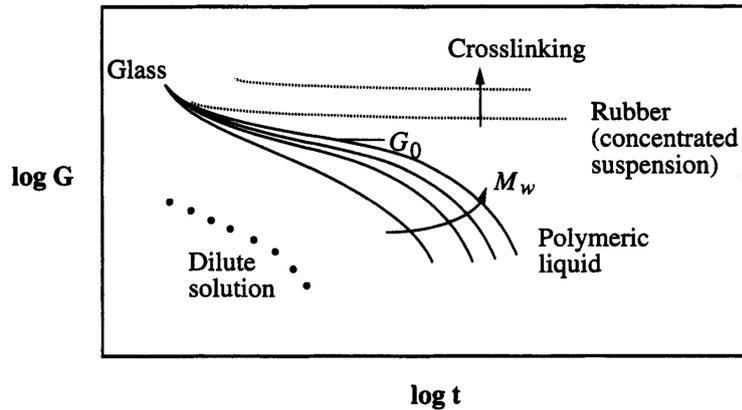
En rhéologie, plusieurs types d'expériences sont utilisées. Parmi celles-ci, les plus courantes sont les oscillations, la relaxation de contrainte et le fluage.

Dans le domaine viscoélastique linéaire, toutes les expériences à faible déformation sont reliées par l'intermédiaire de  $G(t)$  comme dans l'équation 1.2. Dans le domaine non linéaire, le passage entre ces différentes grandeurs est un sujet encore discuté.

Dans le déroulement de cette thèse, nous utiliserons exclusivement des techniques oscillatoires. Par conséquent, ces méthodes feront l'objet dans cette partie de plus amples développements que les autres.

### Relaxation de contrainte

Comme expliqué en introduction de cette partie, lors d'un essai de relaxation de contrainte, on applique au matériau un échelon de déformation  $\gamma_0$ , et l'on mesure



**Figure 1.7.:** Modules de relaxation typiques pour différents matériaux (d'après [Macosko, 1994]).

la contrainte qui en résulte au cours du temps  $\tau(t)$ . On extrait de ces données le module de relaxation  $G(t)$ , qui se calcule ainsi :

$$G(t) = \frac{\tau(t)}{\gamma_0}$$

Les modules de relaxation typiques de différents matériaux sont représentés dans la figure 1.7.

Il est à noter qu'expérimentalement, il est impossible d'imposer instantanément une déformation  $\gamma_0$ . Tout dispositif expérimental nécessite un temps de stabilisation de quelques fraction de secondes pour imposer une déformation. Par conséquent, il est difficile d'avoir des points corrects de modules de relaxation à des temps très faible.

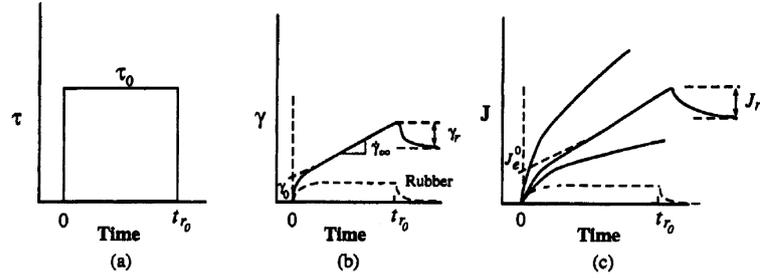
## Fluage

Lors d'un essai de fluage, on applique un échelon de contrainte  $\tau_0$  au matériau, et on mesure la déformation qui en résulte. De cela, on extrait la complaisance  $J(t)$  comme suit (voir figure 1.8) :

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0}$$

Bien que  $J$  ait l'unité inverse de celle d'un module de relaxation, la relation  $J = \frac{1}{G}$  n'est pas vérifiée de façon générale. De même que pour le module de relaxation, les complaisances pour toute contrainte  $\tau$  dans le domaine linéaire sont superposées. En effet, dans le domaine linéaire, la relation entre la contrainte et la déformation est linéaire.

## 1. Rhéologie



**Figure 1.8.:** Mesures de fluage. (a). Échelon de contrainte appliqué au matériau. (b). Déformation enregistrée en fonction du temps. (c). Données représentées en tant que complaisance  $J(t)$  (d'après [Macosko, 1994]).

Un autre type d'expérience menée souvent de façon conjointe à un fluage est la relaxation de fluage. Cette mesure consiste à supprimer brutalement l'échelon de contrainte à  $\tau_0$ , et de mesurer le « recul de déformation » engendré (voir figure 1.8). La fonction de recouvrance de fluage est alors définie comme suit :

$$J_r(t) = \frac{\gamma_r(t)}{\tau_0}$$

### 1.2.2.4.1. Oscillations sinusoïdales

La méthode d'oscillations sinusoïdale est une importante technique de mesure à petite déformation. Elle consiste à appliquer au matériau une déformation sinusoïdale telle que :

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (1.3)$$

Après une phase de mise en route, la contrainte mesurée sera elle aussi sinusoïdale de même fréquence, mais généralement déphasée de  $\delta$  par rapport à la déformation, c'est à dire :

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta)$$

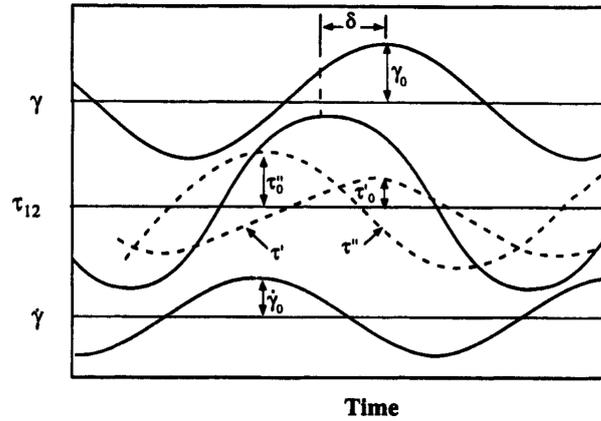
Dans le cas des déformations de petite amplitude, la contrainte est décomposée en sa contribution  $\tau'$  en phase avec la déformation, et sa contribution  $\tau''$  en quadrature avec la déformation (ou en phase avec  $\dot{\gamma}$ , voir figure 1.9) :

$$\tau(t) = \tau'(t) + \tau''(t) = \tau'_0 \sin(\omega t) + \tau''_0 \cos(\omega t)$$

Avec :

$$\tau'(t) = \tau'_0 \sin(\omega t)$$

$$\tau''(t) = \tau''_0 \cos(\omega t)$$



**Figure 1.9.:** Principe de décomposition de la contrainte en une composante  $\tau'$  en phase avec la déformation, et une composante  $\tau''$  en quadrature avec la déformation (d'après [Macosko, 1994]).

Ainsi, nous pouvons définir deux modules. Le premier est le module élastique, autrement appelé module de conservation, en phase avec la déformation :

$$G' = \frac{\tau_0'}{\gamma_0}$$

Le second est le module de viscosité, ou module de dissipation, en quadrature avec la déformation :

$$G'' = \frac{\tau_0''}{\gamma_0}$$

De façon équivalente, les modules d'élasticité et de viscosité peuvent être calculés de la manière suivante :

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta)$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta)$$

Enfin, on peut également définir le module complexe  $G^*$  du matériau. En effet, en notation complexe, on pose :

$$\gamma^* = \gamma_0 e^{i\omega t}$$

$$\tau^* = \tau_0 e^{i\omega t + \delta}$$

Par conséquent, la déformation  $\gamma$  est la partie imaginaire du nombre complexe  $\gamma^*$ ,  $\tau'$  la partie réelle de  $\tau^*$  et  $\tau''$  la partie imaginaire de  $\tau^*$ .

## 1. Rhéologie

Le module complexe  $G^*$  est défini par la relation suivante :

$$\tau^* = G^* \gamma^* \quad (1.4)$$

Ainsi, on montre que :

$$G^* = G' + iG'' \quad (1.5)$$

Le module complexe ne dépend que de la pulsation  $\omega$ .

Alors, on a :

$$G^* = \frac{\tau^*}{\gamma^*}$$

Il est à noter que l'on peut également utiliser la viscosité complexe  $\eta^*$  pour caractériser les propriétés viscoélastiques du matériau [Bird *et al.*, 1987] :

$$\eta^* = \eta' + i\eta''$$

Où :

$$\eta' = \frac{\tau_0''}{\dot{\gamma}_0}$$
$$\eta'' = \frac{\tau_0'}{\dot{\gamma}_0}$$

Les modules  $G^*$  et  $\eta^*$  sont par conséquent reliés par la relation :

$$\eta' = \frac{G''}{\omega}$$
$$\eta'' = \frac{G'}{\omega}$$

### Fourier Transform Mechanical Spectroscopy

La méthode usuelle de mesure des modules viscoélastiques consiste à appliquer successivement des sinusoides monofréquentielles. Or temporellement cela a un coût, puisque les rhéomètres appliquent généralement une sinusoïde pendant plusieurs périodes (typiquement trois) afin d'extraire les modules. Ainsi, des mesures nécessitant l'acquisition de plusieurs points à basse fréquence seront particulièrement longues.

Pour palier cet inconvénient, le groupe de Winter a introduit une technique oscillatoire nommée FTMS [Holly *et al.*, 1988]. FTMS est l'acronyme de *Fourier Transform Mechanical Spectroscopy*. Le principe de cette méthode est d'appliquer une déformation composée d'une fréquence fondamentale, et de plusieurs de ses harmoniques superposées.

Ainsi, dans le domaine linéaire du matériau, la contrainte et la déformation sont décrites par la relation suivante :

$$\begin{cases} \gamma = \sum_i^n \gamma_i \sin(m_i \omega t) \\ \tau = \sum_i^n \tau_i \sin(m_i \omega t + \delta(m_i \omega)) \end{cases}$$

avec :  $(i, m_i) \in \mathbb{N}^2$

Ainsi, en notant  $\omega_i = m_i \omega$  avec  $\omega_0 = \omega$ , les modules viscoélastiques du matériaux sont déduits des mesures par la relation suivante :

$$\begin{aligned} G'(\omega_i) &= \frac{\tau_i}{\gamma_i} \cos(\delta(m_i \omega)) \\ G''(\omega_i) &= \frac{\tau_i}{\gamma_i} \sin(\delta(m_i \omega)) \end{aligned}$$

En pratique, le temps de mesure est d'environ 5 fois la période du fondamental (bien que théoriquement celui-ci pourrait être plus court) [Macosko, 1994]. Cette méthode propose donc un gain de temps important comparé à la méthode traditionnelle de balayage discret en fréquence, qui réclamera quant à elle en pratique 5 fois la période de chaque fréquence appliquée.

En revanche, chaque sinusoïde superposée ajoute sa contribution à la déformation. Par conséquent, le nombre d'harmoniques superposées au fondamental doit être choisi de manière à :

- Conserver une sensibilité suffisante pour que la contribution de chaque harmonique à la contrainte (et à la déformation) soit dans la gamme de mesure de l'appareil utilisé,
- Rester dans le domaine linéaire du matériau étudié malgré la superposition des différentes harmoniques qui contribuent chacune à la déformation globale.

### 1.2.3. Rhéométrie sur un matériau en évolution : Nombre de mutation

Des phénomènes tels que la gélification, la transition de phase ou la polymérisation sont dépendants du temps. Lorsque l'on souhaite réaliser une mesure valide sur un matériau qui évolue avec le temps, il est nécessaire que le temps caractéristique d'évolution du matériau soit grand devant le temps requis pour l'acquisition d'un point (c'est à dire que l'échantillon soit stable au cours de la mesure). En effet, si cette condition n'est pas remplie, le matériau aura significativement évolué entre le début et la fin de l'acquisition, biaisant le résultat.

Winter a introduit un critère quantitatif pour que cette condition soit remplie [Winter *et al.*, 1988] [Mours et Winter, 1994]. Il a défini le nombre de mutation  $N_{mu}^x$

## 1. Rhéologie

de la grandeur mesurée  $x$  par :

$$N_{mu}^x(t) = \frac{\Delta t}{\lambda_{mu}^x(t)}$$

Avec :

- $\Delta t$  le temps caractéristique d'acquisition d'un point de mesure,
- $\lambda_{mu}^x$  le temps caractéristique d'évolution de la grandeur  $x$  du matériau à l'instant  $t$ .

Le temps caractéristique d'évolution  $\lambda_{mu}^x$  de la grandeur  $x$  au temps  $t$  est donné par la relation :

$$\lambda_{mu}^x(t) = \left( \frac{1}{x(t)} \frac{\partial x(t)}{\partial t} \right)^{-1}$$

Le critère du nombre de mutation stipule que, pour que la mesure de la grandeur  $x$  à l'instant  $t$  soit considérée comme valide, il est nécessaire que :

$$\forall t, N_{mu}^x(t) \ll 1$$

En pratique, si l'on souhaite suivre l'évolution des modules viscoélastiques  $G'$  et  $G''$  en utilisant une mesure dont l'acquisition d'un point dure  $\Delta t$ , il est nécessaire *a posteriori* de vérifier la condition suivante :

$$\forall t, \begin{cases} \Delta t \frac{1}{G'(t)} \frac{\partial G'(t)}{\partial t} \ll 1 \\ \Delta t \frac{1}{G''(t)} \frac{\partial G''(t)}{\partial t} \ll 1 \end{cases}$$

Supposons que l'on souhaite réaliser une mesure sur deux décades de fréquence entre 0,1 et 10 Hz avec 5 points par décade échantillonnés en échelle logarithmique. Les points sont alors obtenus aux fréquences suivantes : 0,1 Hz, 0,158 Hz, 0,251 Hz, 0,398 Hz, 0,631 Hz, 1 Hz, 1,58 Hz, 2,51 Hz, 3,98 Hz, 6,31 Hz et 10 Hz.

À l'aide de la méthode classique (balayage discret en fréquence, voir section 1.2.2.4.1), le temps de mesure est donné en théorie par 3 fois la période d'oscillation. Cela correspond pour cet exemple à un temps de mesure théorique d'environ 80 s. Pour que le critère du nombre de mutation soit respecté, nous considérerons que sur la majeure partie du suivi, il est nécessaire que le temps caractéristique d'évolution du matériau soit 5 fois supérieur au temps caractéristique de mesure. Dans ces conditions, on ne peut réaliser de mesure un matériau dont les modules ont un temps caractéristique d'évolution inférieur à 400 s, soit environ 7 minutes. En pratique, nous avons pu observer des temps de mesure supérieurs en utilisant les procédures implémentées par défaut sur les rhéomètres, de l'ordre de 100 s avec un Ares ou Ares-G2 (TA instruments, États-Unis), et de l'ordre de 500 s avec un MCR 501 (Anton-Paar, Autriche). Dans ces conditions, il n'est pas possible de suivre

l'évolution de matériaux dont les modules évoluent avec des temps caractéristiques inférieurs à 500 s (8 minutes) pour l'Ares ou l'Ares-G2, et de 2500 s (environ 40 minutes) pour le MCR 501.

En utilisant cette fois-ci la FTMS (voir section 1.2.2.4.1), nous sommes confrontés à plusieurs contraintes interdépendantes :

- l'échantillonnage en fréquence est lié au nombre de fréquences que l'on ajoute, par conséquent un échantillonnage acceptable implique un grand nombre de sinusoïdes superposées ;
- la sensibilité du matériel utilisé pour la mesure doit être pris en compte, il est donc nécessaire que chaque sinusoïde superposée ait une amplitude suffisamment élevée pour être mesurable ;
- la FTMS étant une technique de mesure de la viscoélasticité linéaire, il faut veiller à ce que la déformation produites par la superposition de toutes les sinusoïdes ne sorte pas du domaine linéaire du matériau.

En théorie, le temps de mesure est de 3 fois la période de la fréquence fondamentale. Ici, cela correspond à 30 s, et permet de mesurer un matériau dont les propriétés viscoélastiques ont un temps caractéristique d'évolution de l'ordre de 150 s, soit 2 minutes et 30 secondes. En pratique, nous avons observé sur les rhéomètres Ares et Ares-G2 des temps de mesure de l'ordre de 50 s pour une telle mesure, ce qui permet le suivi de matériaux dont le temps caractéristique d'évolution est d'environ 250 s, soit 4 minutes. En revanche, la résolution fréquentielle de la méthode sera faible, avec 5 points par spectre sur deux décades.

## 1.3. Rhéomètres

### 1.3.1. Différents types de rhéomètres

Pour réaliser les mesures décrites plus haut, des outils de mesures spécifiques ont été développés. Ces outils sont appelés rhéomètres. Il existe différentes technologies, comme la rhéométrie rotative, capillaire, élongationnelle et à chute de bille. Nous nous cantonnerons ici à la rhéométrie rotative car seule cette dernière sera utilisée dans le cadre de ce travail. Dans un rhéomètre rotatif, le matériau que l'on souhaite caractériser est placé dans ce que l'on appelle une géométrie (voir section 1.3.2).

En ce qui concerne les rhéomètres rotatifs, il existe deux catégories principales de technologie :

- Les rhéomètres à contrainte imposée,
- Les rhéomètres à déformation contrôlée.

Dans un *rhéomètre à contrainte imposée*, un moteur impose sur la partie supérieure de la géométrie un couple, qui va induire une contrainte de cisaillement dans le matériau placé dans la géométrie. Si la contrainte de cisaillement est suffisante, elle va entraîner un déplacement angulaire de la partie supérieure de la géométrie,

## 1. Rhéologie

qui sera mesurée (typiquement par le biais d'un encodeur optique). En résumé, on applique une contrainte et on mesure un déplacement. C'est à l'aide de ce type de rhéomètre que l'on peut réaliser des mesures de fluage rigoureuses.

Dans un *rhéomètre à déformation contrôlée*, le moteur est lié à la partie inférieure de la géométrie de mesure. Il impose à la géométrie des déplacements angulaires, qui correspondent à une gamme étendue de taux de cisaillements appliqués à l'échantillon. Celui-ci applique en retour un couple sur la partie haute de la géométrie, qui est maintenue immobile par un servomoteur. On mesure le couple par l'intermédiaire de l'intensité nécessaire pour maintenir la géométrie dans sa position de référence. Rigoureusement, les mesures de relaxation de contrainte sont réalisées sur ce type de rhéomètre.

Il est à noter que les rhéomètres rotatifs modernes d'une technologie donnée disposent généralement de solutions pour simuler, par l'intermédiaire de boucles de régulations, le fonctionnement de l'autre technologie. Ainsi, un rhéomètre à contrainte imposée pourra dans certains cas réaliser des mesures à déformation contrôlée, et vice-versa.

La plupart des rhéomètres du marché sont également équipés de capteurs de forces normales.

En pratique, les critères de sélection pour choisir un rhéomètre pour un essai sont les suivants :

- Le type d'essai à réaliser : comme expliqué ci-dessus, un rhéomètre à contrainte imposée est naturellement adapté à une mesure de fluage, et un rhéomètre à déformation contrôlée est plus approprié pour réaliser des mesures de relaxation de contrainte et d'oscillations dans le domaine linéaire.
- La sensibilité du rhéomètre : en fonction de leur conception et de leurs capteurs, les rhéomètres possèdent une gamme de mesure qui leur est propre. Il convient donc d'adapter le rhéomètre à l'échantillon mesuré.

Un autre paramètre à prendre en compte pour réaliser une mesure rhéométrique est le type de géométrie de mesure.

### 1.3.2. Différents types de géométrie

À l'aide d'un plus ou moins grand nombre d'approximations, plusieurs types de géométries peuvent être utilisés pour produire un cisaillement ou une contrainte homogène dans un fluide. Chaque type de géométrie possède une relation entre couple et contrainte, et une relation entre déplacement angulaire et taux de cisaillement différentes. Ces relations sont dépendantes des dimensions de la géométrie. Par conséquent, le choix d'une géométrie adaptée à la consistance du matériau testé devra être judicieusement réalisé.

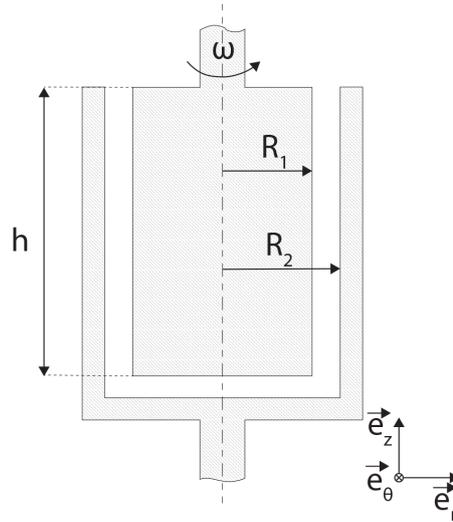


Figure 1.10.: Schéma d'une géométrie de type cylindres coaxiaux.

### 1.3.2.1. Cylindres coaxiaux

Le concept de géométrie à cylindres concentriques a été introduit par Maurice Couette en 1890. Cette géométrie est constituée de deux cylindres coaxiaux de rayons  $R_1$  et  $R_2$ , et de hauteur  $h$ . L'échantillon est cisailé entre les deux cylindres, dont en pratique un est mobile et l'autre fixe.

Afin de déterminer les relations liant le couple mesuré et la contrainte de cisaillement d'une part, et le déplacement angulaire du cylindre et le taux de cisaillement d'autre part, plusieurs hypothèses simplificatrices peuvent être prises pour réduire les équations du mouvement en coordonnées cylindriques  $(r, \theta, z)$  :

- L'écoulement est permanent, laminaire et isotherme,
- $v_\theta = r\omega$ , et  $v_r = v_z = 0$ ,
- La gravité et les effets de bord sont négligeables,
- L'écoulement est symétrique selon  $\theta$ , d'où  $\frac{\partial}{\partial \theta} = 0$ .

Il est ainsi possible de montrer que la contrainte de cisaillement à une distance  $r$  a pour expression :

$$\tau = \frac{C}{2\pi hr^2}$$

Où  $C$  est le couple qu'exerce une couche de fluide cisailé sur la couche adjacente.

De même, on montre que le taux de cisaillement entre deux couches distantes d'une grandeur  $dr$  s'écrit :

$$\dot{\gamma} = r \frac{d\omega}{dr} \quad (1.6)$$

Où  $\omega$  est la vitesse angulaire du cylindre mobile.

## 1. Rhéologie

Pour obtenir des relations globales dans le cas où l'entrefer est étroit ( $\frac{R_2 - R_1}{R_1} < 0,15$ ), on considère que la contrainte et le taux de cisaillement sont constants dans tout le volume de l'entrefer. C'est ce que font en pratique les rhéomètres. On considère alors que la valeur constante de la contrainte est :

$$\tau = \frac{C}{2\pi h R_1^2}$$

Et la valeur du taux de cisaillement est constante. En intégrant ainsi l'équation 1.6 entre les deux cylindres, on obtient :

$$\dot{\gamma} = \frac{R_1}{R_2 - R_1} \omega$$

À partir de ces relations, on obtient la viscosité avec la relation :

$$\eta = \frac{C}{2\pi h \omega} \frac{R_2 - R_1}{R_1^3}$$

Dans une géométrie à cylindres coaxiaux ayant un entrefer large, il est nécessaire de connaître le modèle rhéologique du matériau afin de pouvoir établir des relations entre les différents paramètres rhéologiques.

Il existe plusieurs variations des cylindres coaxiaux, comme la géométrie de Couette à double entrefer, où encore la géométrie de Vane.

### 1.3.2.2. Plans parallèles

Dans une géométrie de type plans parallèles, l'échantillon est enserré entre deux plans parallèles à distance  $h$ . Il est possible de faire varier cet entrefer. Le cisaillement est créé par la rotation d'un plan.

Afin de simplifier les équations du mouvement en coordonnées cylindriques  $(r, \theta, z)$ , on considère plusieurs hypothèses :

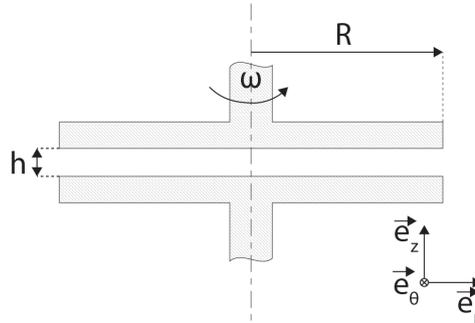
- L'écoulement est permanent, laminaire et isotherme,
- $v_\theta$  ne dépend que de  $r$  et  $z$ , et  $v_r = v_z = 0$ ,
- L'interface entre le liquide et l'air est droite.

À partir de cela, on peut montrer que pour un point de l'échantillon située à distance  $r$  de l'axe :

$$\dot{\gamma} = \frac{r}{h} \omega$$

Le taux de cisaillement n'est pas homogène dans l'échantillon. Celui donné par les rhéomètres est calculé à la périphérie de la géométrie :

$$\dot{\gamma} = \frac{R}{h} \omega$$



**Figure 1.11.:** Schéma d'une géométrie de type plans parallèles.

La contrainte de cisaillement a pour expression :

$$\tau = \frac{2C}{\pi R^3}$$

La taille de l'entrefer sélectionnée doit être au moins 10 fois supérieure à celles des plus gros objets dans la suspension.

### 1.3.2.3. Cône-plan

Dans une géométrie de type cône-plan, le fluide est cisailé entre un plan et un cône de rayon  $R$  faisant un angle  $\theta$  avec le plan, dont la pointe fictive est en contact avec le plan. Le cône possède une troncature à hauteur  $h_{tr}$  afin de n'avoir aucun contact avec le plan inférieur. L'entrefer correspond à la troncature, et est généralement très faible (de l'ordre de quelques micromètres).

Afin de simplifier les équations du mouvement en coordonnées sphériques  $(r, \theta, \phi)$  cette fois, on considère plusieurs hypothèses :

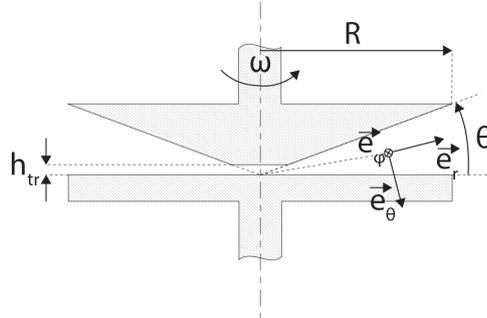
- L'écoulement est permanent, laminaire et isotherme,
- $v_\phi$  ne dépend que de  $r$  et  $\theta$ , et  $v_r = v_z = 0$ ,
- $\theta < 0,1 \text{ rad}$ ,
- L'interface entre le liquide et l'air est sphérique.

De ces hypothèses, il vient :

$$\dot{\gamma} = \frac{\omega}{\tan(\theta)}$$

Le taux de cisaillement est donc homogène dans l'échantillon. De plus :

## 1. Rhéologie



**Figure 1.12.:** Schéma d'une géométrie de type cône-plan.

$$\tau = \frac{3C}{2\pi R^3}$$

La viscosité est donc donnée par :

$$\eta = \frac{3C\theta}{2\pi\omega R^3}$$

Généralement, cette géométrie est employée lorsque l'on ne dispose que d'une faible quantité de fluide à tester. Il convient d'être vigilant sur la taille caractéristiques des particules en suspension dans un matériau à tester en raison de la faible taille de l'entrefer. Ces particules doivent en pratique avoir une taille au moins inférieure au dixième de la troncature.

### 1.4. Rhéologie des suspensions

La rhéologie des suspensions est un domaine scientifique toujours très actif, faisant l'objet de nombreuses publications. Le propos de cette partie n'est donc pas de faire un état des connaissances exhaustif, mais simplement de lister quelques concepts utiles pour comprendre la rhéologie du sang. En effet, le sang peut être considéré comme une suspension de sphéroïdes déformables (voir chapitre 2). Nous nous cantonnerons donc aux concepts élémentaires de rhéologie des suspensions autour de ce sujet.

### 1.4.1. Suspensions de sphères dures

Considérons d'abord une suspension constituée de sphères rigides solides distribuées aléatoirement dans un fluide Newtonien sans autre autre interaction que l'exclusion stérique. La présence de sphères perturbe l'écoulement.

Pour des sphères dures, Krieger a montré qu'une suspension monodisperse de sphères dans un fluide newtonien avait une équation d'état de la forme [Krieger, 1972] :

$$\eta = \eta(\dot{\gamma}, t_{Ex}, \eta_f, \rho_f, a, N, \rho_p, kT)$$

Où :

- $\dot{\gamma}$  est le taux de cisaillement,
- $t_{Ex}$  est la durée de l'expérience,
- $\eta_f$  est la viscosité du fluide suspendant,
- $\rho_f$  est la masse volumique du fluide suspendant,
- $a$  est le rayon des particules,
- $N$  est la concentration des particules,
- $\rho_p$  est la masse volumique des particules,
- $k$  est la constante de Boltzmann,
- $T$  est la température.

En adimensionalisant cette équation, et en se plaçant dans le cas d'un écoulement permanent, il a établi que cette équation pouvait se réduire à :

$$\eta_r = \eta_r(\phi, Pe) \tag{1.7}$$

Où :

- $\eta_r$  est la viscosité relative  $\eta_r = \frac{\eta}{\eta_f}$
- $\phi$  est la fraction volumique  $\phi = \frac{4\pi}{3} Na^3$ ,
- $Pe$  est le nombre de Péclet  $Pe = t_{Br}\dot{\gamma}$ , avec  $t_{Br}$  temps de diffusion Brownien  $t_{Br} = \frac{6\pi\eta_f a^3}{kT}$ .

À fraction volumique constante, la taille moyenne des particules a une influence sur sur la viscosité de la suspension à travers le nombre de Peclet. La plus grande partie des particules en suspension dans le sang sont les globules rouges, qui sont peu browniens, puisque l'on a  $t_{Br} \approx 90$  s.

Les propriétés mécaniques du sang sont donc en grande partie gouvernées par la fraction volumique (appelé hématocrite, voir section 2.3.2.1). De nombreux modèles se sont attachés à décrire l'évolution de la viscosité d'une suspension de sphères dures en fonction de la fraction volumique de particules dans celle-ci. Parmi ces modèles, le premier est celui d'Einstein en 1906 [Einstein, 1906] [Einstein, 1911], basé sur la dissipation visqueuse produite par l'écoulement autour d'une sphère seule :

$$\eta_r = 1 + 2,5\phi + O(\phi^2)$$

## 1. Rhéologie

Ce modèle est valable en pratique pour  $\phi < 0,03$  en régime très dilué. Un raffinement de celui-ci a été proposé par Batchelor en prenant en compte les interactions hydrodynamiques entre deux sphères :

$$\eta_r = 1 + 2,5\phi + 6,2\phi^2 + O(\phi^3)$$

Il est valable jusqu'à  $\phi < 0,1$ .

Pour des suspensions plus concentrées, d'autres approches ont été imaginées, parmi lesquelles nous pouvons citer celle phénoménologique de Krieger-Dougherty [Krieger, 1972] et celle théorique de Quemada [Quemada, 1977]. Toutes deux donnent la viscosité réduite de la solution en fonction de la fraction volumique de la solution, et de la fraction volumique maximale des agrégats.

### 1.4.2. Suspensions de particules non sphériques

Le comportement de particules non sphériques isolées dans des écoulements cisailés a été étudié en détail pour des particules possédant un axe de symétrie par rotation (sphéroïdes, cylindres etc.) [Mueller *et al.*, 2010]. De telles particules peuvent être considérées comme équivalentes à des sphéroïdes de rapport d'aspect  $a/b$  où  $a$  est la longueur selon l'axe de symétrie, et  $b$  la longueur dans la direction orthogonale à l'axe de symétrie [Brenner, 1974].

À cause du cisaillement, de telles particules en suspension dans un fluide visqueux subissent une rotation pour s'orienter selon le vecteur de vortacité de l'écoulement.

### 1.4.3. Suspensions de sphères déformables

Lorsque les particules dans la suspension sont déformables, pour des taux de cisaillement élevés, celles-ci vont avoir tendance à s'orienter selon les lignes de courant et à se déformer, ce qui a pour effet de diminuer la viscosité.

### 1.4.4. Suspensions d'agrégats

Dans le cas où des forces attractives interparticulaires existent, des agrégats peuvent se former dans la suspension. Ceux-ci se comportent en moyenne comme des objets composés à la fois de particules, et du fluide emprisonné dans l'espace interparticulaire [Snabre et Mills, 1996]. Par conséquent, la fraction volumique de la phase discrète augmente par rapport à sa valeur pour une suspension de particules non agrégées [Lapasin *et al.*, 1996], et donc sa viscosité est très supérieure à celle d'une suspension de sphères dures équivalentes.

Sous cisaillement, les forces hydrodynamiques induites par les contraintes de cisaillement ont tendance à détruire les agrégats. D'un autre côté, ceux-ci auront tendance à se reformer en raison des forces attractives entre particules, et de la probabilité d'interaction elle aussi dépendante du cisaillement [Genovese, 2012]. À un

#### 1.4. Rhéologie des suspensions

taux de cisaillement fixé, un régime permanent est atteint lorsque la destruction et la formation d'agrégats sont en équilibre [Snabre et Mills, 1996]. La taille moyenne des agrégats en régime permanent diminue lorsque le cisaillement augmente, ceci entraînant une diminution de la viscosité de la suspension. Au delà d'une valeur critique de cisaillement, les agrégats sont complètement détruits et les propriétés rhéologiques de la suspension deviennent celles d'une suspension de sphères libres [Ladyzhinsky et Uriev, 1996] [Lapasin *et al.*, 1996] [Snabre et Mills, 1996] [Quemada et Berli, 2002].

De nombreux modèles ont été proposés pour décrire la dépendance de la taille des agrégats avec le cisaillement [Quemada, 2006] [Genovese, 2012].



## 2. Le sang

### 2.1. Introduction

La finalité du présent travail est de produire une méthode de référence pour mesurer de façon fiable les propriétés mécaniques du sang avant et pendant la phase de coagulation. C'est donc dans cette optique que seront introduits ici les éléments de bibliographie qui permettent de situer le contexte et les apports de cette thèse, et qui constituent également un point de départ pour nos travaux.

Il est connu depuis les années 50 que le sang est un fluide non newtonien, et notamment qu'il possède des propriétés rhéofluidifiantes marquées. Il a également été montré qu'il avait une élasticité mesurable. Ces propriétés mécaniques ont différentes origines :

- La viscosité du sang est en partie liée à celle du plasma, qui grâce aux différentes protéines en solution est environ deux fois plus visqueux que l'eau.
- La capacité des érythrocytes à former en présence de certaines molécules en solution des agrégats faiblement cohérents en forme de rouleaux confère au sang des propriétés rhéofluidifiantes. En effet, ces rouleaux ont tendance à se désagréger lorsque le cisaillement augmente, entraînant une baisse de viscosité (voir section 1.4.4).
- La déformabilité des érythrocytes contribue également à la rhéologie du sang à fort cisaillement (voir section 1.4.3).

La première partie de cette étude bibliographique porte brièvement sur le rôle physiologique du sang. La section suivante présente la composition de celui-ci, et la contribution des différents éléments individuels aux propriétés mécaniques globales du milieu. La troisième partie traite plus spécifiquement de l'agrégation des globules rouges. Enfin, la dernière section récapitule les propriétés mécaniques connues du sang en insistant plus particulièrement sur ses propriétés viscoélastiques.

### 2.2. Rôle physiologique du sang

Le sang est un tissu fluide, véhiculé en permanence dans le système circulatoire selon un flux unidirectionnel imposé par la pompe cardiaque. Il a plusieurs fonctions physiologiques :

- diffusion du dioxygène et des éléments nutritifs dans tous les tissus du corps,
- évacuation du dioxyde de carbone et des déchets métaboliques,

## 2. Le sang

- transport des cellules du système immunitaire,
- transport des hormones,
- participation à la thermorégulation du corps,
- hémostase.

Les propriétés mécaniques du sang doivent être en lien direct avec ses fonctions physiologiques. Celui-ci possède par exemple une viscosité relativement basse pour une solution aussi concentrée (de l'ordre de 45 %). Il est possible que ces propriétés mécaniques contribuent à l'optimisation de l'écoulement, d'un point de vue physiologique, dans le système complexe que constitue l'arbre vasculaire (écoulement pulsatile imposé par le coeur dans un réseau branché et très disparate en terme de diamètre de canal).

Dans les vaisseaux capillaires, dont le diamètre peut atteindre jusqu'à  $2,8 \mu\text{m}$ , l'écoulement est diphasique et ne peut être étudié par la mécanique des milieux continus (la déformabilité des globules est alors primordiale).

Dans les petites veines et les petites artères (diamètre de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ ), l'écoulement est complexe en raison de deux phénomènes :

- Le diamètre de ces vaisseaux permet la formation de rouleaux d'érythrocytes.
- Il existe une couche pariétale déplétée en globules rouges [Karnis *et al.*, 1966].

Cette couche plasmatique à la paroi fait alors office de lubrifiant.

Dans les gros vaisseaux, l'épaisseur de la de couche déplétée est négligeable devant la taille caractéristique de la géométrie d'écoulement.

Il convient également de prendre en compte le fait que les parois des vaisseaux sont elles-mêmes viscoélastiques [Westerhof et Noordergraaf, 1970].

## 2.3. Les différents composants sanguins

Le sang chez l'homme est un fluide biologique complexe composé d'une phase liquide, le plasma, et de cellules en suspension.

### 2.3.1. Le plasma

Le plasma, fluide dans lequel sont suspendues les cellules sanguines, est une solution aqueuse de composants très disparates en matière de tailles, de quelques dizaines à plusieurs millions de Daltons. Ces solutés représentent approximativement 8 - 9 % de la masse du plasma.

#### 2.3.1.1. Les ions en solution

Les ions présents dans le plasma ont des masses moléculaires de quelques dizaines de Daltons, et représentent à peu près 1 % de la masse totale du plasma. Les principaux ions du plasma sont :  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{2-}$ . La présence

### 2.3. Les différents composants sanguins

d'ions dans le sang est importante d'un point de vue physiologique, mais également mécanique pour deux raisons :

- La pression osmotique est principalement gouvernée par les ions  $\text{Na}^+$ , car ceux-ci sont les plus nombreux des cations en solution. Leur concentration est maintenue dans la fourchette 135 – 145 *mM* par des mécanismes de régulation. La pression osmotique est un paramètre fondamental en hémorhéologie, car si celle-ci s'écarte trop de la valeur physiologique (environ 300 mOsm/l), les globules rouges changent de volume d'une façon importante [Meiselman *et al.*, 1967]. Cela se traduit tout d'abord par une variation de l'hématocrite, et cela a donc une répercussion sur les propriétés mécaniques du sang (voir section 2.6.5.1). Cela se traduit également par un changement de la forme des globules rouges (lorsque le volume augmente, leur forme se rapproche de la sphère), et de leurs propriétés mécaniques intrinsèques. En effet, lorsque le volume contenu dans le globule augmente, la membrane est précontrainte et est donc plus rigide.
- Le pH est principalement lié à la présence de l'anion  $\text{HCO}_3^-$ . Les valeurs physiologiques du pH se situent entre 7,35 et 7,45, ce qui implique des concentrations de  $\text{HCO}_3^-$  entre 24 et 30 *mM*. De la même façon que pour la pression osmotique, si le pH dévie trop des valeurs normales, cela se traduit par des changements importants sur la viscoélasticité sanguine [Rand *et al.*, 1968].

#### 2.3.1.2. Les protéines en solution

Il existe une grande variété de protéines plasmatiques, dont les plus représentées sont l'albumine ( $\geq 50$  % des protéines plasmatiques), les immunoglobulines ( $\approx 20$  %), le fibrinogène ( $\approx 5$  %), l'alpha 1 antitrypsine ( $\approx 4$  %), l'alpha 2 macroglobuline ( $\approx 4$  %), la transferrine ( $\approx 3$  %) et les lipoprotéines ( $\approx 8$  %). Elles ont des masses moléculaires très élevées, s'étalant de plusieurs dizaines de milliers à plusieurs millions de Daltons, et représentent environ 7 % de la masse du plasma.

Les protéines jouent un rôle primordial dans l'hémorhéologie. Tout d'abord, en raison de leur haut poids moléculaire, de leur encombrement spatial et de leur forme asymétrique, elles ont un effet non négligeable sur la viscosité du plasma. En effet, la viscosité de l'eau à  $37^\circ\text{C}$  est de 0,69 *mPa.s*, tandis que celle du plasma à la même température est de  $1,25 \pm 0,1$  *mPa.s*, ceci étant essentiellement dû à la présence des protéines [Harkness et Whittington, 1971].

De plus, certaines protéines plasmatiques (principalement le fibrinogène), ont pour effet de provoquer la formation d'agrégats faiblement cohérents de globules rouges en piles appelées rouleaux [Chien *et al.*, 1966] [Maeda *et al.*, 1987] [Game *et al.*, 1996]. La rhéologie du sang est liée à la présence des rouleaux, et donc à celle de ces protéines [Copley *et al.*, 1975]. Une section spécifique est consacrée à l'agrégation des érythrocytes (voir section 2.4), dans laquelle le rôle spécifique des protéines sur l'agrégation érythrocytaire est plus amplement débattu.

## 2. Le sang

### 2.3.1.3. Les molécules métaboliques en solution

Les molécules métaboliques en solution ont des masses moléculaires de quelques centaines de Daltons et représentent approximativement 1 % de la masse du plasma. Elles peuvent se diviser en trois catégories : les substances nutritives (lipides, glucides, acides aminés, etc.), les déchets métaboliques (bilirubine, urée, acide urique, etc.) et les hormones au sens large. Ces molécules ont relativement peu d'influence sur la mécanique sanguine et ne feront donc pas l'objet de plus amples développements ici.

### 2.3.2. Les éléments figurés

#### 2.3.2.1. Définition de l'hématocrite

L'hématocrite est par définition une grandeur sans dimension donnant la proportion volumique de globules rouges présents dans le sang. Historiquement, on utilisait couramment la proportion volumique apparente d'éléments figurés après centrifugation du sang. Ce n'est pas un véritable hématocrite à proprement parler, puisqu'il reste non seulement du plasma emprisonné entre les globules rouges, mais également des leucocytes et des thrombocytes dans le culot. De nos jours, on utilise le comptage et le volume moyen des globules rouges obtenus électroniquement pour établir l'hématocrite réel. Par convention, c'est cette valeur que l'on appelle aujourd'hui hématocrite, et l'on appelle la valeur déterminée par centrifugation PCV pour Packed Cell Volume. Néanmoins, ces deux grandeurs sont proches, car les érythrocytes représentent 99 % des éléments figurés, et la quantité de plasma restant entre les cellules après centrifugation est faible.

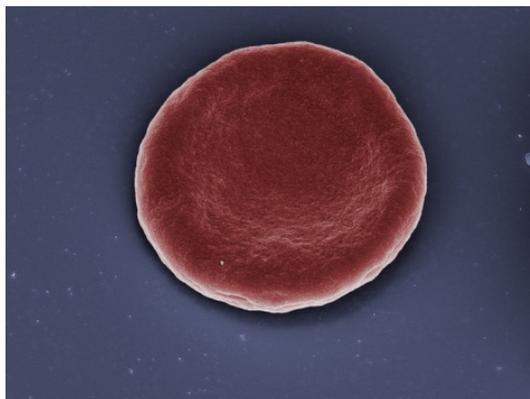
Chez un sujet adulte sain, l'hématocrite varie entre 36 % et 46 % pour une femme et entre 40 % et 50 % pour un homme. Dans des conditions pathologiques, l'hématocrite peut descendre jusqu'à 20 %, et monter jusqu'à 70 % environ. L'hématocrite local peut subir d'importantes variations en fonction de la position des vaisseaux dans l'arbre vasculaire [Sarelius et Duling, 1982]. Il est à noter que pour déterminer l'hématocrite, le sang est prélevé en pratique au niveau veineux.

#### 2.3.2.2. Les érythrocytes

**2.3.2.2.1. Physiologie de l'érythrocyte** Les érythrocytes, appelés aussi hématies ou globules rouges, sont les cellules sanguines les plus abondantes. En effet, leur nombre est de  $4,5 \cdot 10^{12}$  à  $5,5 \cdot 10^{12}$  cellules/l de sang chez l'homme, et de  $3,8 \cdot 10^{12}$  à  $4,8 \cdot 10^{12}$  cellules/l de sang chez la femme.

Ceux-ci ont pour fonction physiologique de transporter les gaz respiratoires : l'oxygène des alvéoles pulmonaires aux tissus, et le dioxyde de carbone des tissus aux alvéoles pulmonaires.

### 2.3. Les différents composants sanguins



**Figure 2.1.:** Reconstitution en 3 dimensions d'un globule rouge vu de face.

Les globules rouges sont produits chez l'adulte dans la moelle osseuse au cours de l'érythropoïèse. Il existe quelques érythrocytes immatures dans le sang, qui représentent entre 0,5 et 2 % du nombre de globules rouges. Ils sont appelés réticulocytes, et contiennent encore quelques organites (mitochondries, ribosomes, appareil de Golgi, etc.) à la différence du globule rouge mature.

La durée de vie moyenne d'un érythrocyte sain est d'environ 120 jours. Son vieillissement se traduit par une perte du contenu enzymatique, une modification de sa morphologie ou une altération de sa membrane. Environ 50 % des globules rouges âgés sont détruits par les macrophages de la moelle osseuse. Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie.

**2.3.2.2.2. Morphologie de l'érythrocyte** Les globules rouges ont une forme de lentille biconcave (voir fig. 2.1). Leur diamètre varie entre 6,7 et 7,7  $\mu\text{m}$  (avec pour moyenne 7,2  $\mu\text{m}$ ). Leur épaisseur est d'environ 2,4  $\mu\text{m}$  à la périphérie du disque et 1,4  $\mu\text{m}$  au centre, pour un volume moyen variant de 83 à 101  $\mu\text{m}^3$  (dans les conditions normales de pression osmotique, soit environ 300  $\text{mOsm/l}$ ). Toutefois, il est à noter que ce volume varie grandement sur la durée de vie de la cellule, passant d'approximativement 120  $\mu\text{m}^3$  pour les réticulocytes, à environ 60  $\mu\text{m}^3$  pour les cellules en passe d'être détruites. L'érythrocyte possède une surface moyenne de 140  $\mu\text{m}^2$  [Evans et Fung, 1972]. Il a donc un excès de surface d'environ 40 % par rapport à une sphère de même volume.

Le globule rouge a une déformabilité importante. Il peut donc accomplir sa fonction de transporteur du dioxygène et du dioxyde de carbone dans les capillaires les plus fins de l'organisme en adoptant une forme dite de parachute. Théoriquement, il peut passer dans des tubes dont le diamètre minimal a été estimé à 2,6  $\mu\text{m}$  [Canham et Burton, 1968].

## 2. Le sang

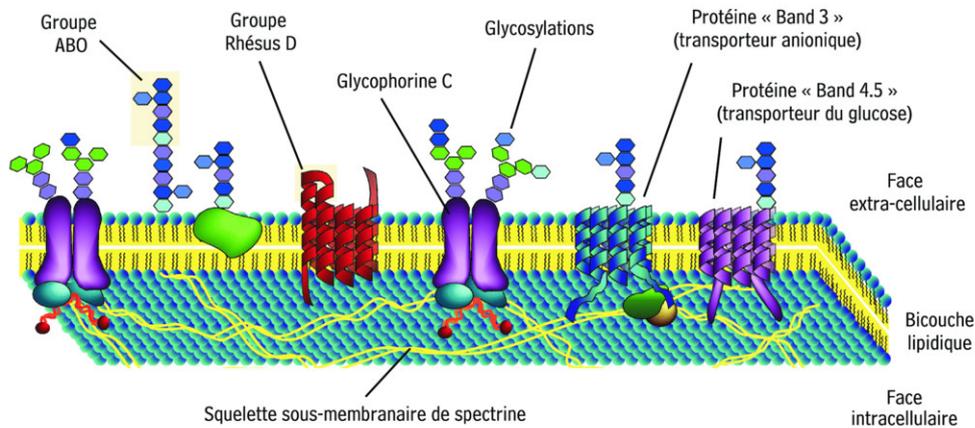


Figure 2.2.: Schéma de la membrane d'un érythrocyte (d'après [Anonyme, 2014]).

**2.3.2.2.3. Structure et composition de l'érythrocyte** Les érythrocytes sont des cellules anucléées, formées par une membrane contenant une solution concentrée en hémoglobine (entre  $330\text{ g/l}$  et  $360\text{ g/l}$ ) et certaines molécules énergétiques indispensables à leur survie.

C'est l'hémoglobine qui en se combinant à l'oxygène au niveau des poumons pour former de l'oxyhémoglobine, permet de véhiculer l' $O_2$  jusqu'aux tissus, où elle sera transformée en carboxyhémoglobine, qui permettra de transporter le  $CO_2$  au niveau des poumons où il pourra être évacué de l'organisme au cours de la respiration.

La membrane du globule rouge est constituée d'une bicouche lipidique au sein de laquelle s'intercalent des protéines (transporteurs d'ions, récepteurs membranaires, porteurs des fonctions antigéniques des groupes sanguins). Sur la face intracellulaire, le cytosquelette formé d'un réseau de fibres protéiques, principalement de spectrine, confère au globule rouge ses propriétés mécaniques (voir fig. 2.2).

**2.3.2.2.4. Propriétés mécaniques de l'érythrocyte** Les propriétés mécaniques de l'érythrocyte proviennent dans une large mesure de la contribution de leur membrane, et plus particulièrement de la structure du cytosquelette, mais également de la concentration en hémoglobine et de la forme de la cellule [Shiga *et al.*, 1990]. Sous cisaillement, les disques biconcaves sont déformés en ellipsoïdes plats [Suda *et al.*, 1982]. Les globules rouges contribuent de plusieurs manières à la viscoélasticité sanguine (voir section 2.6).

### 2.3.2.3. Les leucocytes

Les leucocytes, appelés également globules blancs, sont des cellules du système immunitaire produites dans la moelle osseuse. Le terme générique de leucocyte englobe plusieurs types de cellules : les granulocytes (neutrophiles 40 à 75 % des leucocytes, éosinophiles 1 à 5 %, basophiles inférieur à 1 %), les lymphocytes qui représentent 25 à 40 % des leucocytes (lymphocyte B, lymphocyte T, lymphocyte NK) et les monocytes entre 2 et 10 %.

On trouve approximativement entre  $4 \cdot 10^9$  et  $10 \cdot 10^9$  leucocytes par litre de sang. Les leucocytes, de par leur faible nombre physiologique dans le sang, contribuent peu aux propriétés mécaniques de ce dernier. En revanche, leur rôle sur l'écoulement dans la microcirculation est déterminant. En effet, la taille importante des leucocytes (en moyenne  $230 \mu m^3$  pour les monocytes qui sont les plus gros leucocytes, et en moyenne  $120 \mu m^3$  pour les lymphocytes qui sont les plus petits leucocytes) leur confère une résistance à l'écoulement dans les microvaisseaux supérieure de trois ordres de grandeur à celles des érythrocytes [Lowe, 1988].

### 2.3.2.4. Les thrombocytes

Les thrombocytes, ou plaquettes, sont des particules anucléées de 2 à 4  $\mu m$  de diamètre. Ils ne sont pas à proprement parler des cellules, car sont issus de la fragmentation de cellules plus grosses, les mégacaryocytes qui eux-mêmes vont libérer entre 5 et 7 proplaquettes qui vont à leur tour éclater pour former entre 1000 et 1500 thrombocytes chacune.

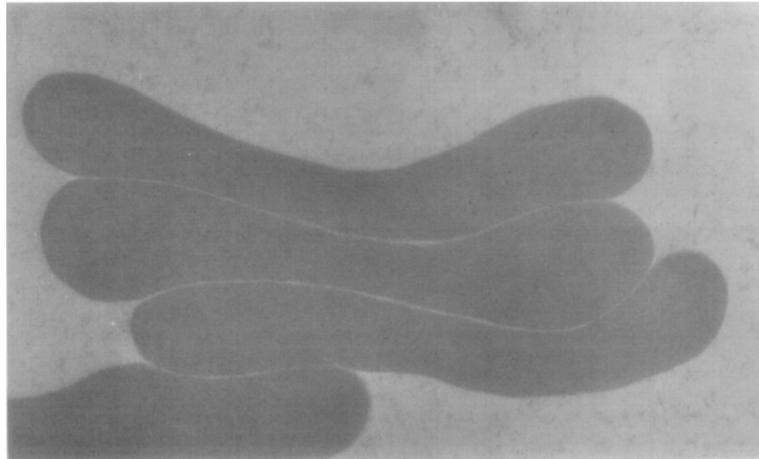
Les plaquettes jouent un rôle majeur dans l'hémostase primaire. On trouve chez l'adulte sain entre  $150 \cdot 10^9$  et  $410 \cdot 10^9$  plaquettes par litre de sang.

Les plaquettes sont peu importantes d'un point de vue hémorhéologique, car ce sont de très petits éléments qui n'interagissent pas entre eux en conditions normales. Leur volume total est inférieur à celui des leucocytes (qui est lui-même bien moindre que celui des érythrocytes). Par conséquent ils n'influencent pas les propriétés mécaniques du milieu.

## 2.4. Agrégation des érythrocytes

Comme cela a déjà été évoqué, la capacité qu'ont les globules rouges à s'agréger en fonction de certains paramètres détermine dans une large mesure les propriétés mécaniques du sang. Les agrégats se créent par empilement des érythrocytes (voir figure 2.3) pour former des rouleaux, qui peuvent eux-mêmes s'agencer pour former des conglomérats tridimensionnels. L'état du système dépend des forces mises en jeu. Seule l'agrégation liée à des mécanismes non spécifiques sera traitée (ne faisant pas intervenir d'interaction spécifique ligand-récepteur). Celle-ci est donc entièrement réversible, et les forces hydrodynamiques par exemple peuvent détruire les

## 2. Le sang



**Figure 2.3.:** Globules rouges agrégés observés par microscopie électronique en transmission [Chien et Jan, 1973].

agrégats. C'est pourquoi l'agrégation des globules rouges ne faisant intervenir aucun mécanisme spécifique n'apparaît qu'à bas taux de cisaillement.

### 2.4.1. Forces d'interaction entre érythrocytes

#### 2.4.1.1. Force électrostatique répulsive

Les globules rouges portent une densité de charge surfacique négative, estimée à  $0,02 C/m^2$  [Baumler *et al.*, 1989] voire  $0,04 C/m^2$  [Snabre et Mills, 1986]. Ceci est lié à la présence d'acides sialiques dans le revêtement glycoprotéique extracellulaire (dont l'épaisseur est estimée à  $5,5 nm$ ). Cela se traduit par l'existence d'une force électrostatique répulsive entre les érythrocytes.

Il a été montré dans des solutions de polymère neutres (dextrans) que la charge électrique des globules rouges a un effet sur leur capacité à s'agréger, la concentration du polymère dans le milieu suspendant ayant tendance à promouvoir l'agrégation (voir section 2.4.1.3). En effectuant un traitement à la neuraminidase qui diminue la quantité d'acide sialique sur la membrane du globule rouge (ce qui a pour effet de la rendre moins chargée négativement), l'agrégation se produit pour des concentrations en polymère plus faibles [Jan et Chien, 1973]. À haute concentration, l'agrégation se stabilise (alors que les érythrocytes non traités ne s'agrègent pas à haute concentration en polymère). De façon analogue, il a été montré que l'agrégation induite par le fibrinogène ou les immunoglobulines (voir section 2.4.1.4) est accentuée par la diminution de la charge négative de la surface du globule rouge via un traitement à la neuraminidase [Maeda *et al.*, 1984] [Izumida *et al.*, 1991].

### 2.4.1.2. Forces attractives de Van der Waals

Les forces de Van der Waals sont des interactions à courte portée (quelques nm) qui résultent des moments dipolaires des molécules. En ce qui concerne les globules rouges, cette force est de faible intensité [Snabre et Mills, 1986] [Baumler *et al.*, 1989] [Lerche, 1983]. Pour des distances entre deux globules rouges supérieures à deux fois l'épaisseur de la couche de glycoprotéines, les interactions de Van der Waals sont de l'ordre de  $10^{-2} \mu J/m^2$  [Lerche, 1984]. À titre de comparaison, l'énergie d'interaction totale est de l'ordre de 1 à  $10 \mu J/m^2$  [Lerche, 1984]. Les interactions de Van der Waals sont donc négligeables dans la plupart des cas.

En revanche, en ne prenant en compte que les forces de Van der Waals et électrostatique, les globules rouges devraient s'agréger dans une solution tampon sans macromolécule [Lerche, 1983]. Or cela ne correspond pas aux observations expérimentales. Cela traduit donc la présence d'autres forces à prendre en compte.

### 2.4.1.3. Forces de stabilisation stérique

La stabilisation stérique est un effet empêchant des particules colloïdales de flocculer. Ceci est dû à la présence de polymères non ioniques adsorbés sur leur surface [Napper, 1970]. En effet, lors d'une collision brownienne entre deux particules complètement entourées par des polymères, les surfaces des deux particules ne peuvent se rapprocher en dessous d'une certaine limite que si une interpénétration et/ou une compression des couches de polymère surviennent. Or l'interpénétration de deux chaînes de polymères entraîne une chute de l'entropie conformationnelle de celles-ci. Par conséquent, la minimisation de l'énergie d'interaction interparticulaire est à l'origine d'une force de répulsion. Dans le cas des érythrocytes, la couche de glycoprotéines joue le rôle de la couche adsorbée créant la force de répulsion stérique [Lerche, 1983].

C'est grâce à cet effet notamment que les globules rouges ne s'agrégent pas dans une solution tampon sans macromolécules. En présence de macromolécules (dextran, fibrinogène, etc.), en revanche, cet effet serait négligeable, car la zone dans laquelle l'affinité cellulaire (propension qu'ont deux cellules de s'attirer mutuellement) entre deux globules rouges proches est maximale est toujours supérieure à deux fois l'épaisseur de leur revêtement glycoprotéique [Neu et Meiselman, 2002].

### 2.4.1.4. Force attractive par déplétion et/ou pontage

De nos jours, deux théories coexistent pour expliquer la source des forces attractives à l'origine de l'agrégation érythrocytaire dans une solution de macromolécules : l'agrégation par déplétion et l'agrégation par pontage.

Dans le modèle de pontage [Merrill *et al.*, 1963a], l'agrégation se produit quand les forces dues à l'adsorption de macromolécules sur des membranes cellulaires adja-

## 2. Le sang

centes excèdent les forces dues à la répulsion électrostatique, aux contraintes exercées par la membrane et au cisaillement du milieu [Snabre et Mills, 1985] (voir figure 2.4).

Le modèle de déplétion est utilisé pour expliquer l'agrégation des globules rouges à partir de la fin des années 80 [Evans et Needham, 1988]. Dans ce modèle, l'agrégation se produit en raison d'une concentration locale en macromolécules à proximité de la surface de la cellule moins importante que la concentration dans le milieu suspendant environnant (voir figure 2.4).

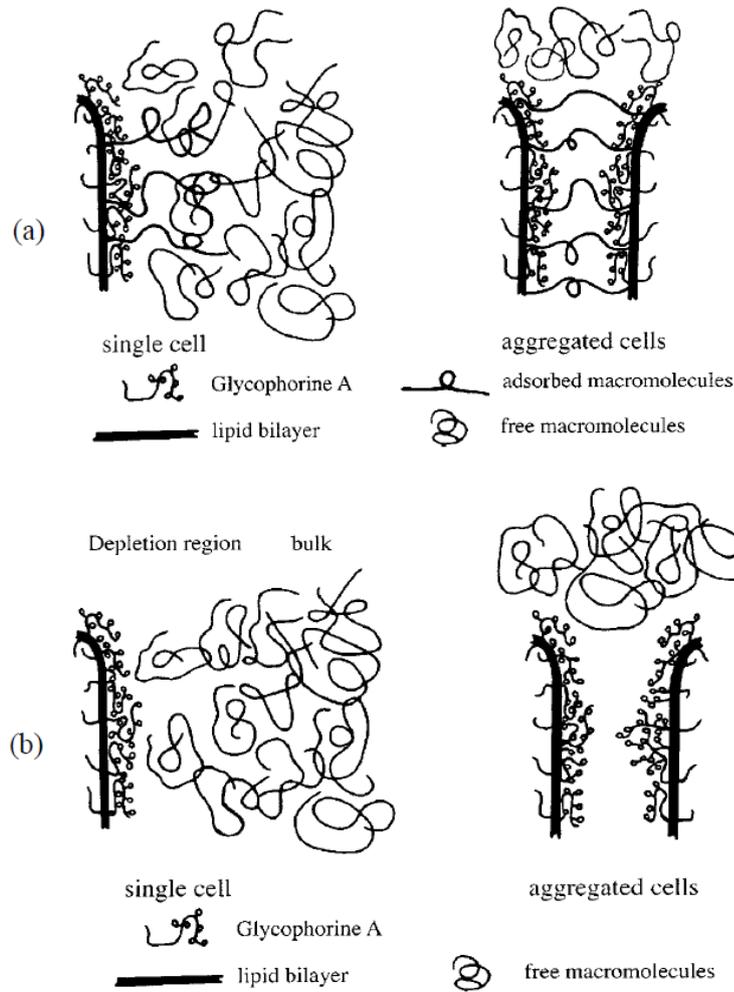
À l'aide de mesures de mobilité électrophorétique, une zone de déplétion en macromolécule proche de la surface du globule rouge a été mise en évidence dans des solutions de polymères neutres (dextran) [Baumler *et al.*, 1989]. De par la faible taille de cette couche (de l'ordre du rayon hydrodynamique de la macromolécule en solution [Donath *et al.*, 1993]), c'est-à-dire quelques dizaines de nanomètres pour la plupart des protéines plasmatiques, l'observation directe de cette dernière par des méthodes optiques est impossible. De plus, discerner une faible adsorption d'un effet de déplétion est compliqué, car une agrégation par déplétion pourrait impliquer l'interpénétration des couches de glycoprotéines à la surface des cellules agrégées (ceci ayant une signature mécanique assez proche de celle d'un pontage).

Les forces et énergies d'adhésion entre deux globules rouges isolés dans des solutions de dextran 70 kDa et 150 kDa ont été mesurées en utilisant une technique de microscopie à force atomique [Steffen *et al.*, 2013]. La mesure de la dépendance des énergies d'adhésion avec la concentration en dextran est remarquablement prédite par un modèle théorique construit à partir de l'agrégation des globules rouges par déplétion [Neu et Meiselman, 2002].

Les modèles de pontage et de déplétion sont par nature drastiquement opposés sur le point suivant. Le modèle de pontage prédit une agrégation accrue lorsque l'on a une concentration élevée en protéine ou en polymère à la surface du globule rouge, tandis que le modèle de déplétion prédit le contraire. Or il s'avère qu'attacher des molécules de poly(éthylène glycol) (PEG) à la surface des érythrocytes inhibe l'agrégation dans une solution de PEG [Armstrong *et al.*, 1999] [Armstrong *et al.*, 1997] (voir figure 2.5). Or le PEG étant connu pour sa capacité à favoriser l'agrégation des globules rouges [Armstrong *et al.*, 2004], l'agrégation aurait dû être favorisée dans l'hypothèse d'un modèle par pontage, puisque la moitié du pont moléculaire est alors réalisée. Cela constitue un très net argument pour affirmer que le modèle de déplétion est le mécanisme principal d'agrégation des globules rouges induite par des polymères non ioniques.

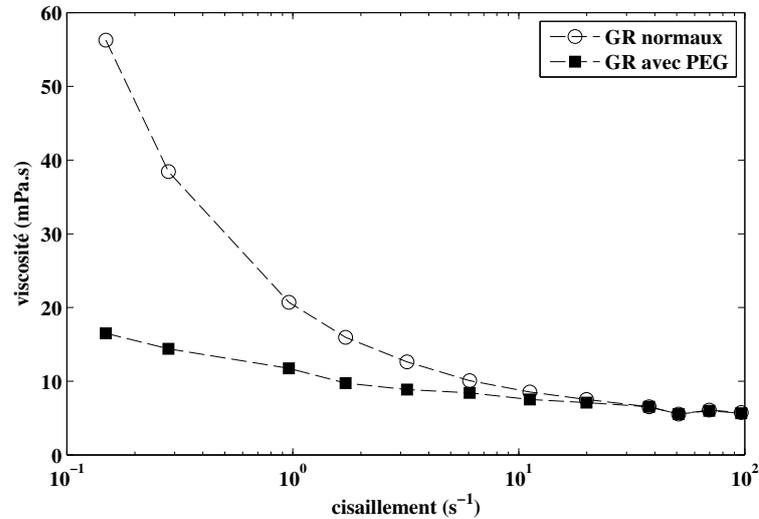
De plus, le modèle d'agrégation par déplétion est compatible avec l'augmentation de l'agrégation avec l'âge des cellules (voir paragraphe 2.5.1.1). En effet, ce modèle indique qu'une diminution de 10 % de l'épaisseur du glycocalyx augmente peu, environ 3 – 4 %, la mobilité électrophorétique de la cellule, mais en revanche augmente l'affinité cellulaire de 60 % pour des globules rouges dans une solution à 30 g/l de dextran 70 [Meiselman, 1993] [Neu et Meiselman, 2002] [Rampling *et al.*, 2004] [Sowemimo-Coker *et al.*, 1989] (voir paragraphe 2.5.2.2.4). Cette augmentation

## 2.4. Agrégation des érythrocytes



**Figure 2.4.:** (a) Schéma représentant l'agrégation par pontage macromoléculaire. (b) Schéma représentant l'agrégation par déplétion en macromolécule à proximité de la surface de l'érythrocyte [Baumler *et al.*, 1989].

## 2. Le sang



**Figure 2.5.:** Viscosité de sang reconstitué à hématoците 40 % en fonction du taux de cisaillement à 25°C. Globules rouges normaux (cercles ouverts), globules rouges avec du PEG attaché en surface (carrés pleins). Les données sont moyennées sur 5 donneurs (courbes extraites de [Armstrong *et al.*, 1997]).

d'affinité cellulaire pourrait prédire la différence d'agrégabilité sans différence de mobilité électrophorétique qui existe entre les cellules jeunes (glycocalyx peu altéré), et les cellules âgées (glycocalyx altéré).

De façon analogue, des résultats numériques semblent montrer qu'en diminuant de 15 – 20 % la profondeur de pénétration du polymère dans le glycocalyx on obtient également une augmentation de l'affinité cellulaire d'environ 60 % [Neu *et al.*, 2003] [Rampling *et al.*, 2004]. Finalement, il n'est pas exclu que les deux mécanismes participent de concert à l'agrégation des érythrocytes. Des mesures de microscopie à force atomique ont montré que les énergies d'adhésion varient en fonction du temps de contact entre les globules rouges d'une part, et avec la vitesse imprimée à la pointe du microscope d'autre part. Cela suggère qu'en cas de contact prolongé entre deux globules rouges, des pontages moléculaires peuvent se former [Steffen *et al.*, 2013].

Néanmoins il semble que le tableau de l'agrégation érythrocytaire ne puisse être complet simplement avec ces deux mécanismes, car que ce soit le modèle de pontage ou de déplétion, aucun n'est en mesure d'expliquer l'absence d'agrégation en conditions physiologiques chez certaines espèces, comme les bovins [Kaibara, 1983], ou les différences marquées d'agrégabilité des érythrocytes provenant de différentes espèces [Baskurt *et al.*, 1997a].

## 2.5. Paramètres influençant l'agrégation des érythrocytes

### 2.5.1. Paramètres intrinsèques

Afin de caractériser la capacité intrinsèque qu'ont les globules rouges à s'agréger, on utilise la notion d'agrégabilité [Meiselman, 2009]. Cela décrit l'agrégation observée ou mesurée d'un échantillon de globules rouges lavés suspendus dans un milieu défini comparé à un autre échantillon de globules dans le même milieu. Par conséquent, l'agrégabilité de globules rouges donnés dans un milieu est meilleure pour les globules rouges présentant le plus d'agrégation. Il paraît clair que des paramètres liés aux protéines de surfaces du globule rouge entrent en jeu pour expliquer le phénomène d'agrégation.

Pour mesurer l'indice d'agrégation des globules rouges, la principale technique utilisée exploite la transmission de lumière à travers un échantillon de sang, mais une technique de réflexion de lumière peut également être employée [Gasparrosas et Thurston, 1988].

#### 2.5.1.1. Âge des cellules

Comme cela a déjà été évoqué plus haut, les globules rouges ont une durée de vie d'environ 120 jours, et leur vieillissement se traduit par une perte de leur contenu enzymatique, une modification de leur morphologie ou une altération de leur membrane. De ce fait, les globules rouges plus âgés ont une densité supérieure aux globules rouges jeunes [Murphy, 1973]. Il est donc possible de les séparer par centrifugation (voir section 2.6.1.2).

De cette manière, il est apparu que les globules rouges âgés (plus denses) ont une plus forte tendance à s'agréger que les jeunes, que ce soit dans du plasma ou dans des polymères neutres [Baskurt *et al.*, 2007] [Nordt, 1983]. Cet effet existe même si l'on retire l'acide sialique (responsable de la charge négative de la surface du globule rouge) et les immunoglobulines G de la surface des globules rouges [Whittingstall et Meiselman, 1991], ce qui prouve qu'il n'est lié qu'à des changements au niveau de la membrane du globule rouge pendant son vieillissement.

#### 2.5.1.2. Variabilité biologique

L'agrégabilité des globules rouges dépend fortement de l'individu [Bauersachs *et al.*, 1989] [Rampling *et al.*, 1989], et l'indice d'agrégation peut varier d'un facteur 6.

## 2. Le sang

### 2.5.1.3. Pathologies

Il est à noter également que l'agrégabilité des globules rouges peut drastiquement augmenter pour certaines pathologies, par exemple dans les septicémies [Baskurt *et al.*, 1997b], diabètes [Bauersachs *et al.*, 1987], ischémies myocardiques [Rainer *et al.*, 1987] ou insuffisances rénales [Hein *et al.*, 1987].

### 2.5.1.4. Influence des protéines membranaires sur l'agrégabilité des globules rouges

Il semble donc clair qu'il existe des facteurs cellulaires influençant l'agrégabilité des globules rouges. Ils varient avec :

- les individus,
- leurs états physiopathologiques,
- la sénescence des globules rouges.

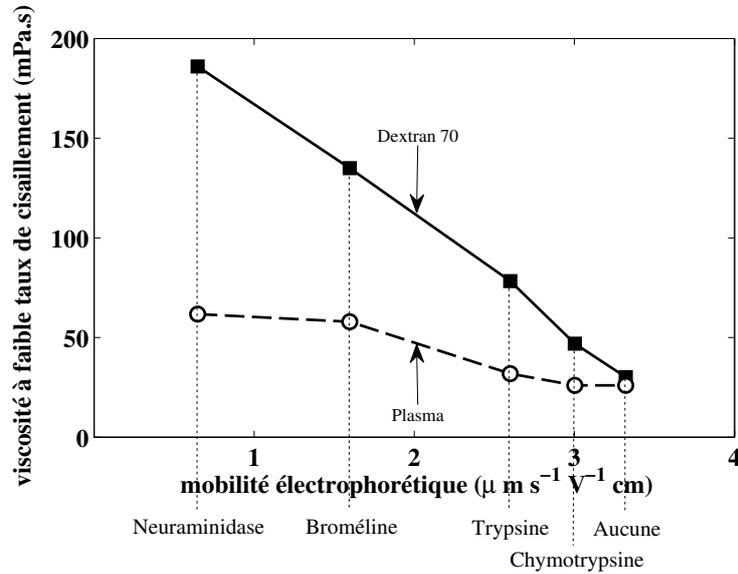
En revanche, la nature détaillée de ces différents facteurs cellulaires, et leur contribution spécifique dans les mécanismes d'agrégation ne sont pas pleinement élucidés à ce jour. Ni le groupe sanguin, ni le facteur rhésus, ni le volume moyen des globules rouges dans la gamme normale n'ont d'influence sur l'agrégation [Meiselman, 1993].

Il est par contre envisageable que les protéines de surface du globule rouge (glycocalyx) jouent un rôle important dans sa capacité à former des agrégats. Dans cette optique, les effets de la digestion du glycocalyx par différentes enzymes (chymotrypsine, trypsine, broméline, et neuraminidase) ont été comparés [Pearson, 1996]. En raison des spécificités de chaque enzyme, le degré ou la nature de leur digestion des protéines de surface diffère. Par conséquent, leur utilisation a une influence variable sur la tendance à s'agréger des globules rouges. En utilisant des mesures de viscosité à faible cisaillement, il a été établi que dans du dextran 70, l'influence de l'utilisation de toutes ces enzymes sur les globules rouges est d'augmenter leur capacité à s'agréger. Dans du dextran 40, cela provoque l'agrégation des globules rouges modifiés, tandis que les globules rouges normaux ne s'agrègent pas. L'utilisation de chymotrypsine n'a par contre aucun effet sur l'agrégation induite par le fibrinogène. Cela suggère que les effets des facteurs cellulaires peuvent être spécifiques à l'agent agrégeant.

L'agrégation des globules rouges dans du dextran 70 est influencée de façon prédominante par la charge de la cellule. Cela a été montré en comparant les résultats de viscosité à faible taux de cisaillement à des mesures de mobilité électrophorétiques en tampons isotoniques à diverses forces ioniques (voir fig. 2.6). Il existe une relation quasiment linéaire inverse entre l'agrégation de globules rouges et la mobilité électrophorétique des globules rouges traités avec les différentes enzymes. En revanche, dans le cas du plasma, la relation n'est pas linéaire.

L'agrégation des globules rouges, qui requiert des zones de contact membranaire assez larges entre les cellules, est réduite par la diminution expérimentale de la

## 2.5. Paramètres influençant l'agrégation des érythrocytes



**Figure 2.6.:** Agrégation des globules rouges au travers de mesures de viscosité à bas taux de cisaillement en fonction de la mobilité électrophorétique de cellules traitées avec différentes enzymes (adapté depuis [Rampling *et al.*, 2004]).

déformabilité de la cellule [Baskurt *et al.*, 1998] [Nash et Meiselman, 1985] [Nash *et al.*, 1987]. En revanche, lorsque les globules rouges ne sont pas rigidifiés expérimentalement, il semble que l'altération de la déformabilité de leur membrane cellulaire n'ait pas de contribution sur leur capacité à s'agréger [Rampling *et al.*, 2004]. Par exemple, les cellules âgées ont plus tendance à s'agréger que les jeunes (voir paragraphe 2.5.1.1), tandis que leur capacité à former de larges zones de contact entre elles est réduite en raison de leur viscosité membranaire et cytoplasmique accrue [Linderkamp et Meiselman, 1982].

Il est possible d'envisager que les effets de la diminution de la couche de glycoprotéines soient prépondérant sur les effets de la réduction des zones de contact avec le vieillissement.

La charge surfacique du globule rouge due à la présence d'acide sialique, bien qu'influenciant sa capacité à s'agréger (voir paragraphe 2.4.1.1), ne suffit pas non plus à expliquer l'agrégation érythrocytaire. En effet, si l'on traite à la neuraminidase (voir paragraphe 2.4.1.1) des cellules séparées selon leur âge, le ratio d'agrégation (anciennes cellules / jeunes cellules) reste inchangé [Meiselman, 1993] [Nash *et al.*, 1987].

## 2. Le sang

### 2.5.2. Paramètres extrinsèques

Certains paramètres non liés au globule rouge lui-même sont connus pour favoriser ou inhiber l'agrégation. Ce sont des paramètres sur lesquels un expérimentateur peut avoir un contrôle.

#### 2.5.2.1. Propriétés physico-chimiques du milieu suspendant

Les paramètres qui agissent sur la composition ionique du milieu et sur son osmolarité ont des effets sur l'intensité des forces répulsives, et sur le volume et la forme du globule rouge. Ils auront donc une influence sur l'agrégation. Il a notamment été montré qu'une augmentation du pH du milieu suspendant accélérât l'agrégation, ceci était à mettre en relation avec l'augmentation de volume du globule rouge lorsque le pH diminue [Shiga *et al.*, 1983].

Par le biais de mesures sur un rhéoscope, il a été possible de montrer que la vitesse de formation des rouleaux de globules rouges induite par le fibrinogène, les immunoglobulines G et des macromolécules artificielles (voir paragraphe 2.5.2.2) s'accroît lorsque la température augmente. Il a également été prouvé que la relation entre vitesse d'agrégation des érythrocytes et la température varie selon la macromolécule utilisée [Maeda *et al.*, 1987].

#### 2.5.2.2. Macromolécules en suspension

**2.5.2.2.1. Fibrinogène** Le fibrinogène est une protéine trinodulaire de poids moléculaire 340 *kDa*, longue de 47,5 *nm*. Le nombre de molécules de fibrinogène à proximité de la surface d'un érythrocyte est d'environ  $2 \cdot 10^4$  [Rampling, 1980].

Il est à même de provoquer seul l'agrégation érythrocytaire [Chien et Jan, 1973]. Ceci se traduit par une augmentation de viscosité sanguine aux bas taux de cisaillement [Chien, 1970]. En utilisant la rétrodiffusion laser (érythroagrégamètre), on constate une augmentation significative des indices d'agrégation lorsque la concentration en fibrinogène augmente [Game *et al.*, 1996].

**2.5.2.2.2. Immunoglobulines G** Les immunoglobulines G sont des molécules en forme de Y ayant une masse moléculaire de 150 *kDa*, et une longueur d'environ 20 *nm*. Elles peuvent se lier aux globules rouges par un mécanisme spécifique immunologique. En revanche, le processus qui permet l'appariement non spécifique de globules rouges induit par les immunoglobulines G n'est quant à lui pas encore élucidé (voir section 2.4.1.4).

Au voisinage de la surface d'un érythrocyte en conditions physiologiques, on trouve environ  $4 \cdot 10^5$  immunoglobulines G non spécifiquement liées [Grob *et al.*, 1967].

Il existe plusieurs conclusions contradictoires dans la littérature quant à la capacité d'induire l'agrégation érythrocytaire des immunoglobulines G seules : d'une part, certaines publications concluent que les immunoglobulines G seules provoquent

## 2.5. Paramètres influençant l'agrégation des érythrocytes

l'agrégation érythrocytaire [Maeda et Shiga, 1986] (à faible hématoците) [Izumida *et al.*, 1991], tandis que d'autres parutions (à hématoците physiologique) soutiennent l'inverse [Game *et al.*, 1996].

En revanche, la littérature semble unanime sur le fait que les immunoglobulines G renforcent l'agrégation induite par le fibrinogène [Shiga *et al.*, 1990] [Game *et al.*, 1996]. Les structures formées par les érythrocytes en fonction du type de macromolécule en solution n'ont pas la même architecture. Elles seraient plutôt unidimensionnelles en présence de fibrinogène et tridimensionnelles en présence d'immunoglobulines [Shiga *et al.*, 1983].

**2.5.2.2.3. Albumine** L'albumine humaine est une protéine ellipsoïdale de masse moléculaire 66 *kDa* et de longueur 15 *nm*. On trouve à proximité de la surface de l'érythrocyte  $5 \cdot 10^6$  molécules d'albumine [Kikuchi et Koyama, 1984].

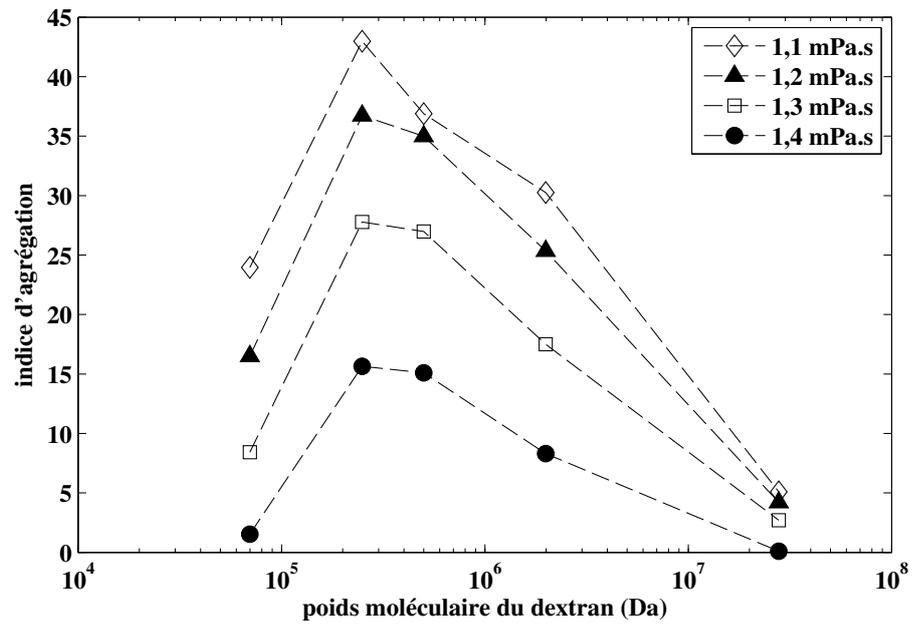
L'albumine seule n'est pas à même de provoquer l'agrégation des globules rouges. En revanche, elle est connue pour renforcer l'effet d'agrégation induit par le fibrinogène [Maeda et Shiga, 1986] [Rampling et Martin, 1992], et pour inhiber celle induite par les immunoglobulines [Maeda et Shiga, 1986].

**2.5.2.2.4. Autres macromolécules** Les solutions de certains polymères à longue chaîne, tels que les dextrans, sont capables de provoquer l'agrégation érythrocytaire. Notamment, le poids moléculaire du dextran en solution a une influence sur la capacité à agréger les globules rouges en suspension [Neu *et al.*, 2008] (voir figure 2.7).

Par le biais de mesures de microscopie à force atomique, il a été établi que les forces d'adhésion entre deux globules rouges dans une solution de dextran variaient entre 14 et 23 *pN* dans du dextran 70, et entre 43 et 169 *pN* dans du dextran 150 [Steffen *et al.*, 2013]. Des corrélations entre agrégation des globules rouges dans du plasma autologue et dans une solution de polymère (connu pour sa capacité à provoquer l'agrégation érythrocytaire) ont été établies [Nash *et al.*, 1987] [Sowemimo-Coker *et al.*, 1989]. Grâce à des mesures réalisées avec un agrégomètre, des globules rouges présentant un fort index d'agrégation dans du plasma présenteront également un fort index d'agrégation dans un polymère neutre, et vice-versa (voir fig. 2.8 et tab. 2.1). Un cône-plan transparent est monté sur l'agrégomètre. Le sang est d'abord brièvement cisailé à 600  $s^{-1}$  afin de détruire les agrégats, puis le taux de cisaillement est fixé brutalement à 0. la transmission de lumière (méthode de Klose *et al.*) est alors intégrée pendant 10 *s*, donnant alors l'indice d'agrégation *M*. Cet indice nous renseigne sur la propension des globules rouges à s'agréger sur le temps de mesure.

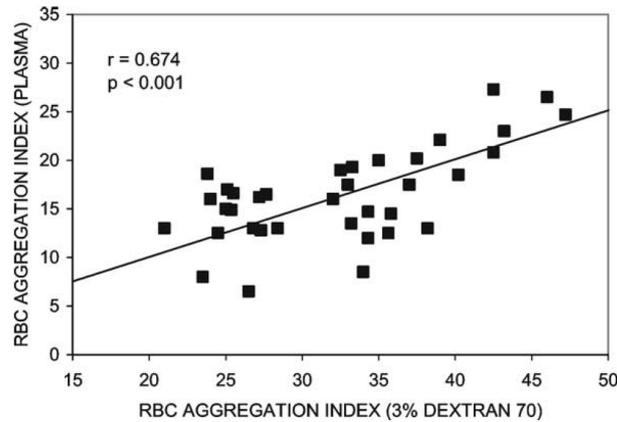
Il est intéressant de souligner que la différence d'agrégabilité entre des globules rouges provenant de donneurs différents dans des polymères neutres signifie bien qu'il existe des variations de sujet à sujet dans les facteurs responsables de l'agrégation érythrocytaire. Cela signifie également que les mécanismes responsables de

## 2. Le sang



**Figure 2.7.:** Indices d'agrégation pour des globules rouges de sujets normaux suspendus dans des solutions de viscosité différentes de dextrans dont le poids moléculaire varie [Neu *et al.*, 2008]. La valeur de  $M$  est calculée comme suit : En utilisant un instrument à géométrie cône plan transparente (Agrégomètre ; Myrenne, Röntgen, Allemagne) utilisant la méthode de transmission de lumière de Klose *et al.* Le sang est d'abord brièvement cisailé à  $600 \text{ s}^{-1}$  afin de détruire les agrégats, puis le taux de cisaillement est fixé brutalement à 0, après quoi la transmission de lumière est intégrée pendant 10 s.

## 2.5. Paramètres influençant l'agrégation des érythrocytes



**Figure 2.8.:** Indices d'agrégation pour des globules rouges de sujets normaux suspendus dans du plasma autologue en fonction des indices d'agrégation des mêmes globules dans une solution de dextran 70 à 3 % [Rampling *et al.*, 2004]

l'agrégation sont probablement de même nature quel que soit l'agent proagrégant.

**Table 2.1.:** Corrélation entre l'agrégation induite par le plasma et celle induite par différents polymères [Rampling *et al.*, 2004]

Polymère	Coefficient de corrélation
dextran 70	0,67
PVP 360	0,88
P-L-Glu	0,93
Héparine	0,65

En ce qui concerne les protéines présentes naturellement dans le plasma humain, une étude semble montrer que certaines molécules (Immunoglobulines M, Immunoglobulines A, etc.) ont une influence significative sur l'agrégation des globules rouges [Game *et al.*, 1996].

### 2.5.2.3. Taux de cisaillement

En raison des forces hydrodynamiques dans une suspension cisillée, la taille des agrégats atteint un équilibre en fonction du cisaillement [Copley *et al.*, 1975]. Celle-ci diminue lorsque le cisaillement augmente.

La vitesse de formation des agrégats croît avec le cisaillement (lorsque celui-ci est assez faible) en raison de l'augmentation de la fréquence de collision. Il existe un taux de cisaillement critique au-delà duquel la vitesse de formation des rouleaux en

## 2. Le sang

fonction du cisaillement décroît. Celui-ci est estimé à  $5,5 \text{ s}^{-1}$  d'après une simulation numérique [Murata et Secomb, 1987]. En pratique, dans ce régime, les forces hydrodynamiques visqueuses dominent les forces attractives de collision [Quemada, 1978].

## 2.6. Propriétés mécaniques du sang

### 2.6.1. Problèmes spécifiques liés à la rhéométrie sanguine

#### 2.6.1.1. Synérèse

Dans le cas du sang et des suspensions de globules rouges, l'effet de synérèse correspond à la formation d'une couche déplétée en globules à proximité des parois solides, lorsque la suspension s'écoule. L'apparition d'une telle couche est le résultat de la migration des globules rouges et des agrégats à travers les lignes de courant de l'écoulement, en s'éloignant des parois [Kim *et al.*, 2009].

Le processus à l'origine de cette migration axiale n'est pas encore totalement compris. Il est lié à la déformabilité et à la taille des globules rouges [Secomb *et al.*, 2007].

La synérèse a été observée non seulement dans le cas d'écoulement dans des tubes [Cokelet et Goldsmith, 1991], mais également pour celui des viscosimètres rotationnels [Cokelet *et al.*, 2005].

Elle est potentiellement à l'origine d'un artefact dans la mesure de viscoélasticité sanguine. En effet, l'échantillon cisailé n'est pas homogène, puisque constitué d'une couche pariétale mince déplétée en cellules, et d'un volume central comportant une concentration en cellule légèrement supérieure à celle de l'échantillon global.

Une modification de la taille de la couche déplétée en globules rouges a une influence sur la viscosité apparente de la suspension [Reinke *et al.*, 1986] [Cokelet et Goldsmith, 1991] [Reinke *et al.*, 1987] [Alonso *et al.*, 1993] [Alonso *et al.*, 1995].

#### 2.6.1.2. Sédimentation

L'équation de Stokes pour la sédimentation de sphères donne la vitesse terminale  $U$  d'une particule sphérique de diamètre  $D$  et de masse volumique  $\rho_s$  qui sédimente de façon laminaire dans un fluide de viscosité  $\mu$  et de masse volumique  $\rho$  :

$$U = \frac{(\rho_s - \rho)gD}{\mu}$$

Pour des particules non sphériques, la vitesse terminale  $U$  est obtenue en multipliant le terme de droite de l'équation ci-dessus par un facteur de forme empirique. En raison de la différence de densité entre le plasma (environ 1,02) et les globules

rouges (environ 1,09), ceux-ci vont sédimenter. La densité des globules rouges augmente avec l'âge cellulaire. Par conséquent, lorsque la sédimentation se produit, les cellules âgées sédimenteront plus rapidement ( $\rho_s$  augmente). On retrouve donc de façon prédominante des cellules plus âgées dans la partie basse des culots de globules rouges sédimentés ou centrifugés, et des cellules plus jeunes dans la partie haute [Borun *et al.*, 1957]. La centrifugation est par conséquent employée pour trier les globules rouges sur un critère d'âge (voir section 2.5.1.1). Il est à noter que les leucocytes, qui ont une densité moyenne de 1,07 – 1,08, et les plaquettes, qui ont une densité moyenne de 1,03, se retrouvent après centrifugation dans la couche supérieure du culot cellulaire. Il est donc aisé de retirer cette couche blanchâtre lorsque l'on lave les globules rouges.

À densités égales, des particules de diamètre plus important auront tendance à sédimenter plus rapidement. C'est pourquoi les agrégats de globules rouges sédimenteront plus vite que les globules rouges isolés. La vitesse de sédimentation est d'ailleurs un paramètre utilisé en diagnostic, car elle renseigne sur la capacité des globules rouges à s'agréger.

Lors de mesures rhéométriques sur le sang, il est recommandé de resuspendre les globules rouges par agitation avant chaque point de mesure. Il n'est par exemple pas souhaitable d'effectuer un balayage en cisaillement ou en fréquence sans agiter la suspension entre chaque étape [Baskurt *et al.*, 2009].

### 2.6.1.3. Migration de protéines à l'interface avec l'air

Certaines protéines (notamment l'albumine) s'adsorbent à l'interface liquide-air, et forment un film viscoélastique [Sharma *et al.*, 2011]. Dans ces conditions, on mesure usuellement une contrainte seuil et un module élastique supérieur au module visqueux, non représentatifs de la rhéologie du matériau étudié. Il n'existe pas de moyen simple de corriger les mesures obtenues.

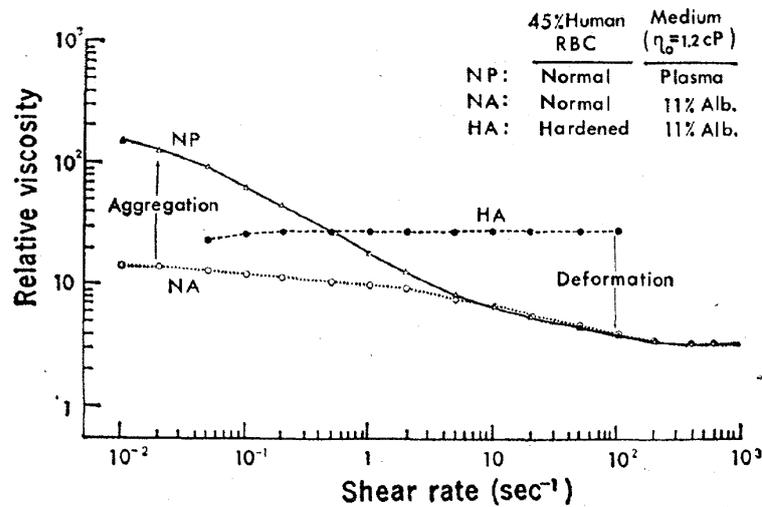
### 2.6.2. Caractère rhéofluidifiant du sang

Le caractère rhéofluidifiant du sang est bien connu depuis les années 60 [Copley et Stainsby, 1960].

En effet, en 1970 Chien a réalisé des mesures rhéométriques sur trois types de suspensions [Chien, 1970] :

- La première est une suspension de globules rouges dans du plasma autologue contenant de l'héparine,
- La seconde est une suspension de globules rouges dans une solution à 11 % d'Albumine-Ringer (qui a la même viscosité que le plasma, mais ne provoque pas l'agrégation des globules rouges),
- La troisième est une suspension de globules rouges durcis par la glutaraldéhyde dans le même tampon Albumine-Ringer que précédemment.

## 2. Le sang



**Figure 2.9.:** Viscosité de sang total (courbe NP), de globules rouges suspendus dans une solution de 11 % albumine-Ringer (courbe NA) et de globules rouges durcis dans une solution de 11 % albumine-Ringer (HA) en fonction du taux de cisaillement (d'après [Chien, 1970]).

Toutes trois sont à hématocrite 0,45. La viscosité relative de ces trois suspensions en fonction du cisaillement de  $0,01$  à  $500 \text{ s}^{-1}$  est déterminée à l'aide d'un rhéomètre rotationnel classique (Voir figure 2.9).

Aux faibles taux de cisaillement, la formation des agrégats dans la suspension de globules rouges dans du plasma autologue entraîne une augmentation de viscosité 10 fois supérieure par rapport à celle des globules rouges dans du tampon albumine-Ringer. Puis, lorsque le cisaillement augmente, on observe une chute de viscosité relative de plus d'une décade. Ceci est lié à la destruction progressive des agrégats lorsque le cisaillement augmente. À partir d'un taux de cisaillement d'environ  $5 - 6 \text{ s}^{-1}$ , les courbes de viscosité relative des suspensions en plasma autologue et en albumine Ringer sont superposées. Cela prouve qu'à partir de ce cisaillement, la viscosité n'est plus liée à l'agrégation des globules rouges.

La suspension en tampon albumine-Ringer de globules rouges rigidifiés a, quant à elle, une viscosité relative supérieure à celle de la suspension de globules rouges normaux dans le même tampon. Cette différence est attribuable à la déformation et à l'orientation des globules rouges selon les lignes de courant de l'écoulement.

Copley et al. ont visualisé à l'aide d'un rhéogoniomètre les agrégats de globules rouges dans du plasma autologue formés sous différents cisaillements [Copley *et al.*, 1975]. Leur procédure consiste à appliquer un pré-cisaillement de  $1000 \text{ s}^{-1}$  à l'échantillon, puis à appliquer le cisaillement désiré. À partir de cet instant, ils prennent un cliché de microscopie optique dans le rhéogoniomètre toutes les 30 secondes. Pour des taux de cisaillement allant de  $0,01$  à  $1 \text{ s}^{-1}$ , ils observent la formation de rouleaux. La viscosité du sang décroît avec le cisaillement. À partir d'un taux de cisaille-

ment de  $10 \text{ s}^{-1}$ , aucun rouleau n'est visible dans la suspension pendant les quatre minutes que dure la mesure. Ceci est cohérent avec les observations comparatives de viscosités de suspensions de globules rouges dans du plasma autologue (qui est proagrégant) et de suspensions de globules rouges dans un tampon albumine-Ringer (non proagrégant) exposées ci-dessus.

En définitive, le caractère rhéofluidifiant du sang est donc attribué à la conjugaison de plusieurs effets :

- À faible taux de cisaillement, de nombreux agrégats d'érythrocytes se forment dans la solution (voir section 2.4). Ils sont détruits à mesure que le taux de cisaillement augmente dans la suspension. La viscosité en présence d'agrégats est 10 fois supérieure à celle d'une suspension sans agrégats, ces derniers ont donc une contribution très importante à la viscosité du sang. L'augmentation du taux de cisaillement entraîne la destruction progressive de ceux-ci (voir section 2.5.2.3), et par conséquent une rhéofluidification importante de la solution.
- À fort taux de cisaillement, les globules rouges changent de forme jusqu'à devenir des ellipsoïdes plats orientés selon les lignes de courant [Suda *et al.*, 1982]. Ceci est permis par les propriétés mécaniques de leur membrane (voir paragraphe 2.3.2.2.4). Cela se traduit par une légère rhéofluidification alors qu'il n'y a plus d'agrégats dans la suspension.

### 2.6.3. Seuil d'écoulement du sang

Un fluide a seuil est un milieu dans lequel un écoulement peut se mettre en place à la seule condition qu'une contrainte supérieure à un palier critique lui soit appliquée.

En 1963, Merrill *et al.* mettent en évidence un seuil d'écoulement dans le sang grâce à des mesures de rhéométrie rotative [Merrill *et al.*, 1963b]. Ils utilisent deux méthodes différentes pour estimer la valeur du seuil. La première consiste à extrapoler leurs données à l'aide d'une loi de Casson (voir figure 2.10) :

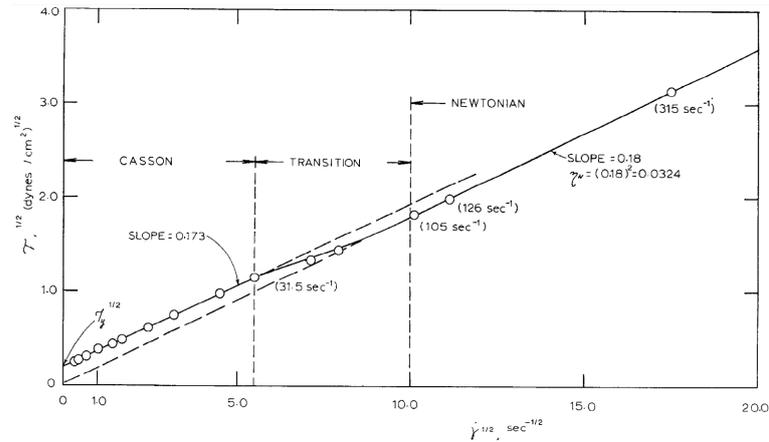
$$\tau^{\frac{1}{2}} = \tau_0^{\frac{1}{2}} + S\gamma^{\frac{1}{2}}$$

Où :

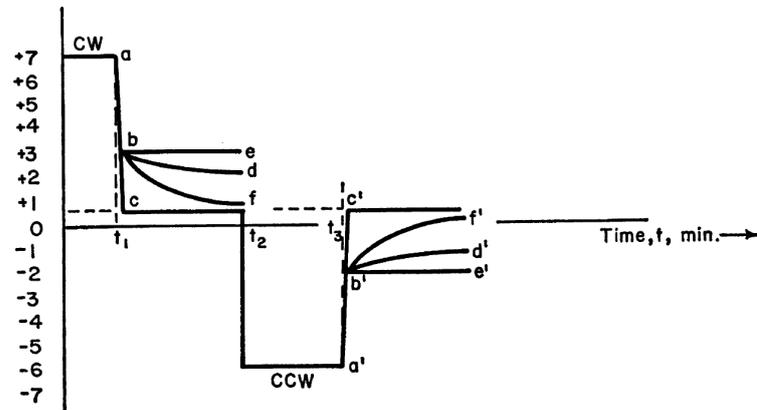
- $\tau$  est la contrainte,
- $\gamma$  est le taux de cisaillement,
- $\tau_0$  est la valeur du seuil d'écoulement,
- $S$  est une constante homogène à une viscosité.

L'autre manière de procéder consiste à enregistrer la relaxation de contrainte à un cisaillement donné. Ils effectuent un enregistrement du couple en utilisant une rotation horaire de l'outil, et en stoppant brutalement celle-ci à  $t_1$  (voir figure 2.11). Le couple est acquis pendant l'intervalle de temps entre  $t_1$  et  $t_2$  lors de la phase de relaxation de contrainte. Dans le cas du sang, le type de courbe de couple observée en pratique est *abd*. Par la suite, une rotation antihoraire à la même vitesse est

## 2. Le sang



**Figure 2.10.:** Racine carrée de la contrainte en fonction de la racine carrée du taux de cisaillement pour du sang à hémocrite 0,40 et 2,7 g/l de fibrinogène à 37°C (d'après [Merrill et Pelletier, 1967]).



**Figure 2.11.:** Schéma illustratif expliquant la façon d'extraire la valeur du seuil de contrainte de mesures de relaxation de contrainte (d'après [Merrill *et al.*, 1963a]).

appliquée sur l'intervalle de temps  $[t_2; t_3]$ , et stoppée nette en  $t_3$ . Le couple est encore acquis lors de la seconde phase de relaxation de contrainte. De même, le sang suivra une courbe du type  $a'b'd'$  lors de cette étape. La valeur du seuil de contrainte est extraite de ce type de données en prenant la moyenne entre  $b$  et  $b'$ , éliminant ainsi l'erreur sur le zéro.

Ils ont employé des échantillons sanguins à hémocrite entre 0,1 et 0,5, et ont déterminé des seuils de contrainte entre 0,1 et 25 *mPa*. Ils ont également remarqué que le seuil de contrainte était proportionnel au cube de l'hémocrite. Enfin, ils ont établi qu'à hémocrite comparable, le seuil de contrainte dépendait de l'individu.

Merrill *et al.* ont également employé une technique de rhéométrie capillaire pour évaluer le seuil de contrainte du sang [Merrill *et al.*, 1965]. Comme précédemment, la méthode consiste à évaluer la valeur limite de contrainte pour laquelle le cisaillement

## 2.6. Propriétés mécaniques du sang

est nul. En rhéométrie capillaire, les données disponibles sont la pression appliquée  $\Delta P$  et le débit  $Q$ . La contrainte à la paroi  $\tau_p$  est obtenue à l'aide de la relation :

$$\tau_p = \frac{\Delta P D}{4L}$$

Avec :

- $D$  le diamètre du capillaire,
- $L$  la longueur du capillaire.

Le cisaillement apparent est obtenu par l'intermédiaire de la relation :

$$\bar{U} = \frac{4Q}{\pi D^3}$$

Celle-ci suppose que le profil de vitesse dans le capillaire correspond à celui d'un écoulement de Poiseuille.

En utilisant des tubes capillaires de diamètres 523 et 850  $\mu m$ , ils ont tracé les courbes donnant la pression en fonction du débit. Ils ont ensuite extrapolé les courbes pour obtenir la valeur limite vers laquelle tend la contrainte lorsque le cisaillement tend vers 0. De cette manière, ils ont évalué qu'à hématoците 0,4, le seuil d'écoulement du sang se situe entre 3 et 4  $mPa$ .

Charm et Kurland ont quant à eux estimé les seuils de contrainte en utilisant une méthode de sédimentation [Charm et Kurland, 1967]. Cette méthode consiste à laisser du sang sédimenter dans un tube conique dont le diamètre varie linéairement entre 0,2  $cm$  et 30  $\mu m$ .

Il existe une hauteur dans le tube pour laquelle la sédimentation ne se produit plus. Cela correspond au diamètre pour lequel une couche de globules rouge délimitée verticalement par l'épaisseur d'une cellule exerce sur la couche supérieure, tenue par les parois, une contrainte inférieure ou égale à la contrainte seuil. Pour des échantillons sanguins dont les hématoците sont dans la gamme  $[0,1 ; 0,55]$ , des valeurs de seuil entre 7 et 30  $mPa$  sont mesurées.

Benis et Lacoste ont développé une méthode afin d'étudier le seuil de contrainte du sang : la balance viscosimétrique [Benis et Lacoste, 1968]. Le principe repose sur le retour à l'équilibre d'un plateau placé dans une cuve remplie de sang, à la suite d'un déplacement vers le haut et d'un autre vers le bas. Le plateau est relié à une balance analytique. Lors de la décroissance de la contrainte consécutive à un déplacement du plateau, la balance atteint une valeur de façon asymptotique. En fonction du sens de déplacement du plateau, ces valeurs sont égales, mais de signes opposés. La valeur du seuil de contrainte  $\tau_0$  est extraite de ces dernières comme suit :

$$\tau_0 = \frac{\Delta M S g}{2A}$$

Avec :

- $A$  l'aire du plateau,

## 2. Le sang

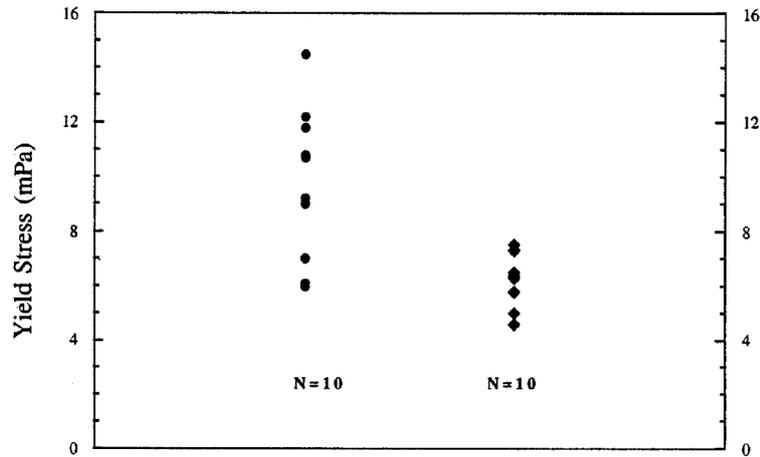
- $S$  la sensibilité de la balance,
- $\Delta M$  le nombre de divisions de la balance séparant les valeurs asymptotiques obtenues par un déplacement vers le haut et vers le bas du plateau,
- $g$  valeur du champ de gravité.

Picart et al. ont mesuré à l'aide d'un rhéomètre rotationnel Contraves Low Shear 40 équipé d'une géométrie de Couette la contrainte pour des échantillons de sang ayant des hématocrites entre 0,53 et 0,95, en fonction du cisaillement appliqué entre  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  et  $10 \text{ s}^{-1}$  [Picart *et al.*, 1998]. Après avoir vérifié qu'à faible cisaillement la contrainte semblait tendre vers une valeur seuil lorsque le rhéomètre était équipé d'une géométrie rugueuse, ils ont pris comme approximation de la valeur du seuil la contrainte à un taux de cisaillement de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Les seuils de contrainte ont été évalués entre 2 et 20 *mPa*.

À l'instar de Merrill et al. [Merrill *et al.*, 1963b], ils ont établi que la valeur du seuil de contrainte était proportionnelle au cube de l'hématocrite, et qu'il existait une variabilité entre les individus. Ils ont également montré que la nature de la paroi était une donnée fondamentale pour la mesure du seuil de contrainte. En effet, seules les mesures effectuées avec une géométrie rugueuse donnent un comportement caractéristique de fluide à seuil. Ils attribuent cela à un effet de synergie sur les géométries lisses (voir section 2.6.1.1).

Picart et al. ont également comparé les valeurs de seuil d'écoulement de sangs d'individus sains, et d'individus atteints de sclérodémie, à l'aide de mesures de rhéométrie rotative (en employant la même méthodologie que celle décrite ci-dessus). Ils ont ainsi établi que les patients atteints de sclérodémie avaient en moyenne un seuil d'écoulement plus élevé de 56 % à hématocrite 0,6 que les individus du groupe contrôle (voir figure 2.12).

Néanmoins, l'existence du seuil d'écoulement est l'objet de controverses, en raison des difficultés expérimentales pour le mettre en évidence [Fung *et al.*, 1972]. Chien et al. signifient en 1966 que le comportement rhéologique qu'ils mesurent sur du sang n'est pas caractéristique de la présence d'un seuil de contrainte [Chien *et al.*, 1966]. Ils ont néanmoins effectué une extrapolation de leurs données à l'aide d'une loi de Casson pour comparer leurs valeurs avec celles de Merrill, et ont ainsi pu estimer des « pseudo-seuils » entre 0,7 et 40 *mPa*. Ils soulignent que la dépendance ce type de mesure avec le temps peut produire des artefacts expérimentaux. C'est ce que confirme l'étude récente de Fall et al. sur la rhéologie des particules qui sédimentent [Fall *et al.*, 2009] [Fall *et al.*, 2013]. Ils ont en effet montré que la sédimentation (ou le crémage) de particules peu browniennes de densité différente de la solution suspendante conduit au développement d'un seuil d'écoulement par la suspension, alors que ce seuil n'existe pas dans une suspension isodense équivalente.



**Figure 2.12.:** Contraintes seuils estimées à partir de la valeur de contrainte à  $10^{-3} s^{-1}$  pour des sangs à hémocrite 0,6 d'individus atteints de sclérodémie (à gauche) et d'individus sains (à droite) (d'après [Picart *et al.*, 1999]).

#### 2.6.4. Viscoélasticité du sang

Le caractère visqueux d'un matériau décrit sa propension à dissiper l'énergie qui lui est appliquée par le biais d'un cisaillement. À l'opposé, le caractère élastique d'un matériau est sa propension à restituer l'énergie qui lui est fournie.

Alors que les premières études mécaniques sur le sang ne mettaient en évidence que ses propriétés visqueuses, Thurston a le premier montré que le sang possédait également une élasticité non négligeable [Thurston, 1972].

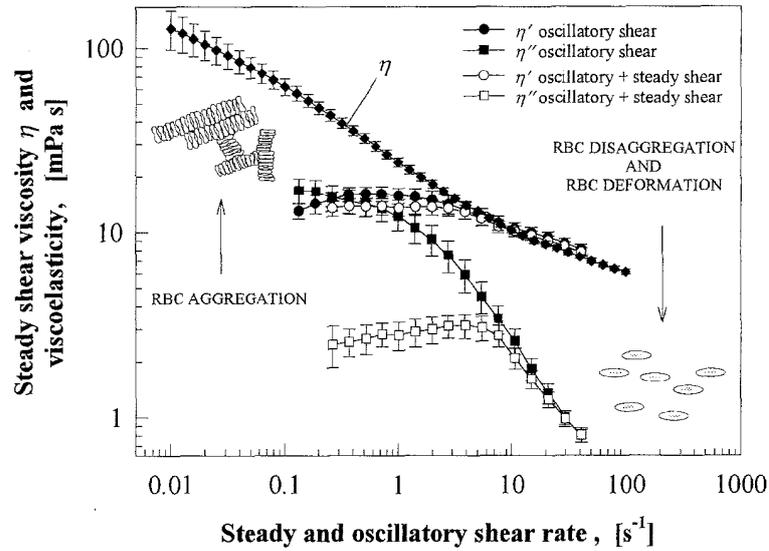
Vlastos *et al.* ont réalisé des mesures rhéométriques sur des échantillons de sang total à hémocrite 0,45 à l'aide d'un Contraves Low Shear 40 muni d'une géométrie de Couette [Vlastos *et al.*, 1997]. La procédure de test permet d'obtenir différentes données :

- La viscosité de cisaillement entre  $0,01$  et  $100 s^{-1}$ ,
- La viscoélasticité au repos à fréquence  $0,5 Hz$  pour des amplitudes de déformation de cisaillement entre  $5$  et  $1311 \%$ ,
- La viscoélasticité du matériau cisailé à  $2 s^{-1}$ , en superposant ce cisaillement à des oscillations entre  $0,03$  et  $5 Hz$  à amplitude de déformation constante de  $20 \%$ .

Ces résultats sont résumés dans la figure 2.13.

À cisaillement faible (entre  $0,1$  et  $0,2 s^{-1}$ ) à  $0,5 Hz$ , ils mesurent une élasticité supérieure à la viscosité. En superposant un cisaillement constant, la viscosité  $\eta'$  diminue légèrement, et l'élasticité  $\eta''$  diminue d'un facteur 10 par rapport à l'élasticité du sang au repos. Ils ont également montré que cet effet était dépendant du taux de cisaillement superposé. Plus le cisaillement superposé augmente, plus les modules diminuent jusqu'à atteindre un plateau (l'élasticité n'est plus mesurable au-delà de

## 2. Le sang



**Figure 2.13.:** Viscosité  $\eta$  en fonction du taux de cisaillement pour du sang total à hémocrite 0,45 moyennée sur 32 individus sains ; partie réelle  $\eta'$  et imaginaire  $\eta''$  de la viscosité complexe à 0,5 Hz en fonction du taux de cisaillement pour du sang total à hémocrite 0,45 au repos (symboles pleins) et cisailé de façon constante à 0,2 s<sup>-1</sup> (symboles ouverts) moyennées sur 7 individus sains (d'après [Vlastos *et al.*, 1997]).

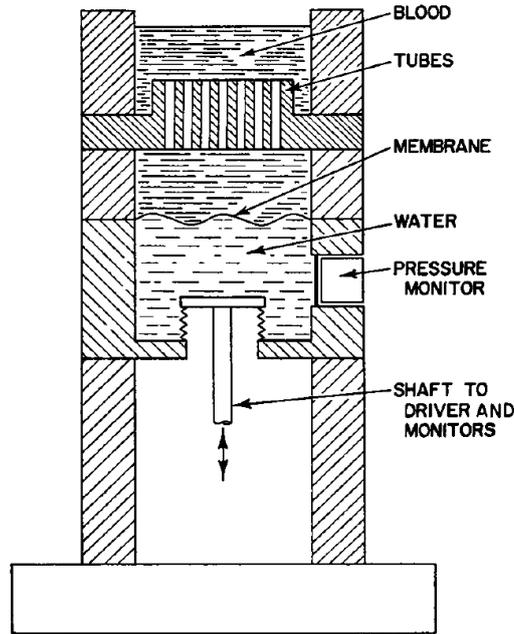
1 s<sup>-1</sup>). Les balayages en fréquence sont réalisés dans le domaine non linéaire du sang, à 20 % de déformation. À très fort cisaillement, il n'y a plus de variation significative des paramètres viscoélastiques avec le cisaillement superposé.

Thurston est l'auteur qui a le plus étudié la viscoélasticité du sang au moyen d'une méthode de tubes oscillants. Cette technique utilise un écoulement oscillatoire dans des tubes en parallèle (voir figure 2.14) pour étudier les propriétés viscoélastiques du sang.

La donnée connue est le débit instantané  $U$ , à travers la course du piston et de sa section. En postulant que l'écoulement dans les tubes a un profil de Poiseuille,  $r$  étant le rayon des tubes, le gradient de vitesse moyen est :

$$\bar{\gamma} = \frac{8U}{3\pi r^3}$$

Il effectue des mesures de pression, et sépare la composante de pression en phase avec le débit instantané  $p'$  de la composante en quadrature de phase avec le débit instantané  $p''$ . Les relations liant ces grandeurs à la composante visqueuse  $\tau'$  et à la composante élastique  $\tau''$  de la contrainte de cisaillement moyenne dans le fluide sont [Thurston, 1973] :



**Figure 2.14.:** Schéma du dispositif expérimental de tubes oscillants utilisé par Thurston pour réaliser des mesures de viscoélasticité sanguine (d'après [Thurston, 1972]).

$$p' = \frac{3}{r} \tau'$$

$$p'' = \frac{4\rho\omega}{3\pi r^2} U - \frac{3}{r} \tau''$$

Il est ensuite possible d'en déduire les composantes réelles et imaginaires de la viscosité complexe en utilisant :

$$\eta' = \frac{\tau'}{\bar{\gamma}}$$

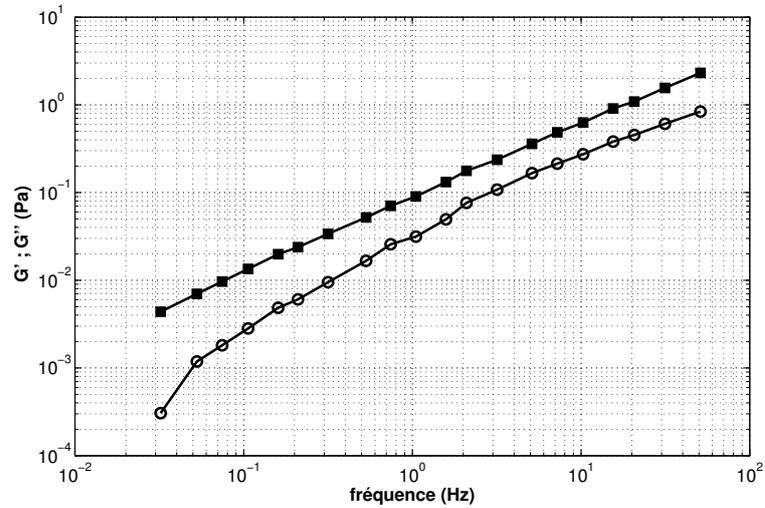
$$\eta'' = \frac{\tau''}{\bar{\gamma}}$$

De cette manière, à partir des données obtenues par cette méthode on recalcule les modules élastiques et visqueux de globules rouges resuspendus dans du plasma autologue à hémocrite 0,5 (voir figure 2.15).

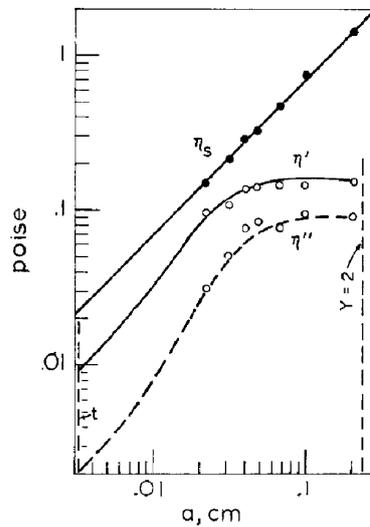
Thurston a ensuite établi que la viscoélasticité mesurée était dépendante du diamètre des tubes employés [Thurston, 1976] (voir figure 2.16).

Pour expliquer ce résultat en contradiction avec ses travaux précédents, il postule l'existence d'une zone pariétale dans laquelle le cisaillement est trop important pour

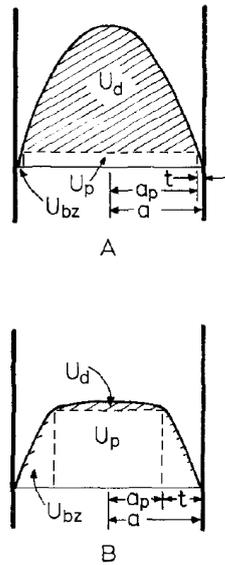
## 2. Le sang



**Figure 2.15.:** Module élastique  $G'$  (cercles ouverts) et visqueux  $G''$  (carrés pleins) en fonction de la fréquence pour du sang constitué de globules rouges resuspendus dans du plasma autologue à hémocrite 0,5, et à  $25^{\circ}\text{C}$ , obtenus par une méthode de tubes oscillants (reconstitué à partir de [Thurston, 1973]).



**Figure 2.16.:** Viscosité apparente  $\eta_s$ , partie réelle  $\eta'$  et imaginaire  $\eta''$  de la viscosité complexe en fonction du diamètre du tube pour du sang constitué de globules rouges resuspendus dans du plasma autologue à hémocrite 0,59, obtenues par une méthode de tubes oscillants. Les lignes représentent les données obtenues à l'aide d'un modèle prenant en compte l'existence d'une zone pariétale très cisailée, et d'une zone centrale bouchon (d'après [Thurston, 1976]).



**Figure 2.17.:** Schéma explicatif des profils de vitesse lors d'un écoulement oscillatoire de sang dans des tubes. A. Cas de tubes de rayon important devant la taille caractéristique  $t$  de la zone de cisaillement important. B. Cas de tubes de rayon faible devant  $t$  (d'après [Thurston, 1976]).

que les globules rouges puissent s'agréger. Ainsi, dans les tubes de faible diamètre, l'importance relative de cette zone par rapport à l'écoulement total est importante. Par conséquent la viscosité diminue. Dans les tubes de plus grands diamètres (à partir d'environ  $0,06 \text{ cm}$ ), l'influence de cette zone devient négligeable, et par conséquent,  $\eta'$  et  $\eta''$  ne dépendent plus du diamètre du tube. Cela se traduirait donc dans les tubes de faible diamètre par l'existence d'un écoulement bouchon, avec une zone pariétale très cisailée et une zone centrale quasiment non cisailée (voir figure 2.17).

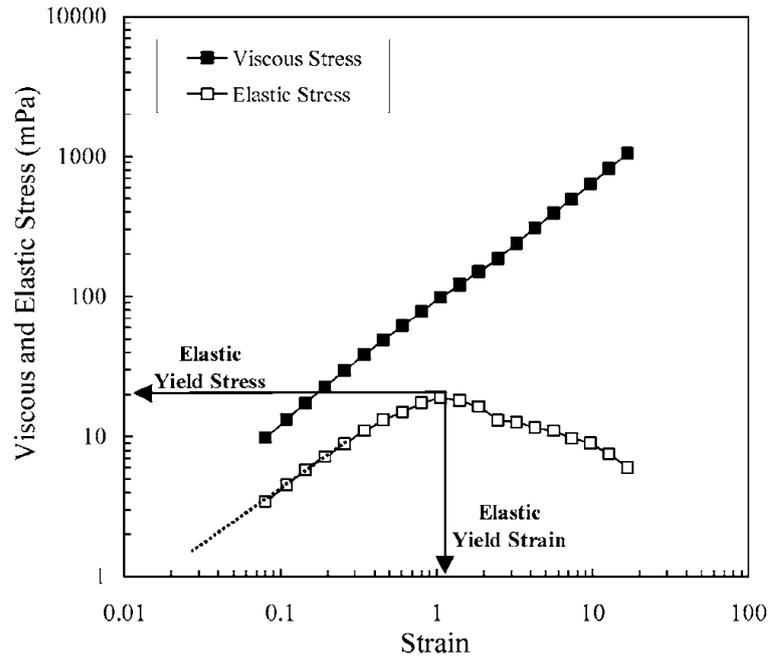
Il développe alors un modèle où le débit total est séparé en plusieurs parties :

- la contribution liée à l'écoulement bouchon  $U_p$ ,
- la contribution liée à l'écoulement cisailé proche de la paroi  $U_{bz}$ ,
- la contribution liée au cisaillement qui existe dans la zone centrale de l'écoulement  $U_d$ .

À l'aide de ce modèle, il obtient une bonne prédiction des données expérimentales de viscosité complexe (voir figure 2.16). Afin d'obtenir cela, les paramètres du modèle utilisés sont les suivants :

- $t$  l'épaisseur de la zone pariétale à  $0,0032 \text{ cm}$ ,
- $\eta'_{bz}$  la partie réelle de la viscosité complexe de la zone pariétale à  $0,035 P$ ,
- $\eta''_{bz}$  la partie imaginaire de la viscosité complexe de la zone pariétale à  $0,008 P$ ,
- $\eta'_d$  la partie réelle de la viscosité complexe de la zone centrale cisailée de  $0,15 P$ ,
- $\eta''_d$  la partie imaginaire de la viscosité complexe de la zone centrale cisailée à  $0,088 P$ ,
- $(\eta_{bz}/t)$  le rapport entre la viscosité de la zone pariétale et son épaisseur à

## 2. Le sang



**Figure 2.18.:** Parties visqueuse et élastique de la contrainte mesurée à l'aide d'un montage de tubes oscillants sur du sang à hémocrite 0,44 (d'après [Baskurt *et al.*, 2007]).

28  $P/cm$ .

Thurston met également en évidence l'existence d'une transition mécanique du sang en fonction de la contrainte appliquée par la méthode de tubes oscillants décrite ci-dessus. En effet, en augmentant le cisaillement appliqué au sang (via l'amplitude en débit), la contrainte augmente de façon linéaire d'abord, puis non linéaire jusqu'à atteindre un maximum (voir figure 2.18). Après ce seuil, lorsque l'on continue à augmenter le cisaillement, la contrainte diminue. Ce maximum de contrainte est appelé seuil élastique de contrainte.

À cisaillement élevé, Thurston avance que les propriétés mécaniques du sang sont dues aux globules rouges qui s'orientent et s'organisent en couches denses glissant entre elles sur des couches de plasma [Thurston, 1989] [Thurston, 1993] [Thurston, 1994].

Il est généralement difficile de déterminer si les mesures effectuées par Thurston sont dans le domaine linéaire ou non. En effet, il vérifie systématiquement qu'il existe une zone dans laquelle les grandeurs mesurées varient linéairement, mais il ne spécifie pas exactement le cisaillement correspondant. Il n'est possible de disposer que d'une estimation de celui-ci. Les concentrations en protéines plasmatiques ne sont généralement pas reportées.

D'une manière générale, très peu de mesures d'élasticité sanguine ont été effectuées de façon certaine dans le domaine linéaire du sang. Parmi celles-ci, on peut citer des

résultats non publiés de la thèse de Picart obtenus en rhéométrie rotationnelle [Picart, 1997]. Les valeurs d'élasticité sont obtenues en mesurant la pente de l'augmentation de la contrainte lors de l'application soudaine d'un faible cisaillement. Typiquement, ces valeurs varient entre 1 et 10  $mPa$  environ en fonction de la concentration en fibrinogène (entre 3 et 6,5  $g/l$ ), et de l'hématocrite (0,44 ou 0,57).

D'autres études rapportent des mesures d'élasticité sanguine en rhéométrie rotationnelle clairement dans le régime non linéaire. Ces mesures ne sont comparables qu'à des taux de déformation équivalents.

Chien et al. [Chien *et al.*, 1975] ont réalisé des mesures de viscoélasticité à l'aide d'un rhéogoniomètre Weissenberg, à un taux de déformation d'environ 100 %. Ils ont ainsi comparé les parties réelles et imaginaires de la viscosité complexe  $\eta^*$  de suspensions de globules rouges dans du tampon albumine-Ringer, et dans du plasma autologue à plusieurs hématocrites. Ils constatent en se basant sur des observations microscopiques réalisées avec le même dispositif [Copley *et al.*, 1975] [Usami *et al.*, 1975] que les agrégats se fractionnent progressivement lorsque la fréquence d'oscillation augmente. Cela se traduit par une baisse de l'élasticité. Il mettent ainsi en évidence deux régimes viscoélastiques :

- le premier à basse fréquence qui correspond à une élasticité élevée, qu'ils attribuent à la déformation du réseau formé par les globules rouges agrégés,
- le second à haute fréquence qui correspond à une élasticité beaucoup plus basse, qu'ils attribuent à la déformation des globules rouges.

### 2.6.5. Paramètres influençant la viscoélasticité du sang

Les paramètres qui vont influencer la viscoélasticité du sang sont les même que ceux qui vont influencer l'agrégation des globules rouges (voir section 2.4). En effet, la viscoélasticité sanguine dépend de la taille des agrégats de globules rouges (voir section 1.4), qui est liée à ces paramètres. Nous allons dans cette partie revenir uniquement sur les paramètres étudiés dans la littérature qui ne recoupent pas les résultats de la section 2.4.

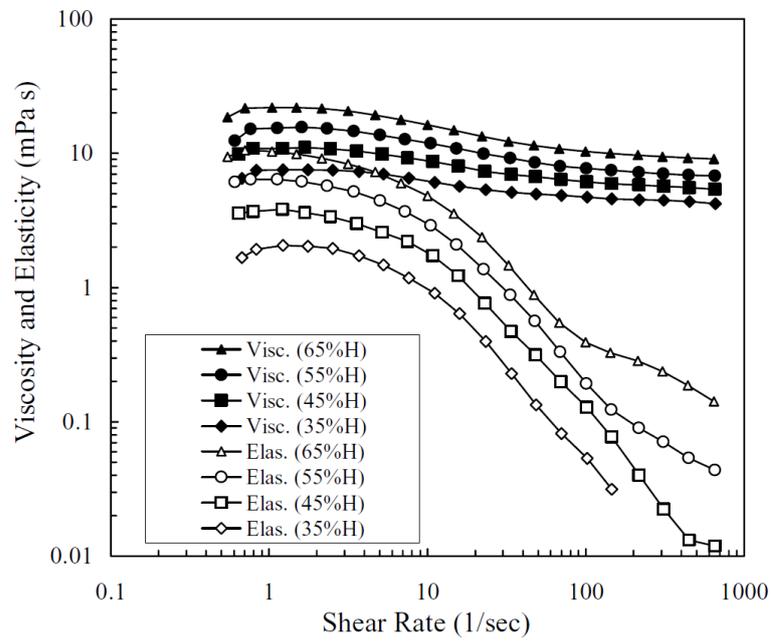
#### 2.6.5.1. Hématocrite

L'hématocrite a une influence majeure sur les propriétés mécaniques du sang [Thurston, 1972] (voir figure 2.19).

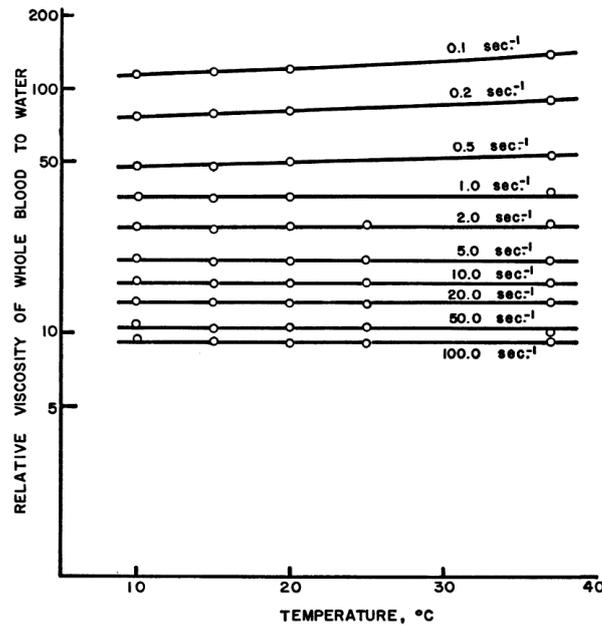
La dépendance pour des déformations unitaires à 2  $Hz$  des parties réelle et imaginaire de la viscosité complexe avec l'hématocrite a été évaluée empiriquement à [Thurston et Henderson, 2007] :

$$\begin{aligned}\eta' &= 1,9736 \exp(3,2361H) \\ \eta'' &= 0,15344 \exp(5,240H)\end{aligned}$$

## 2. Le sang



**Figure 2.19.:** Parties réelles  $\eta'$  et imaginaires  $\eta''$  de la viscosité complexe en fonction du cisaillement effectif appliqué en oscillation à  $2\text{ Hz}$  à du sang constitué de globules rouges resuspendus dans du plasma autologue à différents hématocrites, et à  $22^\circ\text{C}$ , obtenues par une méthode de tubes oscillants (d'après [Thurston et Henderson, 2007]).



**Figure 2.20.:** Viscosité relative apparente (par rapport à la viscosité de l'eau) de sang total humain en fonction de la température (d'après [Merrill *et al.*, 1963b]).

La composante élastique  $\eta''$  de la viscosité complexe n'est pas mesurable à hématoците inférieur à 0,2. Cela indiquerait qu'en régime dilué à faible déformation, la microstructure sanguine ne stocke pas d'énergie. À hématoците inférieur à 0,1, la composante visqueuse  $\eta'$  de la viscosité complexe ne varie quasiment pas en fonction de l'hématoците.

### 2.6.5.2. Température

Pour des taux de cisaillement importants (supérieurs à  $100 \text{ s}^{-1}$ ), la viscosité relative apparente du sang est indépendante de la température entre  $23^\circ\text{C}$  et  $37^\circ\text{C}$  [Barbee, 1973]. Pour des taux de cisaillement supérieurs à  $1 \text{ s}^{-1}$  fixés, la viscosité relative apparente (par rapport à l'eau) est constante sur la plage de température  $10 - 37^\circ\text{C}$ .

En revanche, pour des taux de cisaillement inférieurs à  $1 \text{ s}^{-1}$ , la viscosité relative apparente augmente avec la température de façon quasi linéaire. La pente de cette droite est d'autant plus importante que le taux de cisaillement est bas [Merrill *et al.*, 1963b] (voir figure 2.20).

En oscillation, le comportement viscoélastique du sang est influencé par la température [Thurston et Henderson, 2007]. La forme des courbes des modules de viscoélasticité en fonction de la fréquence reste la même si l'on fait varier la température, mais les valeurs sont décalées. Les modules diminuent lorsque la température augmente.

Pour une déformation unitaire à  $2 \text{ Hz}$ , Thurston a établi que la relation liant les

## 2. Le sang

parties réelles et imaginaires de la viscosité complexe à une température  $T$  et à une température  $T_0$  était [Baskurt *et al.*, 2007] :

$$\begin{aligned}\eta'(T_0) &= \eta'(T)10^{-0,01264(T_0-T)} \\ \eta''(T_0) &= \eta''(T)10^{-0,01022(T_0-T)}\end{aligned}$$

## 2.7. Écoulements sanguins

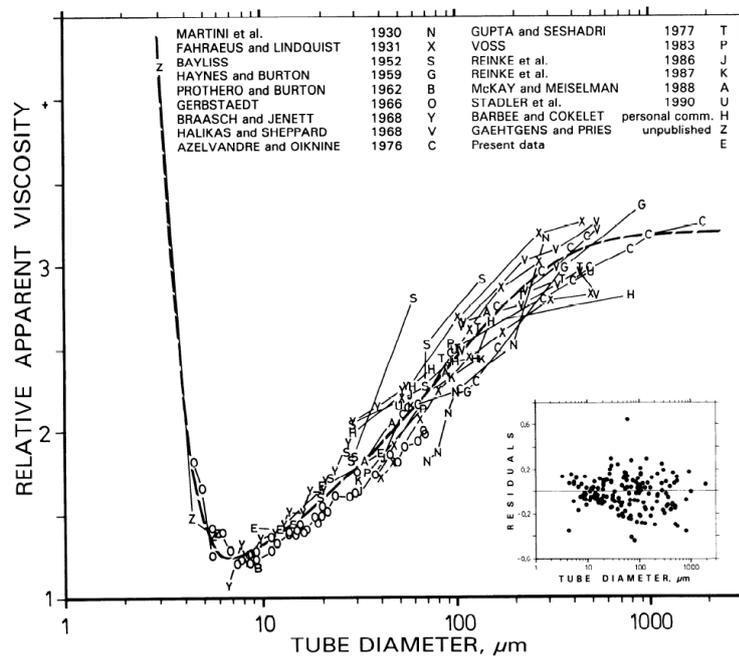
Dans la circulation, le type d'écoulement va être non seulement déterminé par les propriétés rhéologiques du sang, mais également par les caractéristiques mécaniques et géométriques des vaisseaux, et les caractéristiques mécaniques et temporelles du cœur.

Dans les vaisseaux capillaires, dont la taille caractéristique peut aller jusqu'à  $2,8 \mu m$ , le sang ne peut pas être considéré comme un milieu continu. En effet, le diamètre des globules rouges est supérieur à celui des canaux dans lesquels il transite. Le globule rouge se déforme alors pour adopter une forme de parachute [Secomb *et al.*, 2007]

Dans les petites veines et petites artères, pour des diamètres de quelques dizaines  $\mu m$  à environ une centaine de  $\mu m$ , une couche pariétale déplétée en globules rouges existe (voir section 2.6.1.1). Cette couche plasmatique joue un rôle de lubrifiant et la viscosité apparente se trouve diminuée. C'est l'effet Fahraeus-Lindqvist [Fahraeus et Lindqvist, 1931] (voir figure 2.21). Pour des vaisseaux dont le diamètre est d'environ  $100 \mu m$ , plusieurs études reportent la mesure d'un profil d'écoulement de type bouchon, avec une zone pariétale fortement cisailée, et une zone centrale quasiment au repos [Bishop *et al.*, 2001] [Roman *et al.*, 2012]. Il est donc probable que dans la zone centrale les globules rouges soient agrégés en rouleaux. Les propriétés mécaniques du sang dans l'état agrégé sont donc primordiales pour l'étude d'écoulements physiologiques dans les vaisseaux de cette dimension.

Dans les gros vaisseaux, l'épaisseur de la couche déplétée en cellules est petite devant la taille caractéristique de l'écoulement. La viscoélasticité des parois des vaisseaux joue un rôle important dans l'écoulement, car le caractère pulsatile de l'écoulement entraîne de fortes déformations pariétales [Simon *et al.*, 1991].

## 2.7. Écoulements sanguins



**Figure 2.21.:** Viscosité relative apparente (par rapport à la viscosité de l'eau) de suspensions de globules rouges à hémocrite 0,45 dans des tubes de verre de diamètre entre 3,3 et 178  $\mu\text{m}$  (d'après [Pries *et al.*, 1992]).



**Troisième partie .**

**Rhéométrie optimale par transformée  
de Fourier**



# Table des matières

---

<b>3. Optimal Fourier Rheometry</b>	<b>83</b>
3.1. Introduction . . . . .	83
3.2. Dispositif expérimental . . . . .	85
3.2.1. Montage expérimental . . . . .	85
3.2.2. limites expérimentales . . . . .	86
3.2.3. Sensibilité à l'environnement vibratoire . . . . .	88
3.3. Optimal Fourier Rheometry : méthode et validation . . . . .	92
3.4. Validation . . . . .	101
3.4.1. Huile silicone newtonienne : Correction d'inertie du fluide . . .	101
3.4.2. CpCl NaSal . . . . .	102

---

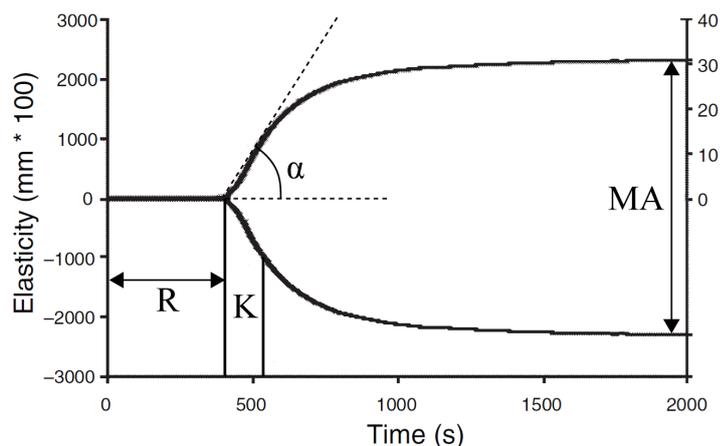


# 3. Optimal Fourier Rheometry

## 3.1. Introduction

Pour déterminer les propriétés mécaniques du caillot sanguin en formation, il convient tout d'abord de sélectionner une méthode de mesure adaptée. La rhéométrie est un outil adéquat, car c'est une méthode qui mesure de façon absolue les propriétés mécaniques du matériau étudié. Mais il est nécessaire de prendre en compte les contraintes imposées par le matériau testé : le caillot sanguin en formation.

La technique la plus courante utilisée pour suivre les propriétés mécaniques du caillot sanguin en formation à des fins de diagnostic est la thromboélastographie, qui existe depuis les années 40 [Hartet, 1948]. Elle repose sur le même principe que la rhéométrie. Le sang est placé dans une cuvette oscillante à une fréquence donnée, généralement  $0,1 \text{ Hz}$  à grande amplitude de déformation. Dans le sang baigne un plongeur relié à un dispositif de mesure de la déviation de ce dernier. Lorsque le caillot commence à se former, le mouvement de la cuvette est transmis au plongeur, et la déviation angulaire de celui-ci varie en fonction du couple qui lui est transmis par l'échantillon. La mesure obtenue est la largeur balayée par un faisceau optique dévié par un miroir fixé au plongeur sur un capteur photométrique, en  $mm$ . Ce n'est pas une mesure mécanique au sens strict, puisque ni module élastique ni module visqueux ne sont déterminés. Une courbe typique de thromboélastographie est représentée sur la figure 3.1.



**Figure 3.1.:** Courbe typique obtenue par thromboélastographie, avec les différents paramètres mesurables représentés. Adapté depuis [Rivard *et al.*, 2005]

### 3. Optimal Fourier Rheometry

Les grandeurs extraites d'une mesure de thromboélastographie sont les suivantes :

- Le temps de coagulation (noté  $R$  sur la figure 3.1), qui est le temps écoulé entre le mélange des réactifs et les premiers signes de la formation du caillot,
- Le paramètre de cinétique de formation du caillot (noté  $K$  sur la figure 3.1), qui est le temps écoulé entre  $R$  et le moment où la mesure atteint  $20\text{ mm}$ ,
- L'angle  $\alpha$  (voir figure 3.1), qui se mesure en prenant la tangente à la courbe obtenue passant par le point en  $R$ ,
- L'amplitude maximale (noté  $MA$  sur la figure 3.1), qui reflète l'élasticité maximale du caillot.

Au début de la mesure, le thromboélastogramme est plat car l'instrument n'est pas assez sensible pour mesurer les propriétés viscoélastiques du sang total.

Il existe plusieurs fabricants d'appareils de thromboélastographie. Ce n'est pas une méthode donnant une mesure absolue, puisque seuls les tests effectués avec le même type d'appareil (et de réactifs) sont comparables entre eux. Néanmoins cette technique montre bien que la coagulation est un processus évoluant rapidement dans le temps. Le temps caractéristique d'évolution des propriétés viscoélastiques du caillot peut être estimé proche de  $K$ , qui est de l'ordre de la minute [Lang *et al.*, 2005].

Par conséquent, pour que la mesure soit résolue en temps en accord avec le critère du nombre de mutation (voir section 1.2.3), il est nécessaire que la méthode de mesure utilisée ait un temps d'acquisition d'environ  $10\text{ s}$ . Avec un temps d'acquisition limite d'au plus  $10\text{ s}$ , la plus basse fréquence qu'il est possible d'explorer théoriquement est  $0,1\text{ Hz}$ . Les rhéomètres récents sont généralement limités à des fréquences de l'ordre de quelques dizaines de Hertz, d'autant que certains problèmes expérimentaux (inertie de l'appareillage, inertie du fluide) peuvent réduire cette limite. Nous verrons dans la section 3.2.2 que la fréquence la plus haute qu'il est envisageable d'explorer est d'environ  $10\text{ Hz}$ .

Comme expliqué dans la section 1.2.3, la méthode de balayage discret en fréquence ne permet pas d'atteindre une fréquence basse de  $0,1\text{ Hz}$ . Elle permet théoriquement d'effectuer un seul point de mesure à  $0,3\text{ Hz}$  en  $10\text{ s}$ . Pour réaliser une mesure entre  $0,1$  et  $10\text{ Hz}$ , environ  $500\text{ s}$  sont nécessaires. La méthode de balayage discret en fréquence n'est donc pas adaptée pour effectuer une mesure résolue en temps sur une plage de fréquence suffisamment étendue pour le suivi des propriétés mécaniques du caillot sanguin.

La FTMS autorise elle aussi, sur  $10\text{ s}$ , un point de mesure à basse fréquence à  $0,3\text{ Hz}$  théoriquement, mais en pratique cette valeur est plutôt de l'ordre de  $0,5\text{ Hz}$ . Même s'il est possible d'obtenir des mesures sur une plage de fréquence large, en choisissant des harmoniques de rang élevé, l'échantillonnage en fréquence obtenu n'est pas satisfaisant du fait du faible nombre de sinusoides superposables pour ne pas risquer de sortir du domaine linéaire du matériau (voir section 1.2.3). Il n'est pas possible de réaliser une mesure entre  $0,1$  et  $10\text{ Hz}$  en  $10\text{ s}$  à l'aide de cette méthode. Il est donc impossible de l'appliquer elle aussi au suivi des propriétés viscoélastiques

du caillot sanguin.

Les techniques de mesure oscillatoires disponibles ne sont donc pas adaptées pour le suivi des propriétés mécaniques du caillot sanguin pendant sa formation. Il est donc nécessaire de développer une technique de mesure rhéométrique qui remplisse les critères suivants :

- Le temps d’acquisition d’un point expérimental doit être faible devant le temps caractéristique d’évolution du matériau tout au long de la mesure pour pouvoir garantir la validité de celle-ci,
- La bande de fréquence explorée doit être la plus large possible pour permettre d’accéder à la gamme d’échelles au sein du matériau la plus étendue possible,
- Il ne doit pas exister de superposition fréquentielle pour ne pas risquer de sortir du domaine linéaire du matériau.

Dans cette partie, nous allons exposer la méthode que nous avons développée, basée sur un balayage exponentiel en fréquence. Celle-ci sera ensuite validée sur des matériaux de référence : Newtonien avec une huile silicone, et viscoélastique avec une gomme polydiméthylsiloxane dans un premier temps. Ensuite, elle sera validée sur des matériaux présentant des similitudes avec le caillot sanguin :

- L’alginate, qui a en commun avec le caillot sanguin de se solidifier sur une échelle de temps comparable de l’ordre de la minute,
- Le CpCl NaSal, qui est un fluide viscoélastique ayant des modules viscoélastiques assez proches de ceux du sang.

La méthode proposée nécessite de contrôler la déformation au cours du temps. Au moment où ces travaux ont été réalisés, seuls deux rhéomètres permettaient de réaliser ceci : l’Ares et l’Ares-G2 (TA instruments, États-Unis). Nous ne disposions à l’origine que de l’Ares. C’est donc sur cette machine que la méthode a été initialement développée. L’Ares disposait d’une solution logicielle pour appliquer une déformation personnalisée, mais qui ne permettait qu’une acquisition à environ une dizaine de Hertz. Or, puisque nous souhaitions réaliser des mesures à cette fréquence, il n’était pas possible d’utiliser cette solution à cause du théorème de Nyquist. Nous avons donc dû utiliser une commande et une acquisition externe sur le rhéomètre.

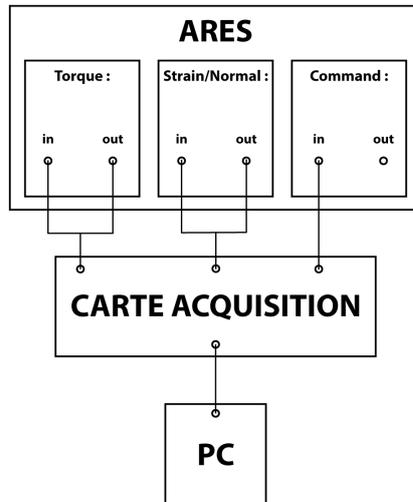
Le laboratoire a par la suite acquis un Ares-G2, en principe plus sensible, qui permet d’appliquer une déformation personnalisée sans passer par une commande et une acquisition externe. Nous avons transposé la méthode à cet appareil.

## 3.2. Dispositif expérimental

### 3.2.1. Montage expérimental

Pour mettre au point la méthode décrite dans ce chapitre, nous avons utilisé un dispositif expérimental comprenant les éléments suivants :

### 3. Optimal Fourier Rheometry



**Figure 3.2.:** Schéma du raccordement entre l'Ares et le PC acquérant les données de mesure.

- Un ordinateur équipé de la plate-forme de conception LabVIEW (National Instruments, États-Unis), avec laquelle un programme SINESWEEP a spécifiquement été développé,
  - Une carte DAQ NI USB-6212 (National Instruments, États-Unis),
  - Un rhéomètre Ares (TA instruments, États-Unis),
- Les branchements sont effectués comme exposé sur la figure 3.2.

Ensuite, lorsqu'il a été possible de transposer cette méthode à l'Ares-G2, nous avons pu nous passer de LABVIEW et de la carte DAQ.

## 3.2.2. limites expérimentales

### 3.2.2.1. Sensibilité

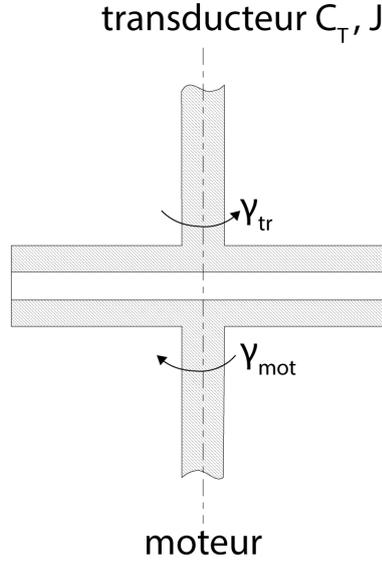
Le capteur de couple du rhéomètre a une limite de sensibilité. En pratique, pour l'Ares équipé du capteur modèle 2KFRTN1 (bi-modal), celle-ci est de  $2 \cdot 10^{-6} Nm$  dans la gamme de mesure basse.

À l'aide de la constante de couple de la géométrie utilisée pour la mesure, il est possible d'en déduire une limite de contrainte minimale sur les mesures.

### 3.2.2.2. Inertie d'appareillage

Les résultats de tests d'oscillation menés avec un rhéomètre rotationnel peuvent être biaisés par l'inertie du dispositif expérimental. Cette dernière est liée à l'accélération périodique de la partie mobile.

Le rhéomètre utilisé pour obtenir les résultats de cette partie possède une tête de mesure, reliée à la partie haute de la géométrie, séparée du moteur relié quant à lui



**Figure 3.3.:** Schéma d'un rhéomètre à déformation contrôlée avec moteur et capteur de couple séparés.

à la partie basse de la géométrie (voir figure 3.3).

Supposons que le moteur impose sur la partie basse de la géométrie une déformation  $\gamma_{mot}(t)$ . En raison de sa complaisance  $C_{tr}$  non nulle, le transducteur subit une déformation  $\gamma_{tr}(t)$ . L'échantillon est alors soumis à une déformation  $\gamma_{ech}(t)$  telle que :

$$\gamma_{ech}(t) = \gamma_{mot}(t) - \gamma_{tr}(t)$$

En notant  $k_g$  la constante de couple de la géométrie (telle que  $M_{ech}k_g = \tau_{ech}$ ), le couple complexe  $M_{ech}^*$  généré par l'échantillon est d'après l'équation 1.4 :

$$M_{ech}^* = \frac{G^*}{k_g} \gamma_{ech}^* \quad (3.1)$$

Le couple généré par l'inertie du transducteur  $M_{in}^*$  ( $J$  étant le moment d'inertie du transducteur selon l'axe de rotation de la géométrie) est :

$$M_{in}^* = -J\omega^2 \gamma_{tr}^* \quad (3.2)$$

Soit  $M_{tr}^*(t)$  le couple complexe sur le transducteur. Ce couple est la somme du couple imposé par l'échantillon, et du couple inertiel de la partie haute de la géométrie :

$$M_{tr}^* = M_{ech}^* + M_{in}^* \quad (3.3)$$

En combinant les équations 3.1, 3.2 et 3.3, il vient :

### 3. Optimal Fourier Rheometry

$$M_{tr}^* = \frac{G^*}{k_g} \gamma_{ech}^* - J\omega^2 \gamma_{tr}^* \quad (3.4)$$

Notons  $G_{app}^*$  le module complexe apparent mesuré par le rhéomètre. Cette grandeur est donnée par la relation suivante :

$$M_{tr}^* = \frac{G_{app}^*}{k_g} \gamma_{ech}^* \quad (3.5)$$

D'après les équations 3.4 et 3.5, nous avons :

$$G_{app}^* = G^* - J\omega^2 \frac{\gamma_{tr}^*}{\gamma_{ech}^*} \quad (3.6)$$

D'après la relation 3.6, les modules mesurés diffèrent des modules réels de l'échantillon. L'écart entre ces valeurs est d'autant plus grand que la fréquence d'oscillation est élevée, puisque la différence est proportionnelle à  $\omega^2$ . Elle dépend de la déformation subie par le transducteur  $\gamma_{tr}^*$ . Cette grandeur est en pratique assez faible. Elle est liée à la complaisance du transducteur par la relation :

$$\gamma_{tr}^* = M_{tr}^* C_{tr}$$

Cette grandeur peut en revanche devenir importante dans le cas où la fréquence d'oscillation se rapproche de la fréquence de rappel de capteur (technologie FRT), créant ainsi une résonance.

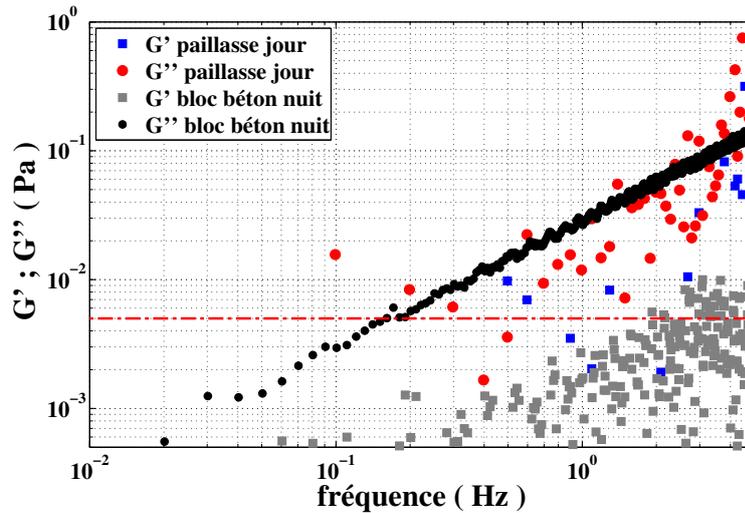
Pour les hautes fréquences d'oscillation, l'inertie est donc responsable d'artéfacts de mesure (pour l'Ares, en pratique, aux alentours de 10 Hz). En particulier, l'inertie peut conduire à sous-évaluer  $G''$  (voir figures 3.11 à 3.16).

#### 3.2.3. Sensibilité à l'environnement vibratoire

Le système constitué du rhéomètre et de son support est sensible aux perturbations engendrées par les vibrations externes. La figure 3.4 illustre ce phénomène. Une mesure a été réalisée sur de l'huile étalon 3 mPa.s avec l'Ares-G2 installé sur une paillasse standard. Ce dernier était équipé d'une géométrie de type cylindres coaxiaux à double entrefer. La technique de mesure employée est l'Optimal Fourier Rheometry (voir section 3.3). Cette mesure a été effectuée au cours de la journée, alors que le laboratoire était en activité. Bien qu'en principe au dessus des spécifications du rhéomètre, cette mesure n'est absolument pas exploitable.

##### 3.2.3.1. Position du problème : comparaison entre rhéométrie et sismographie

En supposant que ce problème est lié à l'environnement vibratoire, la mesure devrait être sensible aux facteurs suivants :



**Figure 3.4.:** Comparaison entre les modules viscoélastiques mesurés par OFR sur une huile étalon de viscosité à  $3 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  avec l'Ares-G2 installé sur une paillasse de laboratoire standard de jour (symboles rouges et bleus), et posé sur le bloc de béton de 2 tonnes la nuit (symboles noirs et gris). La limite de sensibilité théorique de l'expérience est représentée par une ligne rouge pointillée.

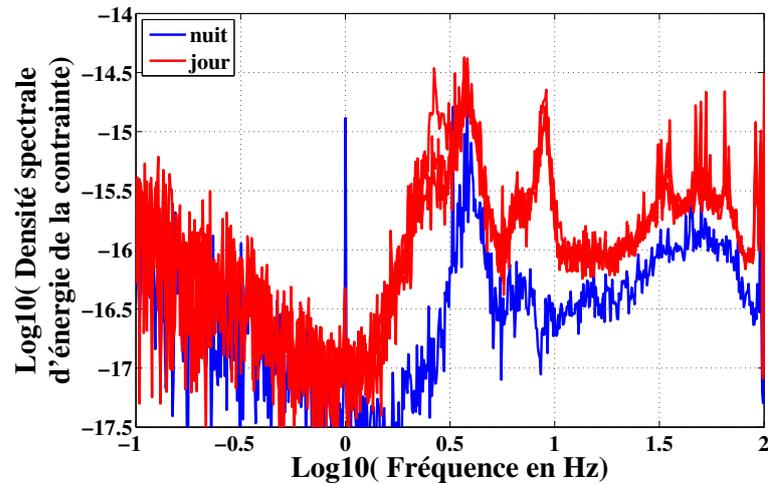
- support du rhéomètre,
- heure de la journée (en rapport avec l'activité qui crée des perturbations).

Pour optimiser les mesures, nous avons donc expérimenté différentes configurations de support, et déterminé le moment optimal pour réaliser celles-ci.

Pour ces mesures, l'Ares-G2 est installé sur une table optique Newport isolée pneumatiquement disponible au laboratoire. La fréquence de résonance du système d'amortissement est entre 2 et 3  $\text{Hz}$ . Nous avons appliqué à l'aide d'une procédure de type « arbitrary waveform » sur l'Ares-G2 une déformation oscillatoire de 1 % à une huile étalon à  $3 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  à  $25^\circ\text{C}$ , dans une géométrie de type cône-plan de  $2^\circ$  et 40  $\text{mm}$  de diamètre. Ce type de procédure permet d'obtenir le couple instantané mesuré par le rhéomètre.

La figure 3.5 représente la densité spectrale de bruit du système mesuré sur la contrainte, obtenue par analyse de Fourier sur la contrainte mesurée. Plusieurs mesures ont été réalisées : trois mesures vers 16 h (courbes rouges), et deux mesures de nuit, à minuit et 2 h (courbes bleues). À basse fréquence, on n'observe pas de différence notable entre les mesures de jour et de nuit. Entre 1 et 10  $\text{Hz}$ , le bruit sur les mesures de nuit est environ deux décades inférieur à celui des mesures de jour, excepté vers 4  $\text{Hz}$ . Il est probable que cette fréquence corresponde à la résonance effective du système composé du rhéomètre et de la table avec amortisseur. Au-delà de 10  $\text{Hz}$ , la différence reste notable. Ces observations sont conformes à ce que l'on peut attendre de la table optique, dont le système d'amortissement n'a pas d'effet en dessous de 1  $\text{Hz}$ , amplifie les perturbations vers 3 – 4  $\text{Hz}$  et amortit au-delà de 5  $\text{Hz}$ .

### 3. Optimal Fourier Rheometry



**Figure 3.5.:** Densité spectrale d'énergie de la contrainte en fonction de la fréquence, de jour (courbes rouges) et de nuit (courbes bleues).

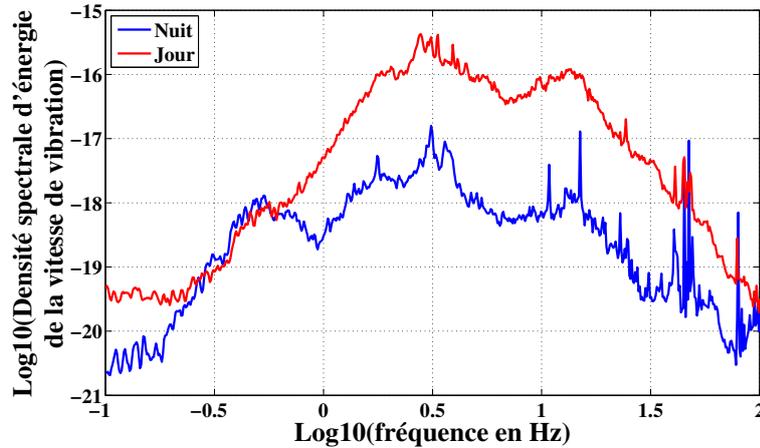
En parallèle, des mesures de vibrations au sol ont été réalisées à l'aide d'un sismomètre SharkCity, prêté gracieusement par Philippe Gueguen du laboratoire InsTerre. La gamme de mesure a été réglée entre 0,1 et 100  $Hz$ . Les trois axes donnent une intensité de vibration similaire, ce qui s'explique probablement par le fait que le bâtiment soit construit sur pilotis.

L'énergie vibratoire entre 1 et 10  $Hz$  est environ 100 fois plus faible la nuit qu'en journée (voir figure 3.6). Il existe un maximum entre 2 et 7  $Hz$ , avec un pic centré en 3  $Hz$ . Cette fréquence peut correspondre au trafic routier, voire plus probablement au trafic du tramway. La corrélation en termes d'horaires semble en effet privilégier cette option, puisque l'amplitude des vibrations diminue significativement après 22 h (période de circulation réduite), et est minimale entre 1 h et 5 h (période sans circulation).

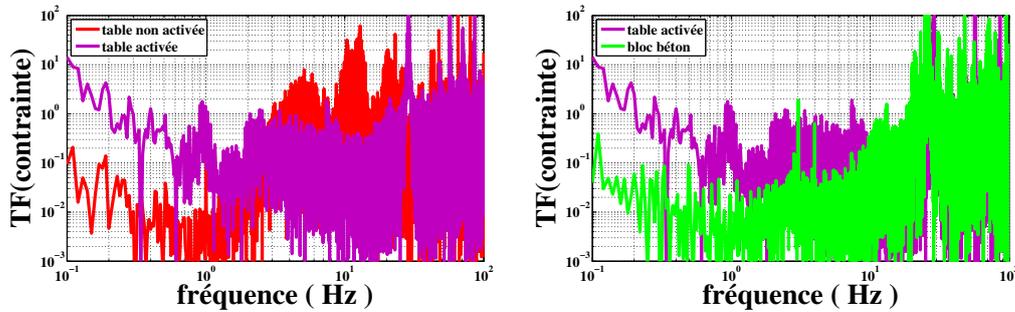
On remarque en comparant les figures 3.5 et 3.6 que le bruit observé sur le rhéomètre est plus étroit fréquentiellement que celui mesuré sur le sismomètre. Cela confirme que la table Newport amplifie les vibrations vers 4  $Hz$ , et les amortit au delà. Par conséquent, elle n'est pas adaptée aux mesures que nous souhaitons réaliser. Néanmoins, par rapport à une paillasse classique, celle-ci améliore nettement la mesure.

#### 3.2.3.2. Support du rhéomètre

Forts de ces résultats préliminaires, nous avons lancé un appel d'offre pour l'acquisition d'une table antivibration permettant d'amortir les vibrations à partir de 0,5  $Hz$  horizontalement et verticalement. Ce marché a été remporté par le distributeur Français de TMC qui nous a proposé une table série 20. Comme précédemment, nous avons placé une huile étalon à 3  $mPa.s$  dans l'entrefer d'une géométrie de type



**Figure 3.6.:** Densité spectrale d'énergie de la vitesse de vibration en fonction de la fréquence acquise à l'aide d'un sismomètre de jour et de nuit.



(a) Comparaison entre table active et pas- (b) Comparaison entre table active et bloc  
sive de béton

**Figure 3.7.:** Transformée de Fourier de la contrainte mesurée sur 10 s sans sollicitation, sur une huile étalon de viscosité à 3 mPa.s avec l'Ares-G2 posé sur une table active à réduction de bruit par système pneumatique piézoélectrique activée, et non activée, ou sur un bloc de béton de 2 tonnes.

cylindres coaxiaux à double entrefer de diamètre 32 mm, et nous avons acquis la contrainte sur une durée de 10 s en n'imposant aucun déplacement à la partie basse de la géométrie. Ainsi, seules les contraintes générées par les perturbations vibratoires sont mesurées.

La transformée de Fourier de ces données est représentée dans la figure 3.7 (a), entre 0, 1 et 100 Hz. Nous avons utilisé trois mesures de contrainte moyennées pour en extraire ces données. Le système de réduction de bruit diminue les perturbations entre 2 Hz et 30 Hz, fréquence pour laquelle le système a visiblement une résonance. En dessous de 2 Hz, le système actif crée des perturbations, puisque la transformée de Fourier de la contrainte mesurée est environ deux ordres de grandeur au dessus lorsque celui-ci est en route. On observe un pic aux alentours de 1 Hz particulièrement gênant. Par conséquent, ce dispositif n'est pas viable puisque les perturbations générées sont dans la gamme de fréquence que nous souhaitons

### 3. Optimal Fourier Rheometry

mesurer. On peut d'ailleurs noter que pour notre système, la table TMC est moins efficace qu'une table passive.

Nous avons finalement utilisé un bloc de béton d'environ un mètre sur un mètre, et de hauteur  $1\text{ m } 50\text{ cm}$  pour un poids d'environ 2 tonnes, reposant sur des planches, comme support du rhéomètre. Le bloc de béton est la meilleure solution, puisque sur toute la gamme de mesure, la transformée de Fourier de la contrainte est inférieure (entre 0, 1 et  $10\text{ Hz}$ ) ou environ égale (entre 10 et  $100\text{ Hz}$ ) à celle de la table activée. Par la suite, les mesures réalisées avec l'Ares-G2 seront effectuées avec le rhéomètre disposé sur le bloc de béton.

Le niveau de sensibilité requis pour réaliser les mesures avec l'Ares ne nécessite pas de dispositions particulières. Par conséquent, celles-ci sont effectuées sur une paillasse de laboratoire classique.

### 3.3. Optimal Fourier Rheometry : méthode et validation

Dans la suite de cette partie, nous présentons notre article paru en 2012 dans *Rheologica Acta* [Ghiringhelli *et al.*, 2012], qui présente la rhéométrie optimale de Fourier.

# Optimal fourier rheometry

## Application to the gelation of an alginate

Etienne Ghiringhelli · Denis Roux · Didier Bleses ·  
Helene Galliard · Francois Caton

Received: 28 September 2011 / Revised: 4 January 2012 / Accepted: 6 January 2012 / Published online: 28 January 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** A new time-optimal rheometry technique is presented. It consists in applying to the material a continuous exponential frequency sweep and analyzing its response by means of Fourier transforms. The properties of this method are that it takes the least possible time to perform the linear viscoelastic measurement in a given frequency range, and also presents an optimal signal to noise ratio in Fourier space. After validation against classical methods, it is used to characterize the gelation of a dental alginate. Properly time-resolved measurements of the frequency dependent viscoelastic moduli are presented. This allows to evaluate rigorously the gel point, using the Winter and Chambon criterion. Analysis of the data shows that a fractal networks forms inside the material after a lag time of about 350s, with a subsequent fast evolution (less than two minutes) towards the final structure.

**Keywords** Time-resolved rheometry · Exponential frequency sweep · Fourier transform mechanical spectroscopy · Polydimethylsiloxane · Alginate · Fractal dimension

### Introduction

Determining the viscoelastic properties of evolving materials presents a major challenge. Indeed, measuring

the storage and loss moduli over a given frequency range takes a time that must be small compared to the typical evolution time of the material. Therefore, as advocated by Winter's group (Mours and Winter 1994; Holly et al 1988), a time resolved rheometry technique is needed to make measurements on evolving samples without setting-up a detailed model. In this article we present a rheometry technique which takes the least possible time to perform the moduli measurements by using Fourier transform techniques. Therefore, we coined this technique as "Optimal Fourier Rheometry".

In the first part, we present a general overview of standard oscillation techniques. Then, we present the Optimal Fourier Rheometry technique (OFR) and its validation using a time independent material. Finally, we use the OFR to characterize the gelation of a dental alginate. In all the following, the experiments were performed in the linear regime.

### Standard oscillation techniques overview

#### Discrete frequency sweep technique

The discrete frequency sweep (DFS) (e.g. Macosko 1994) is the most widely used technique. It consists in applying successive sinusoidal strains  $\gamma$  to the material containing several periods of the chosen frequencies and simultaneously measuring the resulting shear stress  $\tau$ . For a material in its linear regime this is expressed as:

$$\{\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad \tau = \tau_0 \sin(\omega t + \delta)\} \quad (1)$$

E. Ghiringhelli · D. Roux · D. Bleses ·  
H. Galliard · F. Caton (✉)  
Laboratoire de rheologie UMR CNRS 5520,  
Domaine Universitaire, 1301 rue de la piscine,  
BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France  
e-mail: catonf@ujf-grenoble.fr

From these measurements, the loss and storage moduli are determined as follows (Winter and Mours 1997):

$$\left\{ \begin{aligned} G' &= \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) & G'' &= \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta) \end{aligned} \right. \quad (2)$$

The main drawback of this technique is that exploring more frequencies extends the experimental time by at least the periods of the added frequencies. So this method requires a compromise between experimental time and frequency resolution.

### Multiwave technique

The multiwave technique (MW), consists in applying a strain waveform which is composed of a fundamental frequency and several of its harmonics superimposed (Holly et al 1988; Macosko 1994)(see also Fig. 1).

For a material in its linear regime, the strain and stress are described by:

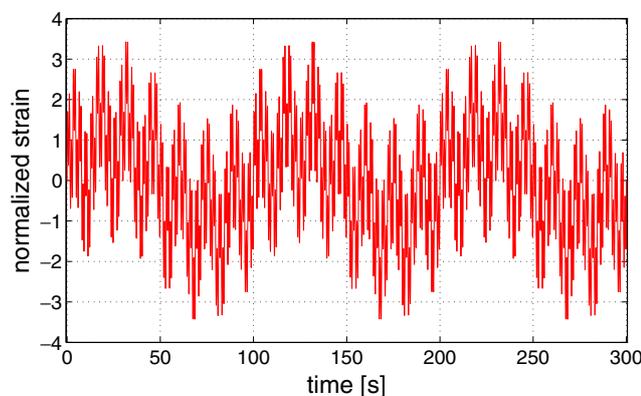
$$\left\{ \begin{aligned} \gamma &= \sum_i \gamma_i \sin(m_i \omega_i t) & \tau &= \sum_i \tau_i \sin(m_i \omega t + \delta(m_i \omega)) \end{aligned} \right. \quad (3)$$

where  $(i, m_i) \in \mathbb{N} * \mathbb{N}$

From measurements, the loss and storage moduli for each frequency are deduced (Holly et al 1988):

$$\left\{ \begin{aligned} G'(\omega_i) &= \frac{\tau_i}{\gamma_i} \cos(\delta(m_i \omega)) & G''(\omega_i) &= \frac{\tau_i}{\gamma_i} \sin(\delta(m_i \omega)) \end{aligned} \right. \quad (4)$$

In practice, the measuring time corresponds to about 5 times the period of the lowest frequency (Macosko 1994), even if, in principle, it could be equal. An important drawback of this method is that investigating more frequencies implies that the amplitude of the complete signal increases by the number of harmonics times the order of magnitude of the fundamental



**Fig. 1** Multiwave waveform, using 3 periods of the fundamental frequency  $f_0 = 0.01 \text{ Hz}$ , and its 7<sup>th</sup>, 32<sup>nd</sup> and 96<sup>th</sup> harmonics

(Eq. 3). Therefore the material may be easily tested outside its linear domain when too many waveforms are added. Furthermore, rheometers have a critical sensitivity below which the device is not able to deliver reliable data for each waveform. Consequently, the frequency resolution of this method is limited by the linear domain of the material and the sensitivity of the measuring device.

Both methods are commonly used to measure static properties or to follow slow kinetics. To explore the mechanical properties of a rapidly evolving material, it is necessary to use a method that takes less time to make a measurement than the mutation time of the material (Mours and Winter 1994) (this parameter will be introduced in Section “Mutation number”). For this purpose, it is desirable to reduce the experimental time as much as possible without sacrificing frequency informations, or even improving them.

### The optimal fourier rheometry technique

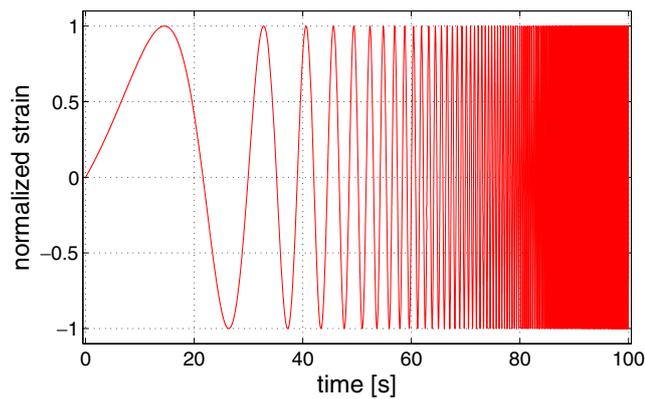
While there has been a few attempts to use wide bandwidth signals to overcome the limitations presented above (see e.g. Macosko (1994)), those attempts did not provide enough advantages to replace existing, already widely implemented techniques. Here we will translate into the field of rheology a technique that has been invented one decade ago in a different scientific field: Hall Acoustics. Indeed, prior to the articles by Farina and coworkers (Fausti and Farina 2000), measuring the acoustic response of an Opera Hall was a long and tedious affair. Therefore, Farina developed a new method with the following constraints. First, the measurement must be as short as possible, present a good signal to noise ratio and also stay into the linear domain. Since we will transpose Farina’s work to rheometry, we refer the interested readers to the original article for details about the derivation of the signal (e.g. Fausti and Farina (2000)). Here, we will restrain our presentation to the main useful characteristics of the input signal and how it should be applied to rheometry.

#### Input signal

The deformation waveform applied to the material is a continuous exponential frequency sweep as illustrated on Fig. 2). It is mathematically represented by:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin \left( K \left( e^{\frac{t}{L}} - 1 \right) \right)$$

with:  $K = \frac{T\omega_1}{\ln(\frac{\omega_2}{\omega_1})}$  and  $L = \frac{T}{\ln(\frac{\omega_2}{\omega_1})}$ , (5)



**Fig. 2** Normalized exponential frequency sweep strain, for  $f_1 = 0.01\text{Hz}$ ,  $f_2 = 10\text{Hz}$  and  $T = 100\text{s}$

$T$  is the duration of the sweep, and  $\omega_1$  and  $\omega_2$  are respectively the lowest and highest pulsation of the sweep. The sweep duration can be set to the period of the lowest frequency of the sweep. With this choice, the method is time-optimal in the sense that the sweep duration is *equal* to the inverse of the lowest frequency (i.e. to the frequency resolution). Also, since the signal energy is constant per frequency band, it presents an optimal signal to noise ratio in the Fourier space as shown by Fausti and Farina (2000). We will now show how this signal can be used to measure the viscoelastic moduli of a material.

### Moduli determination principle

The definition of a linear viscoelastic material is Ferry (1980):

$$\tau(t) = \int_{-\infty}^t G(t-t')\dot{\gamma}(t')dt' = (G * \dot{\gamma})(t) \tag{6}$$

Where  $'*$ ' is the half space convolution. Noting  $\tilde{X}$  the Fourier Transform  $X$  and using the convolution theorem, this becomes:

$$\tilde{\tau}(\omega) = i\omega\tilde{G}(\omega)\tilde{\gamma}(\omega) \tag{7}$$

Since Phan-Tien (2002):

$$\begin{aligned} \tilde{G}(\omega) &= \int_0^\infty G(t)\cos(\omega t)dt - i \int_0^\infty G(t)\sin(\omega t)dt \\ &= \frac{G''(\omega)}{\omega} - i\frac{G'(\omega)}{\omega} \end{aligned} \tag{8}$$

Therefore:

$$\tilde{\tau}(\omega) = G^*(\omega)\tilde{\gamma}(\omega), \tag{9}$$

where  $G^*$  is the complex modulus. Finally, the moduli are calculated using:

$$\left\{ \begin{aligned} G'(\omega) &= \text{Real} \left( \frac{\tilde{\tau}(\omega)}{\tilde{\gamma}(\omega)} \right) \\ G''(\omega) &= \text{Imag} \left( \frac{\tilde{\tau}(\omega)}{\tilde{\gamma}(\omega)} \right) \end{aligned} \right. \tag{10}$$

The elastic modulus is simply the real part of the ratio of the Fourier Transform of the stress by the Fourier Transform of the deformation. The loss modulus is the imaginary part of the same ratio. We will show a detailed practical implementation in part “simulation”.

## Materials and methods

### Materials

Polydimethylsiloxane (PDMS) is a silicon-based organic polymer (ref. 4860911, Rhodorsil Silicones, Rhones-Poulenc, FRANCE). PDMS is used as a test viscoelastic material since it is non-evolving and has excellent long term stability properties.

Alginate is an unbranched copolysaccharide that comes from seaweeds and certain bacteria. It is mainly used as a gelling agent in food, or pharmaceuticals. The sodium alginate used in this study is utilized in dentistry to take mushbites (Violet Light, JLB SARL, FRANCE). It gels thanks to the presence of  $Na^+$  cations, while its gelation time can be finely controlled through addition of phosphate. The manufacturer gives the gelation time to be about 7min for a 3g of alginate powder at 20°C and 10ml of water at 23°C mix, kept at the temperature of 37°C during reaction.

The use of this alginates as an evolving test system presents two major advantages. The first one is that the system is easily adjustable, because it is possible to balance the proportions of powder and water to change the characteristic time of gelation. The second advantage is that alginates present an important enough viscosity at the beginning of the reaction to overcome the sensitivity limitation of the rheometer used in this study.

### Experimental setup and methods

Measurements were performed on a strain controlled rheometer (ARES, TA instruments, USA), with a 25mm titanium plate-plate geometry. A data module (NI USB-6212, National Instruments, USA) controlled by a Labview software sends the command stress and acquires the torque. The adjustable parameters are: the amplitude of the signal, the upper and lower frequencies of the sweep, the number of points and the sampling rate.

Measurements on PDMS at 25°C were carried out at 0.67% strain between 0.01 and 10 Hz, in a 25 mm plate-plate geometry with 1.66 mm gap, and with a sweep length of 100 s.

Since we want to follow the evolution of the material, the exponential waveforms is applied periodically to obtain the mechanical properties at well defined time intervals during the gelation process. The software repeats the signal every 11 s, which allows to get a  $G'$  and a  $G''$  spectrum each 11 s. Each measurement used the frequency band between 0.1 and 10 Hz, a 25 mm plate-plate titanium geometry with 0.5 mm gap, 2.25% strain rate, with a sweep length of 10 s. The number of points in the frequency domain is proportional to the product of the sampling rate  $f_e$  and the temporal length of the sweep  $T$ .

The alginate sample is prepared from 3 g of alginate powder and 12 ml of distilled water which were previously placed in a constant-temperature bath at 20°C. These two elements are mixed during 1 min with a mortar and pestle kept for 30 min at the test temperature, then the paste-like material obtained is placed into the geometry of the rheometer which is also at the appropriated temperature. The time taken to prepare the sample and install it is of about 2 min. The edge of the sample is protected from the atmosphere by a thin layer of low viscosity silicon oil.

**Validation of the OFR technique**

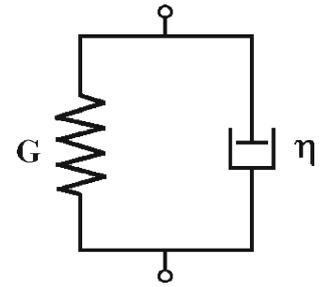
In a first time, we carried out a simulation using a fluid model to check the validity of the method. This will also clarify the procedure necessary to make the measurement. Then, we ran a measurement on a well known non evolving material (PDMS) in order to show that the method is accurate compared to the standard methods.

**Principle validation: simulation**

The Kelvin-Voigt analogical model is an ideal viscoelastic solid represented by the association in parallel of an elastic body (spring) of modulus  $G$  and a viscous body (dashpot) of viscosity coefficient  $\eta$  (Cf. Fig. 3) (Phan-Tien 2002) (Ferry 1980). Here,  $G$  is taken arbitrarily equal to 10 Pa and  $\eta$  to 0.5 Pa.s. The constitutive equation and moduli of the Kelvin-Voigt solid are:

$$\tau = \eta \frac{\partial \gamma}{\partial t} + G\gamma \quad ; \quad G'(\omega) = G, \quad G''(\omega) = \omega\eta \quad (11)$$

**Fig. 3** Diagram of the Kelvin-Voigt model

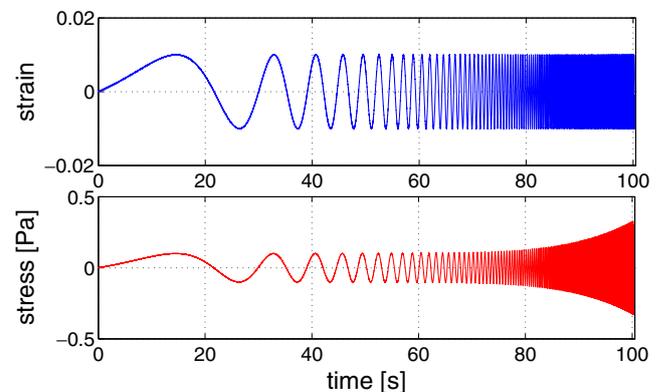


The stress is obtained by injecting the function given in Eq. 5 into the constitutive equation of the Kelvin-Voigt solid (Eq. 11):

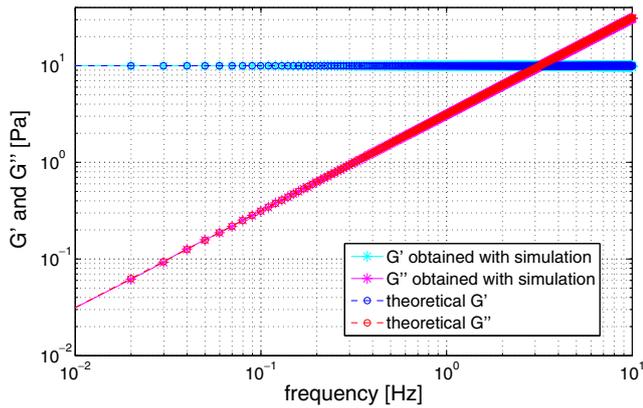
$$\tau(t) = \frac{\eta\gamma_0 K}{L} \cos(K(e^{\frac{t}{T}} - 1)) e^{\frac{t}{T}} + G\gamma_0 \sin(K(e^{\frac{t}{T}} - 1)) \quad (12)$$

$f_1$  is taken equal to 0.01 Hz and  $f_2$  to 10 Hz, and  $T$  to the period of the lowest frequency measured (i.e.  $100\text{s} = \frac{1}{0.01\text{Hz}}$ ). Some numerical noise is added to the strain and stress signals, to take into account the one observed during preliminary tests on the experimental setup (5% of the amplitude of each signal). Then, the continuous stress and strain waveforms (Eqs. 5 and 12) were discretized at a frequency of 500 Hz, to obtain experimental like data as illustrated in Fig. 4. Finally,  $G'$  and  $G''$  were obtained using Fast Fourier Transforms (FFT) of those signals:

$$\begin{cases} G'(\omega) = \text{Real} \left( \frac{FFT(\tau)(\omega)}{FFT(\gamma)(\omega)} \right) \\ G''(\omega) = \text{Imag} \left( \frac{FFT(\tau)(\omega)}{FFT(\gamma)(\omega)} \right) \end{cases} \quad (13)$$



**Fig. 4** Strain and stress curves corresponding to Eq. 5 and 12



**Fig. 5**  $G'$  and  $G''$  versus frequency curves obtained by means of simulation, compared with theoretical curves

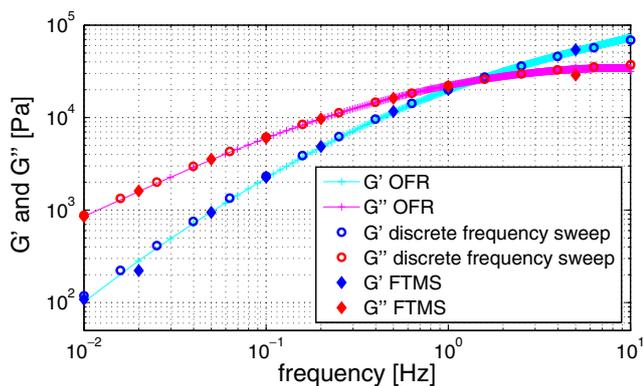
The results are shown in Fig. 5, where the simulated  $G'$  and  $G''$  are plotted together with the original Kelvin Voigt curves (Eq. 11).

The analyzed curves obtained from the simulation are in perfect agreement with the input parameters of the Kelvin-Voigt model, which validates the method principle.

Experimental validation

Comparison with discrete frequency sweep on polydimethylsiloxane

To compare the classical technique of discrete frequency sweep (Cf. Section “Discrete frequency sweep technique”) with the exponential frequency sweep technique, experiments were carried out on PDMS



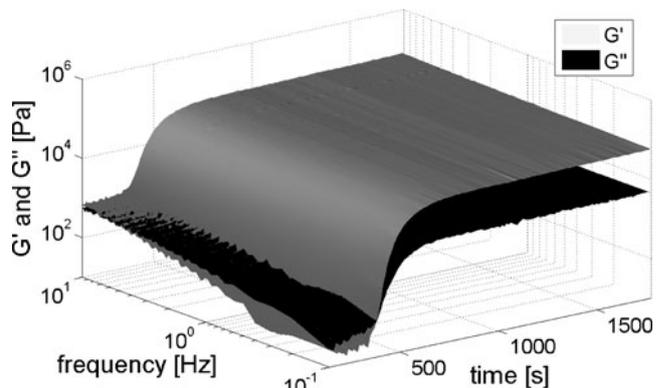
**Fig. 6** PDMS  $G'$  and  $G''$  versus frequency curves obtained with the OFR, discrete frequency sweep and multiwave technique between 0.01 and 10 Hz. The measurement made with the multiwave technique used a fundamental frequency of 0.01 Hz, with its 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, 100<sup>th</sup> and 500<sup>th</sup> harmonics, and the discrete frequency sweep used 5 points per decade

gum. The standard frequency sweep was performed using the ARES default setup with 5 points per decade between 0.01 Hz and 10 Hz. The OFR sweep was done using a low frequency of 0.01 Hz, a high frequency of 10 Hz, with a duration of 10 s. As seen on Fig. 6, both curves are superimposed with a maximum error of 1%.

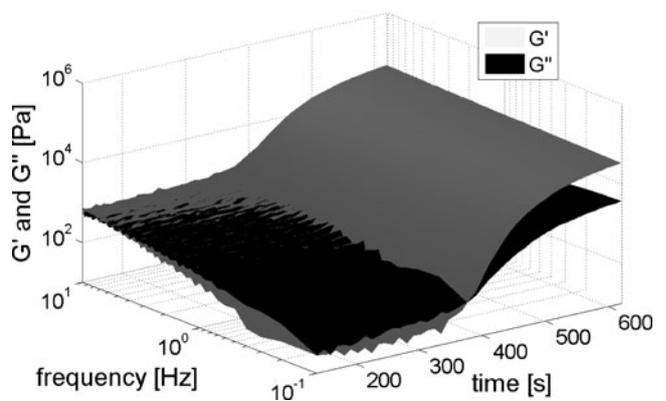
The measurement carried out with the standard discrete frequency sweep method took approximately 1000 s while the measurement with OFR took 100 s. It also offers more experimental points since it is linearly sampled in frequency (at 0.01 Hz). So it appears that OFR is much more adapted than discrete frequency sweep to characterize materials that are evolving in time.

Comparison with multiwave technique on polydimethylsiloxane

We also compared the OFR to the multiwave technique (Cf. Section Multiwave technique) on the PDMS



(a) between 137 and 1800 s



(b) Zoom between 137 and 621 s

**Fig. 7**  $G'$  and  $G''$  versus frequency and time for alginate at 20 °C

sample. The frequencies used for the multiwave technique are 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 5 Hz with the standard FTMS procedure of the ARES. Again, the two curves are well superimposed (Cf. Fig. 6), with a maximum error of 5%. Therefore, the OFR is more accurate than the FTMS technique, with a much better frequency resolution. The ARES rheometer took about 500s for the multiwave oscillation instead of the 100s necessary to the OFR. So even if the MultiWave technique is dedicated to characterize evolving materials, the OFR looks even better adapted to this task.

### Application to alginate gelation

In this section, the OFR method is used to measure the frequency dependent moduli during the gelation of the alginate. The purpose is to show that this method can acquire the spectra sufficiently fast to follow accurately the kinetics of a gelation, and that it provides information difficult to obtain with other methods.

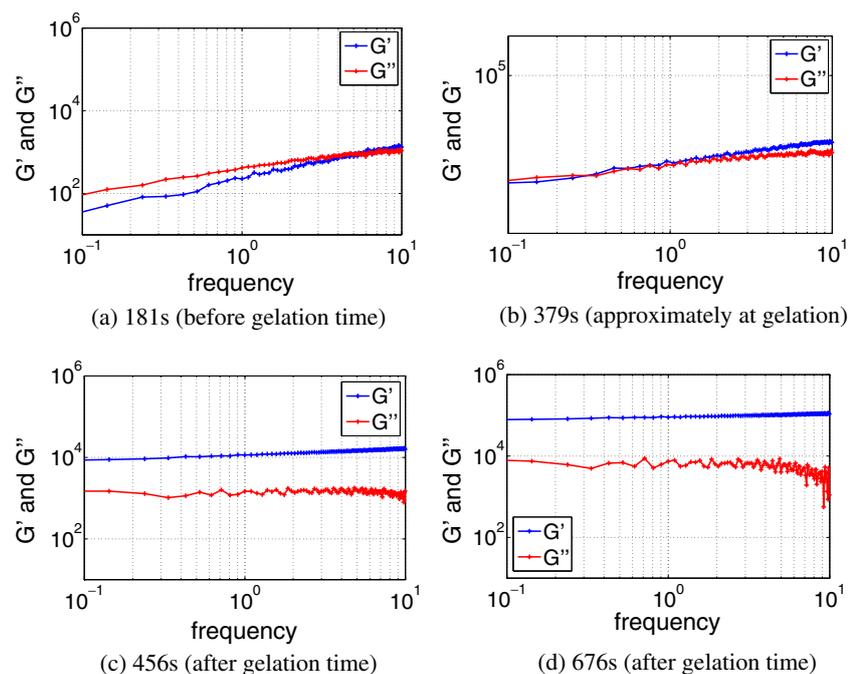
#### Moduli temporal evolution: gelation time

Since the *frequency dependent moduli* are measured at discrete times, three-dimensional data sets are obtained. Fig. 7 shows the temporal evolution of those frequency dependent moduli during the gelation. At the beginning,  $G''$  is below  $G'$  which means that it is

a viscosity dominated regime. Then,  $G'$  goes over  $G''$  and both  $G'$  and  $G''$  increase dramatically (more than 3 orders of magnitude for  $G'$ ) in a sigma-shaped curve. After this phase,  $G'$  and  $G''$  are parallel while slowly increasing, to finally saturate. The  $G'$  and  $G''$  curves do not evolve during the first three minutes because of the delay induced by the addition of phosphate. One can see on Fig. 8 that at 379s i.e. 6min20s,  $G'$  is proportional to  $G''$  over almost two decades of frequency. This corresponds precisely to the rigorous definition of the gelation time as established by Winter and Chambon (1986). While single frequency measurements crossing of  $G'$  and  $G''$  are insufficient to demonstrate a gelation, the OFR method, thanks to the fact that it acquires quasi continuous spectra, allows to determine rigorously the existence of a gelation. Furthermore, since the OFR method is time-optimal, it gives the best possible estimation of the gelation time as accessible to rheometry.

Those spectra are imperfect, mainly because of the limitations of the ARES rheometer. Here, the material is soft at the beginning of the reaction and hard at the end, which means in practice that the beginning of the reaction is very close to the sensitivity limit of the instrument ( $2 \cdot 10^{-6} \text{ Nm}$ ), while after gelation, it is close to the  $|G^*|_{\text{max}}$  limit ( $3.7 \cdot 10^5 \text{ Pa}$  for this setup). This explains the low frequency noise, high frequency oscillations as well as the slight drop of  $G''$  close to 10Hz.

**Fig. 8**  $G'$  and  $G''$  at different instants versus frequency for alginate at 20°C

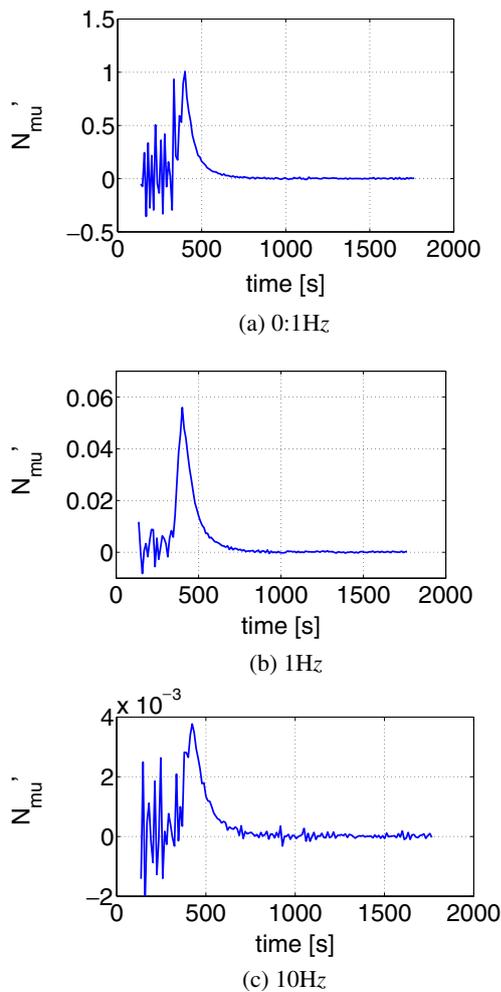


Mutation number

We now must verify that the measurements are meaningful, in other words that the material does not evolve significantly during the exponential frequency sweep. To this end, we use the Mutation number, as defined by Mours and Winter (1994), which simply scale the relative evolution of the moduli to the duration of a measurement (here  $\Delta t = 10s$ ):

$$N'_{mu} = \frac{\Delta t}{\left(\frac{1}{G'} \frac{\partial G'}{\partial t}\right)^{-1}} \quad , \quad N''_{mu} = \frac{\Delta t}{\left(\frac{1}{G''} \frac{\partial G''}{\partial t}\right)^{-1}} \quad (14)$$

If the material is to remain in a quasi-static state during the measurement, the mutation numbers evaluated during the experiment must be smaller than one. In our case,  $N'_{mu}$  is always larger than  $N''_{mu}$  and, as seen on Fig. 9,  $N'_{mu}$  is always below 1. Therefore, the duration of a measurement point is always smaller than the



**Fig. 9** Evolution of the mutation number of the alginate sample at 20°C in time

characteristic evolution time of the measured parameter, and most of the time very much smaller. Therefore, except on one or two points at the lowest frequency, the measurements performed using the OFR with a sampling time of 10s are perfectly valid. Finally, we make use of the continuous spectra to deduce some internal properties of the alginate.

Fractal dimension

On the  $G'$  and  $G''$  versus frequency and time curves (Fig. 8), one can see that  $G'$  and  $G''$  are proportional and follow a power law at and after the gelation point:

$$G'(\omega, t) \propto G''(\omega, t) \propto \omega^{\Delta(t)} \quad (15)$$

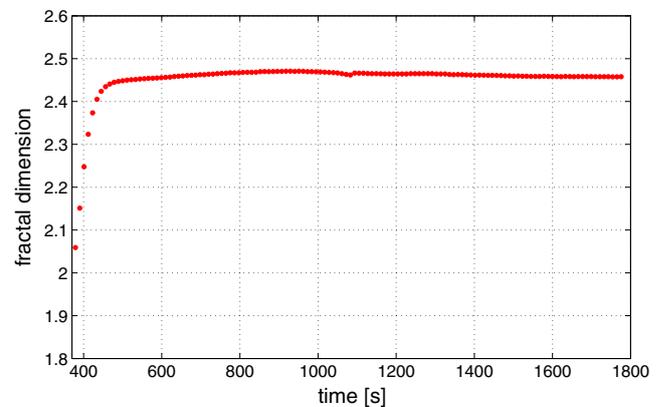
where  $\Delta$  is the exponent of the power law. This suggests that the material presents an internal fractal structure (Muthukumar and Winter 1986). This is consistent with existing experimental results on alginate (Lu et al 2005; Stokke et al 2000; Matsumoto et al 1992), obtained by stopping the ongoing reaction and observing the structure with electron microscopy. To determine the fractal dimension of the alginate structure, we first use the relation proposed in In and Prud'homme (1993):

$$\tan(\delta(t)) = \tan\left(\frac{\Delta(t)\pi}{2}\right) \quad (16)$$

The fractal dimension  $d_f$  of the gel is then computed from Muthukumar's theory Muthukumar (1989) Muthukumar (1985):

$$d_f = \frac{5}{2} \left( \frac{2\Delta(t) - 3}{\Delta(t) - 3} \right) \quad (17)$$

The resulting evolution of the fractal dimension is plotted on Fig. 10. The first measurable fractal dimen-



**Fig. 10** Evolution of the fractal dimension of the alginate sample at 20°C in time between 370s and 1776s

sion is 2.05, very close to the value of 2.0 corresponding to classical percolation theory. After the gelation point, the fractal dimension of the sample increases very rapidly, to reach within less than 1 minute a plateau of about 2.4. At this time the fractal structure is formed and does not evolve significantly anymore. This kind of result would be very difficult to obtain with any other rheometrical technique. For instance, we can try to devise a similar experiment using the MultiWave technique. First, in order to keep the mutation number below one, spectra must be acquired every 11s and not slower. Given the limitation of the MW technique, the lowest attainable frequency would be of 0.5Hz. Furthermore, only up to 7 frequencies could be obtained, with a high frequency limit similar to that of the OFR, i.e. of about 5–10Hz. Drawing a power law with so little data on only one decade of frequency with much increased noise, would be much less convincing, defeating the purpose of trying to obtain frequency spectra of the evolving material.

## Conclusion

Experimental results show that the OFR method is able to determine accurately the viscoelastic moduli of materials in excellent agreement with standard methods. The major advantage of the OFR is that it is time-optimal, i.e. it takes the least possible time to perform the moduli measurement for a given lowest frequency. It also presents an optimal signal to noise ratio in the Fourier space. By comparison with the established MultiWave method, the OFR method is typically five times faster for the same fundamental frequency while giving quasi continuous spectra instead of a few data points. Furthermore, the OFR method does not present the linear domain problem of the MW technique. So, compared to the standard rheometry techniques, this method provides major improvements allowing to follow the mechanical properties of evolving materials as fast as possible.

Its usefulness is exemplified in the study of the kinetics of the alginate gelation. The gelation time was unequivocally determined by the rigorous Winter criterion since  $G'$  and  $G''$  are equal on a large frequency

range. Further, the mutation numbers were shown to be smaller than one, avoiding the need for detailed modelling of the data. Finally, the quasi continuous spectra showed clearly the formation of the internal fractal structure, formation that takes about 60s.

**Acknowledgements** We thank Nadia El Kissi for reviewing the manuscript, Jean-Louis Brugirard for providing the alginate samples, and the Groupe d'Etude sur l'Hemostase et la Thrombose for financial support for E. Ghiringhelli.

## References

- Fausti P, Farina A (2000) Acoustic measurements in opera houses comparison between different techniques and equipment. *J Sound Vib* 232:213–229
- Ferry J (1980) *Viscoelastic properties of polymers*. Wiley
- Holly E, Venkatamaran S, Chambon F, Winter H (1988) Fourier transform mechanical spectroscopy of viscoelastic materials with transient structure. *J of Non-Newton Fluid Mech* 27: 17–26
- In M, Prud'homme R (1993) Fourier transform mechanical spectroscopy of the sol-gel transition in zirconium alkoxide ceramic gels. *Rheol Acta* 32:556–565
- Lu L, Liu X, Dai L, Tong Z (2005) Difference in concentration dependence of relaxation critical exponent  $n$  for alginate solutions at sol-gel transition induced by calcium cations. *Biomacromolecules* 6:2150–2156
- Macosko C (1994) *Rheology principles, measurements and applications*. Wiley
- Matsumoto T, Kawai M, Masuda T (1992) Viscoelastic and saxs investigation of fractal structure near the gel point in alginate aqueous systems. *Macromolecules* 25:5430–5433
- Mours M, Winter H (1994) Time resolved rheometry. *Rheol Acta* 33:385–397
- Muthukumar M (1985) Dynamics of polymeric fractals. *J Chem Phys* 83:3161–3168
- Muthukumar M (1989) Screening effect on viscoelasticity near the gel point. *Macromolecules* 22:1284–1285
- Muthukumar M, Winter H (1986) Fractal dimension of a cross-linking polymer at the gel point. *Macromolecules* 19:4656–4658
- Phan-Tien N (2002) *Understanding viscoelasticity basics of rheology*. Springer
- Stokke B, Draget K, Smidsrod O, Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K (2000) Small-angle x-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 1. ca-alginate gels. *Macromolecules* 33:1853–1863
- Winter H, Chambon F (1986) Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *J Rheol* 30:367–382
- Winter H, Mours M (1997) Rheology of polymers near liquid-solid transitions. *Adv Polym Sci* 134:165–234

## 3.4. Validation

### 3.4.1. Huile silicone newtonienne : Correction d'inertie du fluide

Pour tester la méthode sur un matériau de référence, nous avons utilisé une huile silicone newtonienne de viscosité  $3,3 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  à  $20^\circ\text{C}$ . Pour ces mesures, l'Ares-G2 est équipé d'une géométrie de type cylindres coaxiaux de diamètre  $32 \text{ mm}$ . Le montage est celui décrit dans la section 3.2. Les mesures sont réalisées à  $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

Nous avons comparé les mesures réalisées par OFR et par une méthode de balayage en fréquence classique implémentée par défaut dans le logiciel de contrôle du rhéomètre (voir figure 3.8). Avec les deux méthodes, un module élastique non nul est mesuré. Avec la méthode classique, ce module est du même ordre de grandeur que celui mesuré avec l'OFR entre  $0,1 \text{ Hz}$  et  $1 \text{ Hz}$ , puis devient négatif entre  $1$  et  $10 \text{ Hz}$  (données non représentées), pour se retrouver supérieur au module visqueux au-delà de  $10 \text{ Hz}$ .

Avec l'OFR, on observe une divergence des modules viscoélastiques de l'huile liée aux effets d'inertie du fluide, prédite par Bohme et Stenger [Böhme et Stenger, 1990]. Ils ont déterminé que le module visqueux apparent  $G_{app}^*$  pouvait se calculer analytiquement en fonction des modules viscoélastiques réels du matériau, selon la relation :

$$G_{app}^* = i\omega\eta^* \frac{\left(\frac{i\rho\omega}{\eta^*}s^2\right)^{\frac{1}{2}}}{sh\left(\left(\frac{i\rho\omega}{\eta^*}s^2\right)^{\frac{1}{2}}\right)} \quad (3.7)$$

Il est donc possible d'ajuster les courbes obtenues par l'intermédiaire de l'OFR à l'aide de la relation 3.7 (voir figure 3.8).

Cela suggère qu'il est possible de mettre en place une correction pour l'inertie du fluide. Pour cela, posons  $a = \left(\frac{i\rho\omega}{\eta^*}s^2\right)^{\frac{1}{2}}$ . Nous avons  $\lim_{\omega \rightarrow 0} a = 0$ . Le développement limité de l'expression 3.7 s'écrit alors :

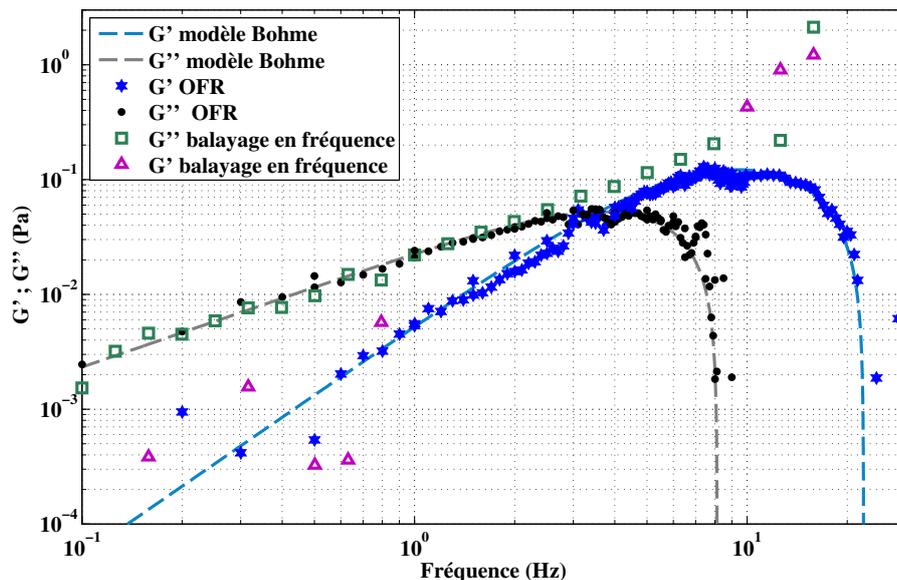
$$\frac{a}{sh(a)} = 1 - \frac{a^2}{6} + \frac{7a^4}{360} + O(a^5)$$

Soit, avec  $G^* = i\omega\eta^*$  :

$$G_{app}^* = G^* \left(1 + \frac{\omega^2 \rho s^2}{6G^*} + \frac{7\omega^4 \rho^2 s^4}{360G^{*2}}\right) \quad (3.8)$$

En résolvant l'équation 3.8 en  $G^*$ , on obtient deux solutions :

### 3. Optimal Fourier Rheometry



**Figure 3.8.:** Modules viscoélastiques en fonction de la fréquence, mesurés sur une huile newtonienne à  $3,3 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  à  $20^\circ\text{C}$  à l'aide du balayage en fréquence classique implémenté sur l'Ares-G2, à l'aide de l'OFR et leurs ajustements utilisant le modèle de Bohme.

$$\begin{aligned}
 G^* &= \frac{1}{60} \left[ 30G_{app}^* - 5\omega^2 \rho s^2 + \left( 15 \left( 60G_{app}^{*2} - 20G_{app}^* \omega^2 \rho s^2 - 3\omega^4 \rho^2 s^4 \right) \right)^{\frac{1}{2}} \right] \\
 G'' &= \frac{1}{60} \left[ 30G_{app}^* - 5\omega^2 \rho s^2 - \left( 15 \left( 60G_{app}^{*2} - 20G_{app}^* \omega^2 \rho s^2 - 3\omega^4 \rho^2 s^4 \right) \right)^{\frac{1}{2}} \right]
 \end{aligned} \tag{3.9}$$

Nous retenons la solution telle que  $Re(G^*) \geq 0$  et  $Im(G^*) \geq 0$ .

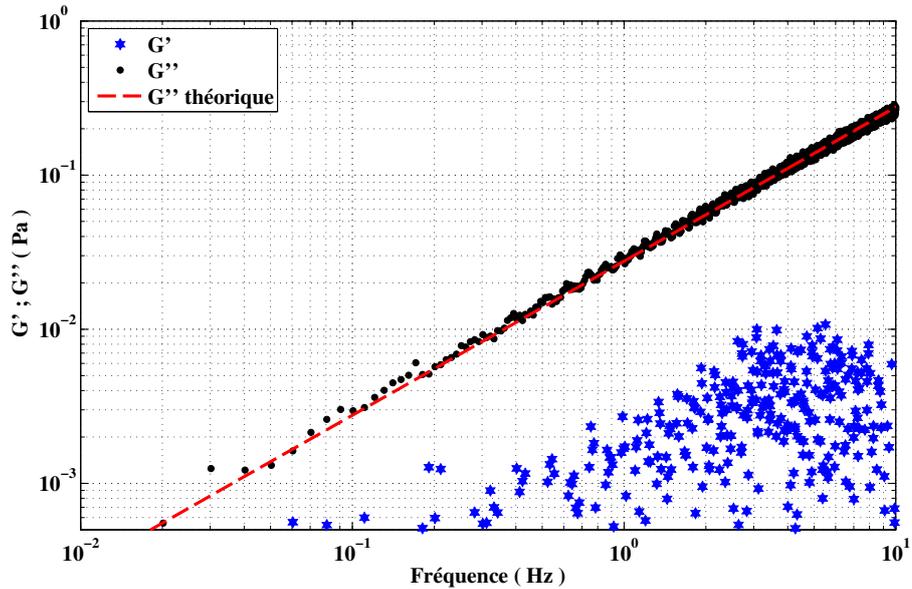
En pratique, nous utilisons une correction d'inertie faisant intervenir la moyenne de la correction au second ordre, et de la correction au troisième ordre, qui donne de meilleurs résultats qu'une correction à des ordres supérieurs et demande moins de calcul.

Ainsi, nous traçons les modules viscoélastiques mesurés par OFR corrigés de l'effet d'inertie du fluide sur une huile étalon de viscosité de  $4,4 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  à  $20^\circ\text{C}$  (voir figure 3.9).

Sur la figure 3.9, on peut voir que le module visqueux  $G''$  mesuré et corrigé suit parfaitement la courbe théorique. Le module élastique  $G'$  mesuré prend l'aspect caractéristique de bruit expérimental.

#### 3.4.2. CpCI NaSal

Afin de tester la fiabilité de la méthode sur un autre échantillon aux modules viscoélastiques de même ordre de grandeur que ceux du sang, nous avons utilisé



**Figure 3.9.:** Modules viscoélastiques en fonction de la fréquence, mesurés par OFR sur une huile newtonienne à  $4,4 \text{ mPa}\cdot\text{s}$  à  $20^\circ\text{C}$ , et le module visqueux théorique correspondant.

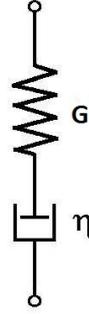
des solutions de surfactants à base de chlorure de cetylpyridinium ( $\text{Cp}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) et de salicylate de sodium ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Sal}^-$ ) dilué dans une solution de  $\text{NaCl}$  à  $0,5 \text{ M}$ . Par la suite, l'abréviation CpCl NaSal sera employée. Ce système est connu pour former des micelles vermiformes. Le comportement viscoélastique du CpCl NaSal est bien décrit par le modèle de Maxwell simple [Berret *et al.*, 1998].

Pour ces mesures, l'Ares est équipé d'une géométrie cône-plan de diamètre  $50 \text{ mm}$  et un angle de  $0,02 \text{ rad}$  en titane. Le montage est celui décrit dans la section 3.2. Les mesures sont réalisées à  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ .

### 3.4.2.1. Modèle de Maxwell

Le modèle de Maxwell correspond à un solide viscoélastique représenté par l'association en série d'une composante élastique (ressort) de module  $G$ , et d'une composante visqueuse (amortisseur) de viscosité  $\eta$  (Cf. figure 3.10).

### 3. Optimal Fourier Rheometry



**Figure 3.10.:** Schéma du modèle de Maxwell.

Considérons  $\gamma_{el}$  et  $\gamma_{visco}$ , ainsi que  $\tau_{el}$  et  $\tau_{visco}$ , qui sont les contributions élastiques et visqueuses de la déformation et de la contrainte. Lorsque ce système est soumis à une déformation sinusoïdale (voir équation 1.3), on a :

$$\begin{aligned}\gamma &= \gamma_{el} + \gamma_{visco} \\ \tau &= \tau_{el} = \tau_{visco}\end{aligned}$$

Et :

$$\dot{\gamma}(t) = \frac{1}{G} \frac{\partial \tau(t)}{\partial t} + \frac{1}{\eta} \tau(t) \quad (3.10)$$

Soit, dans l'espace complexe :

$$\dot{\gamma}^*(t) = \frac{1}{G} \frac{\partial \tau^*(t)}{\partial t} + \frac{1}{\eta} \tau^*(t)$$

C'est à dire :

$$i \omega \gamma^* = \left( i \frac{\omega}{G} + \frac{1}{\eta} \right) \tau^*$$

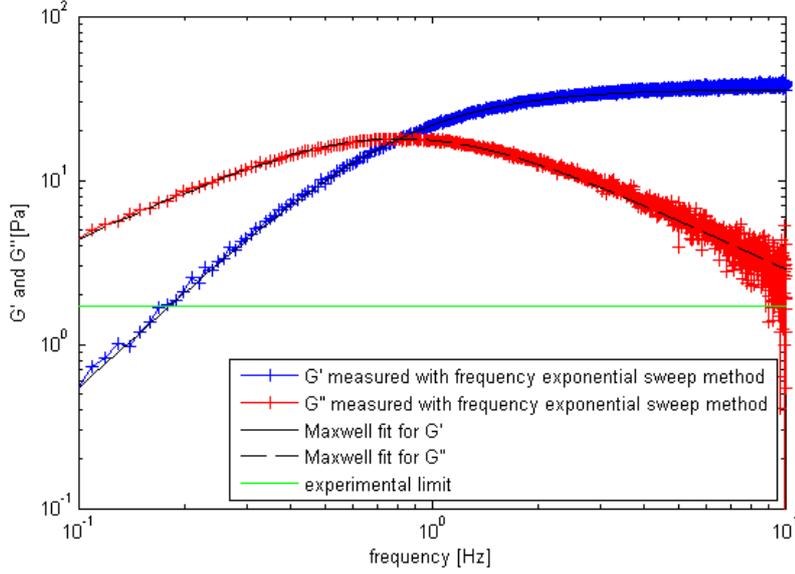
Et d'après 1.4 :

$$G^*(\omega) = \frac{i \omega}{i \frac{\omega}{G} + \frac{1}{\eta}} \quad (3.11)$$

Donc :

$$G^*(\omega) = \frac{\frac{\eta^2}{G} \omega^2}{1 + \frac{\eta^2}{G^2} \omega^2} + i \frac{\eta \omega}{1 + \frac{\eta^2}{G^2} \omega^2} \quad (3.12)$$

Et d'après 1.5, on a alors :



**Figure 3.11.:**  $G'$  et  $G''$  pour l'échantillon de CpCl NaSal à 5 %, avec les approximations théoriques.

$$\begin{cases} G'(\omega) = \frac{\omega^2 \frac{\eta^2}{G}}{1 + \omega^2 \frac{\eta^2}{G}} \\ G''(\omega) = \frac{\omega \eta}{1 + \omega^2 \frac{\eta^2}{G}} \end{cases} \quad (3.13)$$

En introduisant le temps de relaxation de Maxwell,  $\lambda = \frac{\eta}{G}$ , on a :

$$\begin{cases} G'(\omega) = G \frac{\omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2} \\ G''(\omega) = G \frac{\omega \lambda}{1 + \omega^2 \lambda^2} \end{cases} \quad (3.14)$$

### 3.4.2.2. Résultats expérimentaux

Nous avons utilisé des échantillons de CpCl NaSal avec des concentrations entre 5 et 30 % en masse.

Pour comparer les résultats obtenus aux valeurs théoriques, nous avons ajusté les courbes obtenues à l'aide de l'OFR avec l'équation 3.13 (voir figures 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 et 3.16).

Pour le calcul de la limite expérimentale, nous utilisons les spécifications de couple limite (voir section 3.2.2.1) du rhéomètre et le coefficient de contraintes de la géométrie. La valeur ainsi obtenue est de  $G_{min} = 1,7 Pa$ . Cette limite expérimentale est représentée sur les figures 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15 et 3.16.

### 3. Optimal Fourier Rheometry

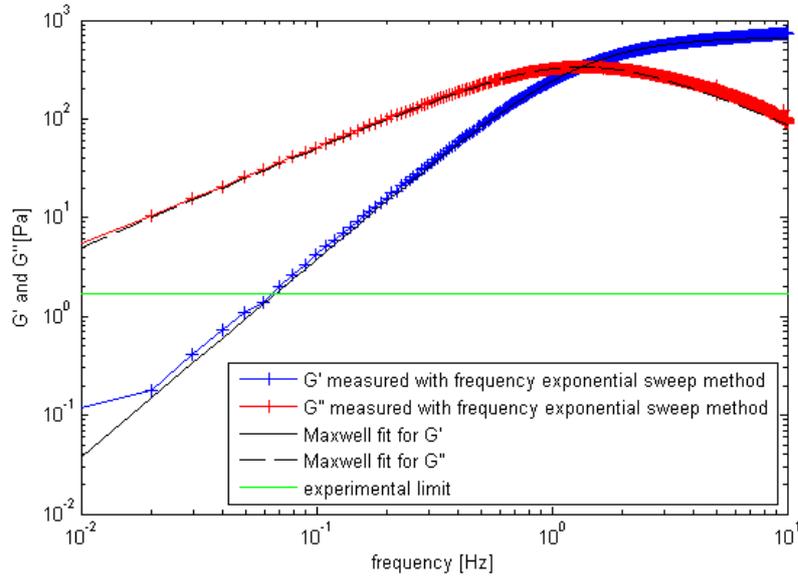


Figure 3.12.:  $G'$  et  $G''$  pour l'échantillon de CpCl NaSal à 10 %, avec les approximations théoriques.

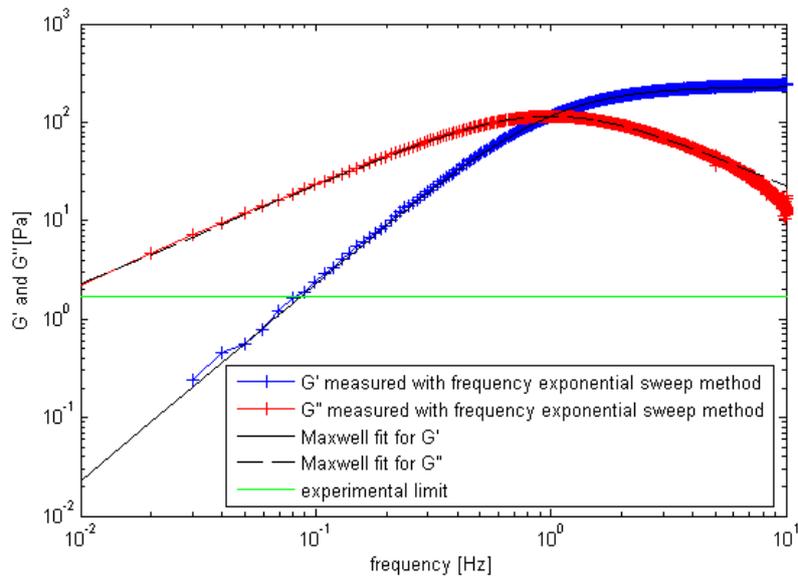


Figure 3.13.:  $G'$  et  $G''$  pour l'échantillon de CpCl NaSal à 15 %, avec les approximations théoriques.

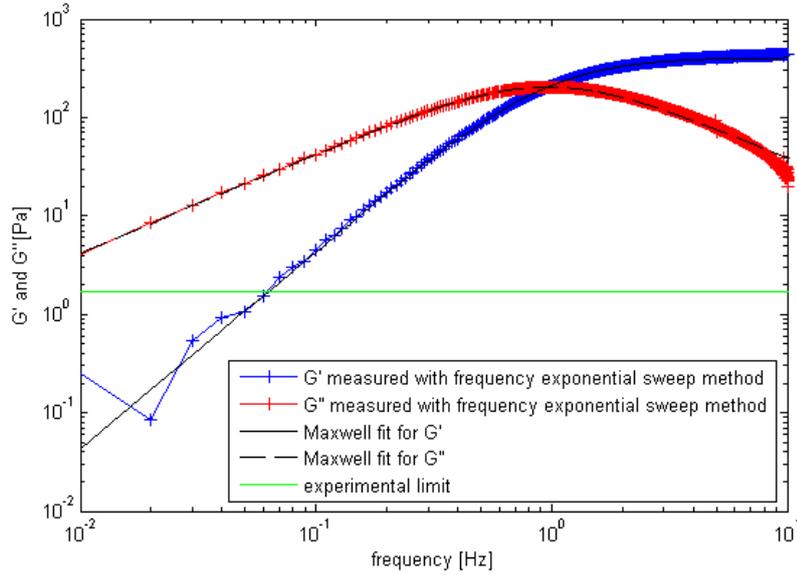


Figure 3.14.:  $G'$  et  $G''$  pour l'échantillon de CpCl NaSal à 20 %, avec les approximations théoriques.

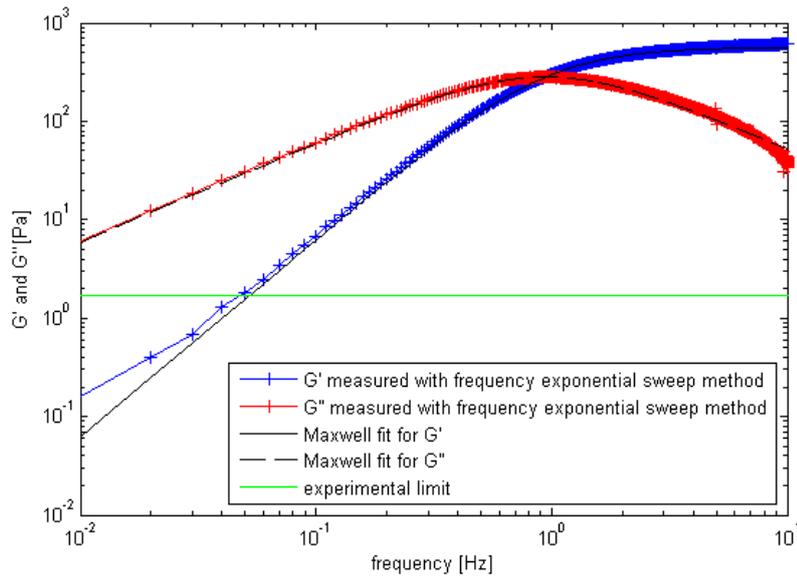
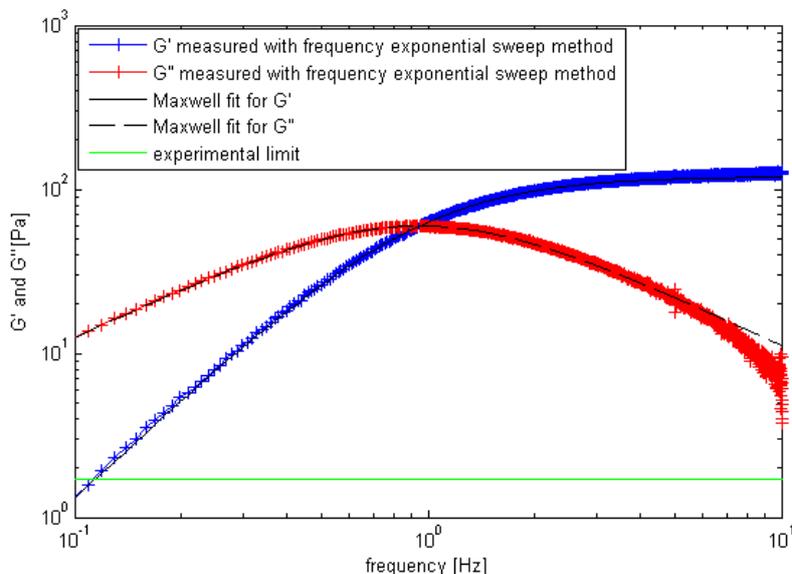


Figure 3.15.:  $G'$  et  $G''$  pour l'échantillon de CpCl NaSal à 25 %, avec les approximations théoriques.

### 3. Optimal Fourier Rheometry



**Figure 3.16.:**  $G'$  et  $G''$  pour l'échantillon de CpCl NaSal à 30 %, avec les approximations théoriques.

Nous pouvons voir que les modules sont parfaitement prédits par le modèle de Maxwell. La chute de  $G''$  au hautes fréquences peut être expliquée par l'inertie de l'ensemble formé par la géométrie de mesure et du transducteur (voir section 3.2.2.2).

Dans le tableau 3.4.2.2 sont représentées les valeurs de  $G$  et  $\eta$  obtenues par ajustement des modules mesurés par OFR grâce à l'équation 3.13 d'une part, et ces données mesurées par Berret, Roux et Lindner [Berret *et al.*, 1998].

**Table 3.1.:** Comparaison entre les paramètres du modèle de Maxwell obtenus par OFR, et par méthode de croisement dans [Berret *et al.*, 1998]

concentration	Données par OFR		données de Berret et al.	
	$\eta$ (Pa.s)	$G$ (Pa)	$\eta$ (Pa.s)	$G$ (Pa)
5 %	7	35	12	40
10 %	20	119	60	150
15 %	36	229	100	300
20 %	67	406	150	450
25 %	94	562	100	600
30 %	79	670	75	650

Les valeurs de  $G$  obtenues par OFR sont très proches de celles mesurées par Berret et al., mais les valeurs de  $\eta$  diffèrent significativement. Cela peut être expliqué par le fait que les échantillons de CpCl NaSal ont été purifiés dans le cas de Berret et al. contrairement au nôtre.

**Quatrième partie .**  
**Viscoélasticité du sang**



# Table des matières

---

<b>4. Viscoélasticité du sang</b>	<b>113</b>
4.1. Introduction . . . . .	113
4.2. Problèmes expérimentaux sur le sang . . . . .	114
4.2.1. Adsorption de protéines à l'interface sang-air ou sang-huile . .	114
4.2.2. Domaine linéaire . . . . .	116
4.2.3. Effets temporels . . . . .	116
4.3. Matériaux et méthodes . . . . .	117
4.4. Paramètres influençant les propriétés viscoélastiques linéaires du sang	119
4.4.1. Analyse en fonction de l'hématocrite . . . . .	119
4.4.2. Analyse en fonction de la concentration en fibrinogène . . . .	119
4.4.3. Analyse en fonction de la concentration en albumine . . . . .	122
4.4.4. Analyse en fonction de la concentration en immunoglobulines G123	
4.5. Modèle empirique . . . . .	123
4.6. Propriétés rhéologiques du sang : un fluide viscoélastique percolé . . .	125

---



## 4. Viscoélasticité du sang

### 4.1. Introduction

Pour comprendre l'évolution des propriétés mécaniques du caillot au cours de sa formation, il est essentiel de bien caractériser le sang qui est le point de départ de la réaction de coagulation, ce qui pose plusieurs problèmes. Tout d'abord, le sang est un matériau très peu visqueux. Par conséquent, pour mesurer ses propriétés viscoélastiques il est nécessaire de disposer d'un rhéomètre suffisamment sensible. C'est le cas de l'Ares-G2 lorsque celui-ci est bien isolé des vibrations ambiantes, comme nous venons de le montrer.

Comme tout système issu du monde du vivant, le sang présente une importante variabilité biologique, qui se traduit en pratique par une grande variabilité mécanique. Afin de minimiser celle-ci, il convient de contrôler un nombre maximal de paramètres. Par conséquent, nous avons utilisé un sang modèle, constitué de globules rouges lavés en suspension dans une solution tampon contenant des quantités contrôlées de protéines plasmatiques (albumine, fibrinogène et immunoglobulines G). Ainsi, le seul facteur de fluctuation potentiel qui n'est pas contrôlé est la variabilité entre les globules rouges provenant d'individus différents (voir section 2.5.1.2 et 2.5.1.4). La reproductibilité des mesures de sang pour des concentrations en protéines plasmatiques équivalentes est donc maximisée, comparé aux expériences réalisées sur des suspensions de globules rouges dans du plasma autologue et dont les concentrations protéiques ne sont pas reportées, qui sont les plus étudiés dans la littérature.

En raison de la propension des globules rouges à s'agréger et à sédimenter, le sang est un matériau évoluant dans le temps. Il est par conséquent nécessaire d'utiliser une technique de mesure qui soit résolue en temps (voir section 1.2.3).

Nous verrons dans un premier temps que l'OFR remplit bien cette condition. Ensuite, nous verrons quels paramètres ont le plus d'influence sur les propriétés viscoélastiques du sang, et quels sont leurs effets. Enfin, nous verrons que le sang est un fluide qui a des propriétés élastiques très marquées, et qu'il existe dans certaines conditions un réseau percolé de globules rouges agrégés dans le matériau.

## 4.2. Problèmes expérimentaux sur le sang

### 4.2.1. Adsorption de protéines à l'interface sang-air ou sang-huile

Lors de tests en oscillation, des solutions de protéines globulaires, et particulièrement des solutions d'albumine, exhibent un comportement rhéologique typique d'un solide, avec un module élastique du même ordre que le module visqueux, voire supérieur [Matsumoto et Inoue, 1993] [Ikeda et Nishinari, 2000] [Ikeda et Nishinari, 2001]. Ce phénomène est lié à l'adsorption spontanée des protéines à l'interface entre le liquide et l'air, ou si l'on ajoute une mince couche d'huile minérale pour éviter l'évaporation, à l'interface entre le liquide mesuré et l'huile surnageante. Les interactions entre protéines à l'interface entraînent la formation d'un film viscoélastique, responsable de la réponse caractéristique d'un solide observée [Sharma *et al.*, 2011]. Dans le cas d'une mesure rhéométrique sur le sang, il existe nécessairement une interface entre le sang et l'air ou entre le sang et l'huile. L'effet décrit ci-dessus intervient donc.

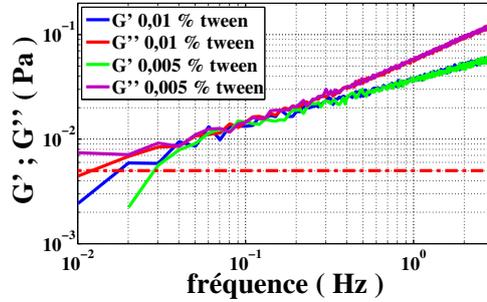
Afin de s'affranchir de ces phénomènes, qui sont à considérer comme des artefacts de mesure, on peut ajouter à la solution un surfactant non ionique de bas poids moléculaire : le tween 20. Ce surfactant possède une énergie d'adsorption par  $m^2$  supérieure à celle des protéines [Patapoff et Esue, 2009]. Par conséquent, le tween aura tendance à saturer l'interface, et donc à empêcher les protéines de s'y adsorber. Celui-ci n'engendre pas de film viscoélastique à l'interface, car les molécules de tween ne forment aucune liaison, covalente ou non [Bos et van Vliet, 2001].

Les recommandations du fabricant sont d'ajouter 0,01 % de tween 20 dans les suspensions concernées par les effets d'adsorption de protéines aux interfaces. Afin de vérifier l'effet de la migration des protéines sur la viscoélasticité mesurée du sang, nous avons comparé trois suspensions de globules rouges avec respectivement 0 %, 0,005 % et 0,01 % de tween 20, à hématoците 0,4, 3  $g/l$  de fibrinogène et 30  $g/l$  d'albumine. Il en ressort que l'utilisation d'une proportion de 0,005 % en masse de tween 20 suffit (voir figure 4.1).

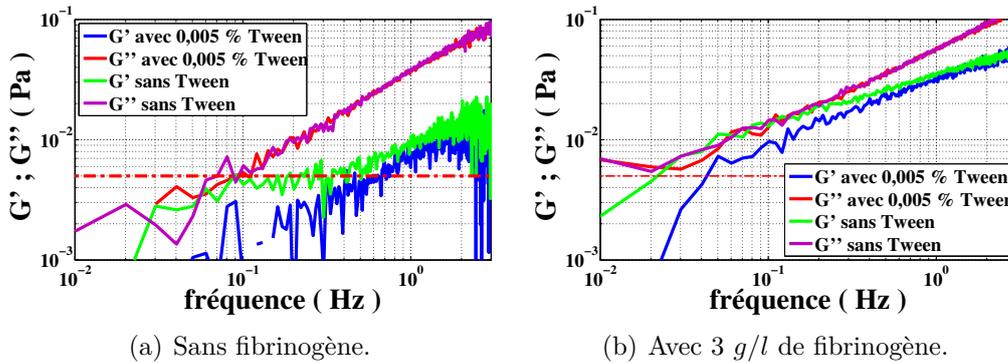
On observe que l'adjonction de 0,005 % en masse de tween 20 dans un sang modèle contenant 30  $g/l$  d'albumine et sans fibrinogène diminue le module élastique mesuré, particulièrement aux basses fréquences (voir figure 4.2 (a)). En revanche, cela n'a pas d'influence sur le module de viscosité. En présence de fibrinogène, l'adjonction de tween 20 a également un effet important sur le module élastique (voir figure 4.2 (b)). Cela montre clairement que, même dans le cas d'un milieu multicomposants comme le sang, la migration et l'adsorption des protéines aux interfaces liquides intervient et doit être prise en compte.

En présence de tween, les propriétés viscoélastiques mesurées sont celles du milieu, et ne font pas intervenir des propriétés mécaniques interfaciales.

#### 4.2. Problèmes expérimentaux sur le sang

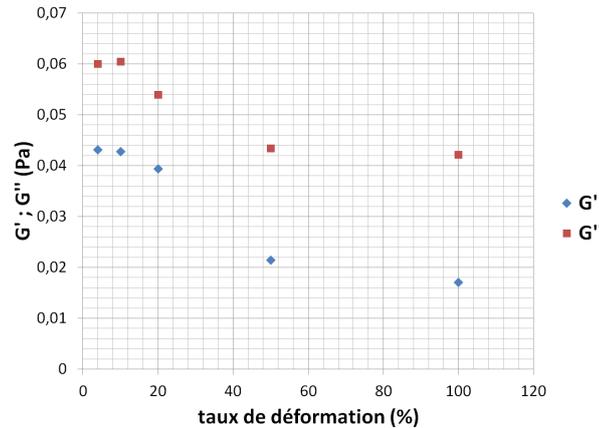


**Figure 4.1.:** Modules viscoélastiques d'une suspension de globules rouges à hématoците 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 *mOsm* avec 30 *g/l* d'albumine, 3 *g/l* de fibrinogène, et 0,01 % ou 0,005 % de tween 20. La limite expérimentale du dispositif est représentée à l'aide d'une ligne pointillée rouge.



**Figure 4.2.:** Modules viscoélastiques d'une suspension de globules rouges à hématoците 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 *mOsm* avec 30 *g/l* d'albumine, et 0,005 % de tween 20 (lignes) ou sans tween 20 (pointillés), avec 3 *g/l* de fibrinogène, et sans. La limite expérimentale du dispositif est représentée à l'aide d'une ligne pointillée rouge.

#### 4. Viscoélasticité du sang



**Figure 4.3.:** Modules viscoélastiques en fonction du taux de déformation à 1  $Hz$  d'une suspension de globules rouges à hémocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300  $mOsm$  avec 30  $g/l$  d'albumine, 3  $g/l$  de fibrinogène, 0,005 % de tween 20.

#### 4.2.2. Domaine linéaire

Pour nous assurer que toutes les mesures ultérieures sont bien réalisées dans le domaine linéaire du matériau, nous avons réalisé une série de mesure sur une suspension de globules rouges lavés à hémocrite 0,4 (voir section 4.3) dans une solution de tampon HEPES à 300  $mOsm$  et pH 7,4, et de 3  $g/l$  de fibrinogène (Clottafact, LFB, France), 30  $g/l$  d'albumine (vialebex, LFB, France), et avec 0,005 % en masse de tween 20.

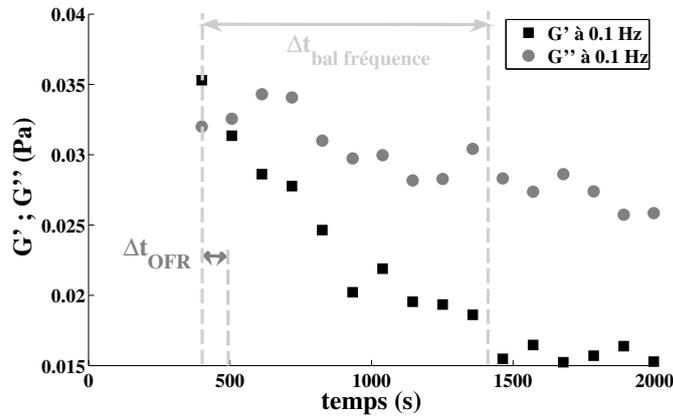
Les modules viscoélastiques mesurés en faisant varier le taux de déformation à 1  $Hz$  sont représentés dans la figure 4.3. Ils sont quasiment égaux jusqu'à un taux de déformation de 10 %. Le domaine linéaire des suspensions de globules rouges s'étend donc jusqu'à cette valeur. Par la suite, toutes les mesures sont effectuées à un taux de déformation de 4 %, ce qui garantit de bien se situer dans le domaine linéaire des suspensions de globules rouges.

#### 4.2.3. Effets temporels

En raison de la sédimentation (voir section 2.6.1.2) et de l'agrégation (voir section 2.4) des globules rouges, qui interviennent de façon concomitante, les propriétés mécaniques du sang évoluent avec le temps.

En réalisant une mesure résolue en temps à l'aide de l'OFR (c'est à dire en accord avec le critère du nombre de mutation, voir section 1.2.3), dans une suspension de globules rouges à hémocrite 0,4 dans du tampon HEPES à 300  $mOsm$  avec 30  $g/l$  d'albumine, 3  $g/l$  de fibrinogène et 0,005 % de tween 20, le module élastique à 0,1  $Hz$  varie de plus de 50 % en 1000  $s$  (voir figure 4.4).

Une mesure utilisant une méthode classique (balayage discret en fréquence) ne



**Figure 4.4.:** Évolution temporelle des modules viscoélastiques d'une suspension de globules rouges à hémocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 *mOsm* avec 30 *g/l* d'albumine, 3 *g/l* de fibrinogène et 0,005 % de tween 20 à 0,1 *Hz*.

serait pas valable sur un tel échantillon. En effet, le temps requis pour l'acquisition d'un point est de l'ordre de 1000 *s*. Durant cette période, la valeur du module élastique de l'échantillon aura varié d'environ 45 %.

Il est par conséquent primordial de veiller à ce que la méthode utilisée pour la mesure des modules viscoélastiques du sang soit résolue en temps. Il n'est pas possible de considérer le sang comme un matériau statique. Toutes les mesures seront réalisées à l'aide de l'OFRR avec un temps d'acquisition de 100 *s*, ce qui permet d'obtenir des données jusqu'à 0,01 *Hz* sur un matériau n'évoluant pas significativement sur le temps de mesure.

### 4.3. Matériaux et méthodes

Le sang modèle est préparé à partir de globules rouges lavés en tampon HEPES à 300 *mOsm* et pH 7,4, et de protéines plasmatiques humaines. Les échantillons sont préparés comme suit :

- Des poches de sang humain à usage *in vitro* sont obtenues auprès de l'EFS.
- Le sang est centrifugé 15 *min* à 2500 *G* dans une centrifugeuse à 4°C.
- Le plasma et les éléments figurés surnageants (globules blancs, plaquettes) sont retirés par pipetage.
- Du tampon HEPES à 300 *mOsm* est ajouté aux globules rouges (environ 3/5 de tampon et 2/5 de globules), puis la suspension obtenue est agitée manuellement.
- La suspension obtenue est centrifugée 15 *min* à 2500 *G* dans une centrifugeuse à 4°C, puis la phase liquide surnageant est retirée pour obtenir un culot de globules rouges. Cette étape et la précédente sont répétées deux fois.
- L'hématocrite du culot ainsi obtenu est mesuré, puis celui-ci est mélangé dans

#### 4. Viscoélasticité du sang

**Table 4.1.:** Constitution des différents échantillons étudiés

Ht (l/l)	[Alb] (g/l)	[Fg] (g/l)	[IgG] (g/l)
0,3	30	0	0
0,3	30	1	0
0,3	30	3	0
0,3	30	5	0
0,4	30	0	0
0,4	30	1	0
0,4	30	3	0
0,4	30	5	0
0,5	30	0	0
0,5	30	1	0
0,5	30	3	0
0,5	30	5	0
0,4	10	3	0
0,4	20	3	0
0,4	30	3	0
0,4	40	3	0
0,4	30	0	12,5
0,4	30	3	12,5
0,4	30	5	12,5

les proportions choisies aux protéines sanguines appropriées dans une solution de tampon HEPES à 300 *mOsm*.

Les protéines utilisées sont de l'albumine (Vialebex), du fibrinogène (Clottafact) et des immunoglobulines G (Clairyg) (LFB, Les Ulis, France). Une quantité de tween 20 telle que la concentration finale de ce composant soit de 0,005 % est ajoutée dans les contenants avant l'adjonction des protéines.

Les suspensions présentées dans la table 4.1 ont été étudiées.

Les échantillons ainsi préparés sont stockés à 4°C et sont périodiquement agités manuellement jusqu'à leur utilisation. Le temps écoulé entre le prélèvement et la mesure est toujours inférieur à 5 jours.

Quelques minutes avant la mesure, les échantillons sont amenés à 37°C dans un bain-marie. Ils sont ensuite injectés à l'aide d'une seringue dans l'entrefer de la géométrie maintenue à 37°C. L'intégrité des globules rouges a été inspectée à l'aide d'un microscope optique après une mesure afin de vérifier que le cisaillement lors de l'injection ne les détruit pas. Le rhéomètre utilisé est un Ares-G2 (TA instruments, États-Unis), équipé d'une géométrie de type cylindres coaxiaux à double entrefer.

La procédure de mesure est immédiatement lancée après l'injection du sang modèle, et l'ajout d'une goutte d'huile silicone pour éviter l'évaporation. La suspension

#### 4.4. Paramètres influençant les propriétés viscoélastiques linéaires du sang

subit un précisaillement à  $100\text{ s}^{-1}$  pendant  $60\text{ s}$ , puis l'échantillon est laissé au repos environ 1 minute, et ensuite une oscillation de type OFR, dont les paramètres sont listés ci-dessous, lui est appliquée :

- fréquence basse :  $0,01\text{ Hz}$ ,
- fréquence haute :  $30\text{ Hz}$ ,
- temps d'acquisition :  $100\text{ s}$ ,
- taux de déformation :  $4\%$ ,
- fréquence d'échantillonnage :  $150\text{ Hz}$ .

Cette procédure est répétée 3 fois en prenant  $20\text{ s}$  de pause entre les oscillations, afin d'obtenir plusieurs points de mesure.

Les séries de mesure dans lesquelles l'hématocrite et la concentration en fibrinogène varient ont été répétées 2 fois en utilisant des globules rouges provenant de donneurs différents.

## 4.4. Paramètres influençant les propriétés viscoélastiques linéaires du sang

### 4.4.1. Analyse en fonction de l'hématocrite

À concentrations en fibrinogène et albumine constante, nous faisons varier l'hématocrite (sans IgG). Les modules viscoélastiques obtenus avec des concentrations en fibrinogène de  $0, 1, 3$  ou  $5\text{ g/l}$  pour différentes valeurs d'hématocrite sont représentés dans la figure 4.5.

En pratique, seuls les modules jusqu'à environ  $3\text{ Hz}$  sont exploitables. En effet l'inertie du fluide entraîne une forte déviation des mesures au delà de cette limite, et ce malgré la correction apportée (voir section 4.6).

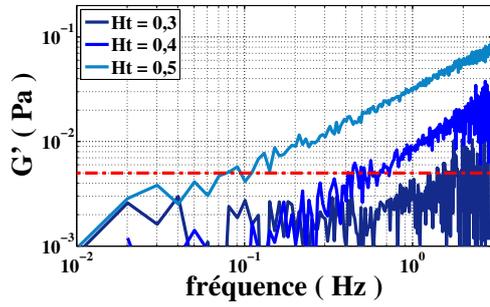
L'augmentation de l'hématocrite a pour effet essentiel d'élever le module élastique, ainsi que le module visqueux (voir figure 4.5). En revanche, cela ne change quasiment pas le comportement rhéologique du matériau : les modules viscoélastiques sont simplement translatés.

### 4.4.2. Analyse en fonction de la concentration en fibrinogène

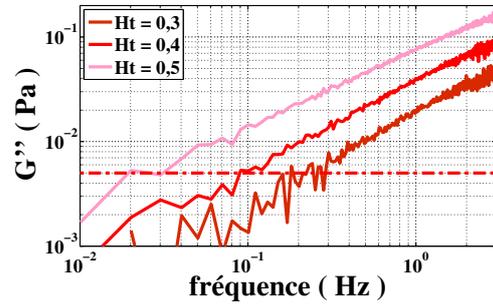
Nous avons cette fois-ci analysé les données à hématocrite et concentration en albumine fixés (sans IgG), et nous avons regardé l'effet de la concentration en fibrinogène. Les modules viscoélastiques en fonction de la concentration en fibrinogène pour des suspensions à hématocrite  $0, 3, 0, 4$  et  $0, 5$  sont représentés dans la figure 4.6.

Le fibrinogène a pour effet d'augmenter drastiquement la viscosité de la suspension, en accord avec les données de la littérature. De façon tout à fait remarquable, cela a également pour effet d'augmenter de façon importante le module élastique.

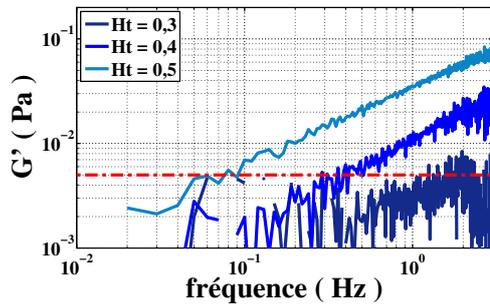
#### 4. Viscoélasticité du sang



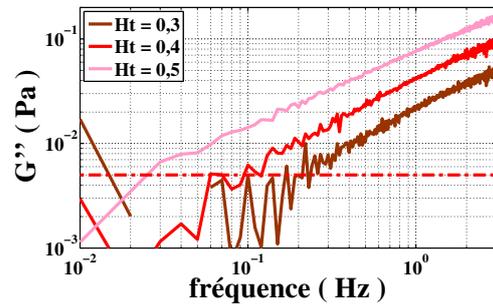
(a) 0 g/l de fibrinogène, Modules élastiques



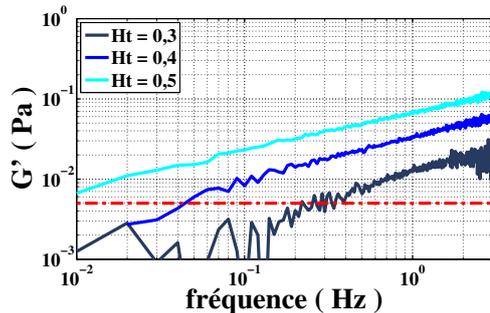
(b) 0 g/l de fibrinogène, Modules visqueux



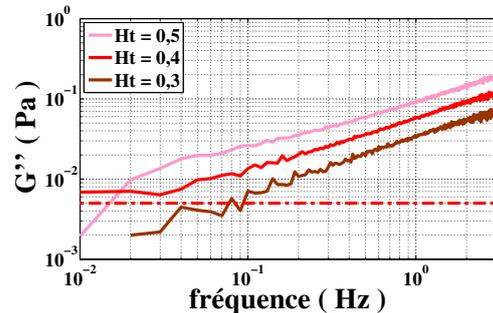
(c) 1 g/l de fibrinogène, Modules élastiques



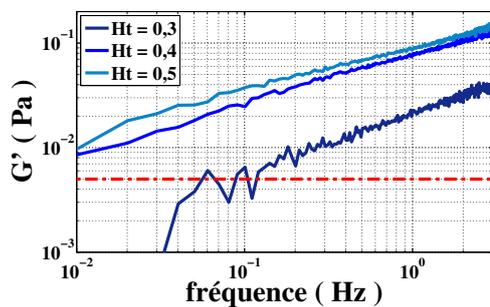
(d) 1 g/l de fibrinogène, Modules visqueux



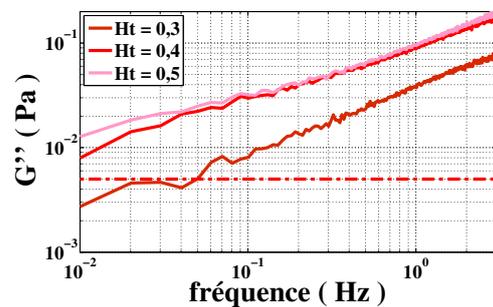
(e) 3 g/l de fibrinogène, Modules élastiques



(f) 3 g/l de fibrinogène, Modules visqueux



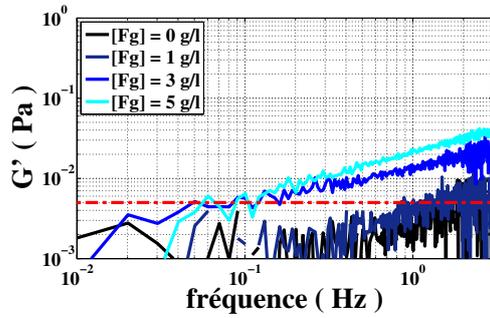
(g) 5 g/l de fibrinogène, Modules élastiques



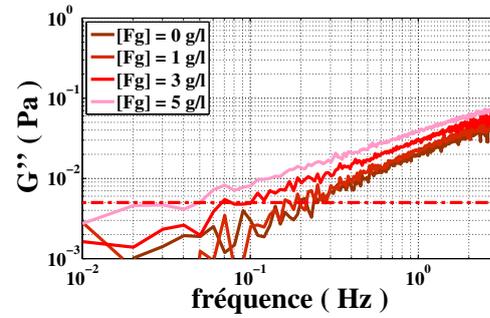
(h) 5 g/l de fibrinogène, Modules visqueux

**Figure 4.5.:** Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges dans une solution de tampon HEPES à 300 mOsm avec 30 g/l d'albumine, 0,005 % de tween 20, avec 0, 1, 3, ou 5 g/l de fibrinogène, en fonction de l'hématocrite (0,3, 0,4 ou 0,5).

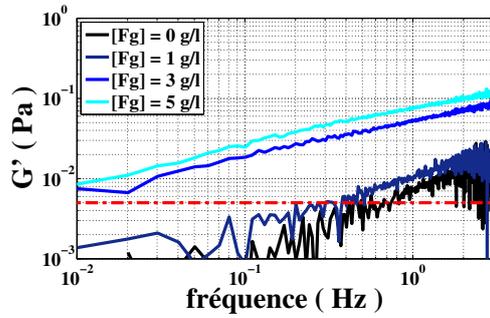
#### 4.4. Paramètres influençant les propriétés viscoélastiques linéaires du sang



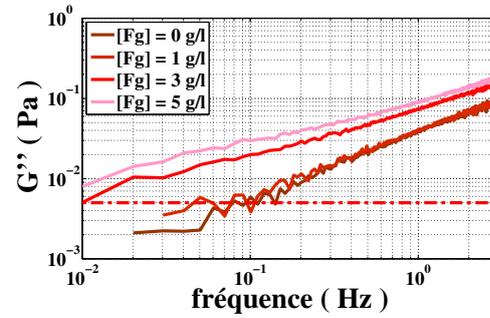
(a) Hématocrite 0,3 Modules élastiques



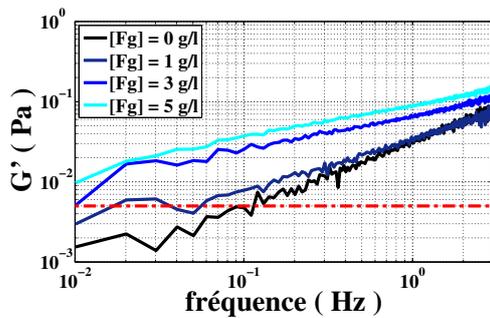
(b) Hématocrite 0,3 Modules visqueux



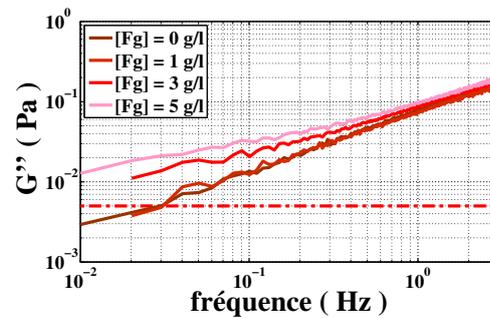
(c) Hématocrite 0,4 Modules élastiques



(d) Hématocrite 0,4 Modules visqueux



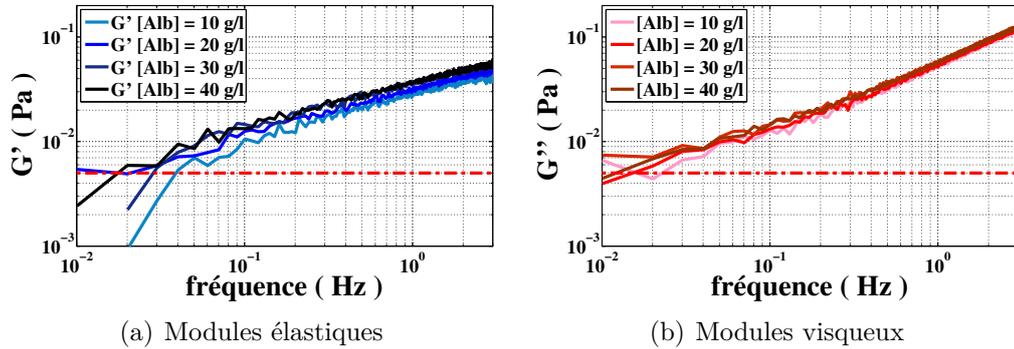
(e) Hématocrite 0,5 Modules élastiques



(f) Hématocrite 0,5 Modules visqueux

**Figure 4.6.:** Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges à différents hématocrites fixés dans une solution de tampon HEPES à 300 *mOsm* avec 30 *g/l* d'albumine, 0,005 % de tween 20, et 0 *g/l*, 1 *g/l*, 3 *g/l* ou 5 *g/l* de fibrinogène.

#### 4. Viscoélasticité du sang



**Figure 4.7.:** Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges à hémocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 *mOsm*, 3 *g/l* de fibrinogène, et 10 *g/l*, 20 *g/l*, 30 *g/l* ou 40 *g/l* d'albumine.

La seconde observation essentielle est que la concentration en fibrinogène change également le comportement viscoélastique des suspensions. La courbe du module élastique en fonction de la fréquence en représentation logarithmique est ajustable par une droite. La pente de celle-ci diminue entre 0 et 3 *g/l*, puis se stabilise entre 3 et 5 *g/l* à environ 0,5 (effet de saturation). La pente du module visqueux diminue également avec la concentration en fibrinogène pour atteindre une valeur proche de 0,5 pour les hémocrites 0,4 et 0,5, et proche de 0,7 pour l'hémocrite 0,3.

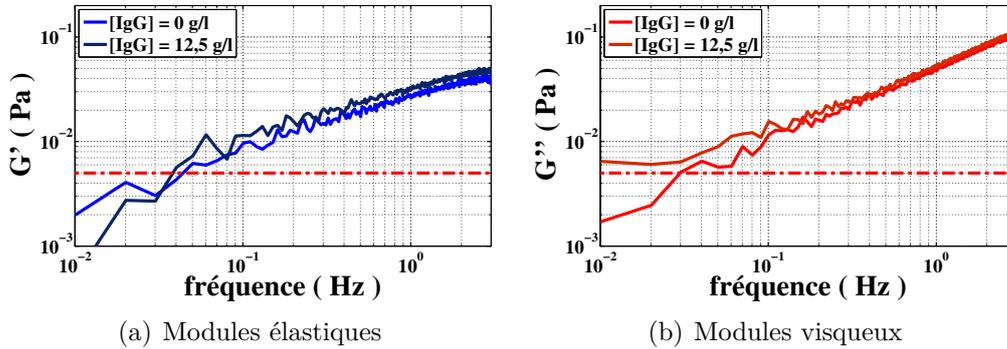
#### 4.4.3. Analyse en fonction de la concentration en albumine

Pour ces mesures, nous n'avons pas utilisé de tween 20 dans la préparation des échantillons (voir section 4.2.1).

Les modules viscoélastiques pour des suspension à hémocrite 0,4 en fonction de la concentration en albumine sont représentés dans la figure 4.7.

On constate que le module élastique augmente de façon très faible alors que la concentration en albumine est multipliée par 4. La pente de sa représentation logarithmique n'est pas influencée par la concentration en albumine. Le module visqueux n'est influencé que par l'encombrement spatial que représente l'albumine en solution.

L'effet de l'albumine est mineur comparé à celui du fibrinogène : entre 1 *g/l* et 5 *g/l* de fibrinogène, le module élastique à 1 *Hz* passe de  $10^{-2}$  *Pa* à  $8 \cdot 10^{-2}$  *Pa* (voir figure 4.6), tandis qu'entre 10 *g/l* et 40 *g/l* d'albumine, celui-ci passe d'environ  $2 \cdot 10^{-2}$  *Pa* à  $3 \cdot 10^{-2}$  *Pa* (voir figure 4.7). Nous trouvons donc que l'albumine n'a pas d'effet agrégant sur les globules rouges en présence de fibrinogène.



**Figure 4.8.:** Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges à hématocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 *mOsm* avec 0,005 % de tween 20, 3 *g/l* de fibrinogène, 30 *g/l* d'albumine, et 0 *g/l* ou 12,5 *g/l* d'IgG.

#### 4.4.4. Analyse en fonction de la concentration en immunoglobulines G

Nous avons travaillé sur des suspensions à hématocrite, concentrations en fibrinogène et en albumine fixés, contenant ou non des immunoglobulines G (IgG).

Les modules viscoélastiques pour des suspensions à hématocrite 0,4, concentration en fibrinogène de 3 *g/l* et concentration en albumine de 30 *g/l*, avec et sans IgG sont représentés dans la figure 4.8.

La présence d'IgG dans la suspension a pour effet d'augmenter légèrement les modules viscoélastiques, mais ceux-ci sont globalement peu affectés. Par exemple, le module élastique à 1 *Hz* passe d'environ  $2,5 \cdot 10^{-2}$  *Pa* à  $3,1 \cdot 10^{-2}$  *Pa* entre 0 *g/l* et 12,5 *g/l* d'IgG, et le module visqueux de  $3,9 \cdot 10^{-2}$  *Pa* à  $4,2 \cdot 10^{-2}$  *Pa*. La variation des modules est du même ordre de grandeur que celle observée pour une variation de 10 *g/l* d'albumine. Les IgG ont donc essentiellement un effet d'encombrement.

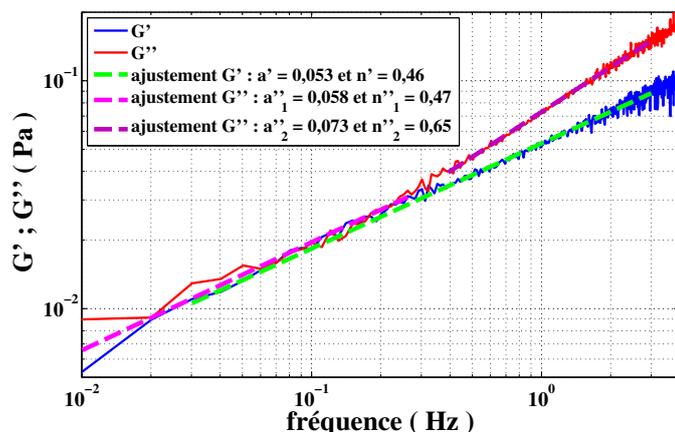
## 4.5. Modèle empirique

Il apparaît donc à la lumière des informations apportées par les sections précédentes que les paramètres ayant le plus d'influence sur les modules viscoélastiques sont l'hématocrite, et la concentration en fibrinogène.

Nous avons réalisé un balayage sur ces deux paramètres. Les hématocrites utilisés sont 0,3, 0,4 et 0,5, et les concentrations en fibrinogène sont 0, 1, 3 et 5 *g/l*.

Pour représenter ces données de manière pratique, nous utilisons un modèle empirique. En effet, la courbe du module élastique en fonction de la fréquence en représentation logarithmique est ajustable par une droite, et la courbe du module visqueux en fonction de la fréquence en représentation logarithmique est ajustable à l'aide d'une ou deux droites selon les conditions. Cela signifie que les modules viscoélastiques peuvent se mettre sous la forme de lois de puissance :

#### 4. Viscoélasticité du sang



**Figure 4.9.:** Modules viscoélastiques d'un sang modèle à hémocrite 0,4, avec 30 g/l d'albumine et 3 g/l de fibrinogène, ajustés selon l'équation 4.1.

$$\begin{aligned}
 G' &\approx a' f^{n'} \\
 G'' &\approx \begin{cases} a''_1 f^{n''_1} & \text{pour } f < f_c \\ a''_2 f^{n''_2} & \text{pour } f > f_c \end{cases} \quad (4.1)
 \end{aligned}$$

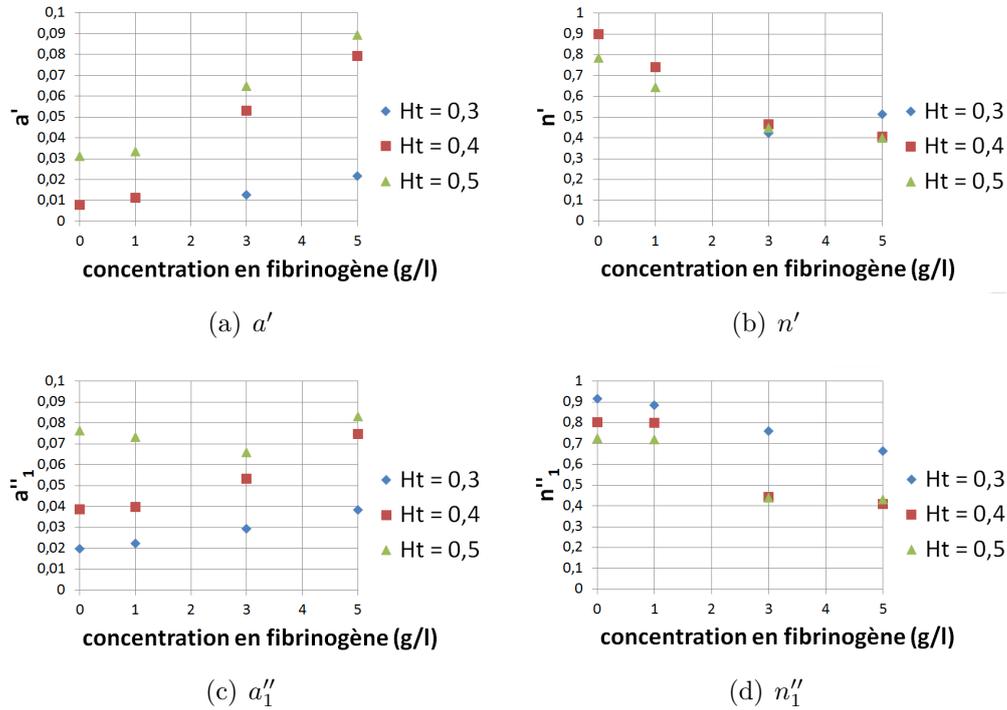
Où  $f$  est la fréquence, et  $f_c$  une fréquence critique pour laquelle la loi de puissance change. On détermine  $a'$ ,  $n'$ ,  $a''_1$ ,  $n''_1$ ,  $a''_2$  et  $n''_2$  par un ajustement.

La figure 4.9 donne un exemple de courbes de modules viscoélastiques ajustées, pour un sang modèle à hémocrite 0,4, avec 30 g/l d'albumine et 3 g/l de fibrinogène. Dans ces conditions, pour les basses fréquences on a  $G' \propto G'' \propto f^{n'}$ . Ceci est caractéristique de la présence d'un réseau percolé au sein du matériau. Par conséquent, les globules rouges agrégés forment un réseau tridimensionnel dans l'échantillon.

L'ensemble des paramètres  $a'$ ,  $n'$ ,  $a''_1$ ,  $n''_1$ ,  $a''_2$  et  $n''_2$  mesurés pour toutes les conditions balayées sont représentés dans la figure 4.10.

D'après ces données, on voit que l'exposant de la loi de puissance pour les deux modules semblent ne plus évoluer que très faiblement entre 3 g/l et 5 g/l de fibrinogène, quel que soit l'hémocrite. En revanche, les modules continuent bien à augmenter puisque les multiplicateurs  $a'$  et  $a''_1$  s'accroissent avec la concentration en fibrinogène. Il est également notable que pour les suspensions à hémocrites 0,4 et 0,5, avec 3 et 5 g/l de fibrinogène, les exposants de loi de puissance  $n'$  et  $n''_1$  sont égaux. Par conséquent, dans ces conditions  $G' \propto G'' \propto f^{n'} \propto f^{n''_1}$ , un réseau percolé de globules rouges existe dans la suspension (voir section 4.6).

#### 4.6. Propriétés rhéologiques du sang : un fluide viscoélastique percolé



**Figure 4.10.:** Paramètres du modèle empirique du sang en fonction de l'hématocrite et de la concentration en fibrinogène (voir texte pour la signification des paramètres).

### 4.6. Propriétés rhéologiques du sang : un fluide viscoélastique percolé

Dans la suite de cette partie, nous présentons un projet d'article à soumettre en 2015, qui présente les résultats obtenus à partir des mesures sur le sang modèle.

# Blood's sol-gel phase diagram

---

## **ABSTRACT:**

Blood is an almost Newtonian liquid which flows in the body's circulation tree, periodically pushed by the cardiac pump. While this affirmation seems common sense, past studies have hinted more or less directly at the existence of a weak elastic component in this material. Using breakthrough mechanical measurement techniques as well as a carefully designed model blood, we show that the blood's elasticity is considerably larger than previously reported. Indeed, in physiologically relevant conditions, the rouleaux-induced elasticity is of the same order of magnitude than viscosity. At elevated, but still within the normal range of physiological conditions, a depletion induced sol-gel phase transition is observed which is well predicted by simplified mode coupling theory.

Since recent fluid mechanic results indicate that blood flow is plug-like more often than not, this result sheds new light on the way blood is transported in the circulatory system both in healthy and diseased conditions.

## I. Introduction

The blood circulation system is remarkable for many reasons, in particular for its extraordinary efficiency. The heart, a 1W peristaltic pump, is able to circulate a very concentrated suspension (~45% volume fraction) through kilometers of arteries, arterioles, veins, etc... How this is possible even for a low viscosity fluid such as sheared blood (viscosity  $\sim$  water) remains unclear and suggests that other phenomena such as the detailed unsteady rheological properties of blood and vessel walls may participate or at least influence in this efficiency.

Since the early 60's, a large number of studies have been devoted to the exploration of blood's steady-state viscosity, and in particular its dependence on the applied shear [1]–[6]. It is well established that blood is a shear-thinning fluid (e.g. [2], [6]), due to the disaggregation by shear of red blood cells (RBCs) aggregates called rouleaux. The physical mechanism responsible for this aggregation has been the topic of long controversies between the bridging and depletion models (e.g.[7]). Recent results favor the depletion model [8]–[12], while there seems to be cell-specific contributions to the adhesion [13]. Among viscosity studies, several reported the existence of a yield stress in blood (e.g. [4], [14]–[17]) while others did not ([2], [6], [18]). A yield stress corresponds to the minimal stress necessary to make the material flow, stress below which the material appears as an elastic solid. However because of almost unavoidable experimental artifacts (see below), the question still remains as to whether whole blood does exhibit a yield stress or not. Incidentally, the existence of a true yield stress requires that the material be predominantly elastic in its linear viscoelastic regime.

Up to date, the main attempts to measure blood viscoelasticity were from Thurston's group (e.g. [19], [20]) using oscillatory flow in circular tubes. Those studies always showed that blood was a viscous fluid with a weak elastic component since the measurements were performed far outside the linear viscoelastic regime where elastic effects are expected to be much smaller than viscous effects. However blood viscoelasticity was tube-diameter dependent [21] in disagreement with the Poiseuille-like flow model hypothesis. To account for this discrepancy, a plug-like flow had to be hypothesized [21]. Recent experimental results suggest that this plug-flow hypothesis should be extended to the circulation network. Indeed, experimental velocity profiles of non-aggregating red blood cells suspensions in small vessels [22] showed a very large wall slip (~50% of maximal velocity) and strong plug-like flow. Similarly, in microchannels and in the presence of fibrinogen, surprisingly large aggregates were observed, aggregates which should have been dispersed by shear if the usual Poiseuille velocity profile held [12]. Those observations suggest that plug-like flow is quite ubiquitous in the circulation system, and not only in the venule and arterioles network. The picture of blood circulation emerging from those results is quite different from what is usually accepted. Indeed, blood seems to be submitted in average to much lower shear rates than previously thought, where aggregates endure since they are submitted only to the small deformations present in the plug. So, the determination of the linear viscoelasticity of blood, i.e. whether it is predominantly liquid or solid, becomes an important issue for the understanding of blood circulation and its disorders.

The linear viscoelasticity of blood has never been determined essentially because of rather daunting experimental difficulties. First, instruments sensitive enough to measure the linear viscoelasticity of low viscosity fluids such as water have only recently appeared, and even with those instruments blood measurements remain a challenge. A major issue is sedimentation since RBCs are much denser ( $\approx 1.1$  g/ml) than plasma ( $\approx 1.025$  g/ml). At high volume fractions intuition suggests that sedimentation is negligible because particles movements are hindered by neighboring particles. Actually, sedimentation produces a time dependent apparent yield stress where the equivalent, neutrally buoyant suspension has no yield stress [23]. Solving this problem requires the fastest possible measurement method while current viscoelastic measurements are considerably slower than viscosity measurements. Another major experimental artifact known since the early 1980's [18] is protein migration and denaturation at the interface which produce an increased elastic modulus. This translates in rotational rheometry measurements into an apparent yield stress [24].

But the central problem in characterizing the mechanical properties of blood is the huge variability in blood's composition and behaviour. For example, blood agregability can vary for almost an order of magnitude between healthy controls [25]. Since viscosity variation with shear rate is linked to the aggregation state, a large variability is expected, nicely illustrated in Picart' work ( [16] fig. 6). To deal with this variability of donor's blood, two strategies can be used. First, one can use the standard method used throughout the literature where washed erythrocytes are resuspended in autologous plasma after determination of the composition in the main proteins. However this asks for a large panel of donors to sample the effect of the different proteins on blood viscoelasticity. Therefore we chose to use erythrocytes suspensions in buffer containing controlled amounts of the main plasma proteins, i.e. fibrinogen, albumin and immunoglobulin G.

In a first part we present the experimental methods used to alleviate the above major issues. Then we show, model and discuss the experimental results.

## **II. Materials and methods**

### **1. model and normal blood**

Human blood from three donors was taken from the local blood bank. Blood was centrifuged at 1500 g during 15 min. The pellet of red blood cells was washed twice in HBS buffer (Hepes 20 mM, NaCl 130 mM, pH = 7,4) and centrifuged again at 1500 G during 15 min. We set hematocrit between 0.3 and 0.5, albumin concentration between 0 and 40g/l, fibrinogen between 0 and 5g/l, and immunoglobulins G (IgG) at 0 or 12.5g/l. In all suspensions, 0.005% (v/v) tween 20 was added to avoid adhesion and filming of proteins at interfaces ([26], [27]).

Samples were stored at 4°C and periodically gently mixed. Time between blood sampling and experiments was always less than 5 days.

### **2. Rheometry**

As suggested in the introduction, the fastest possible method should be used to avoid sedimentation effects. Oscillatory rheometry experiments are performed using the Optimal Fourier Rheometry method recently developed in our lab [27]. This method, optimal both in signal-to-noise ratio as well as in its quickness, provides a complete viscoelastic spectrum above a low frequency  $f_{low}$  in a time

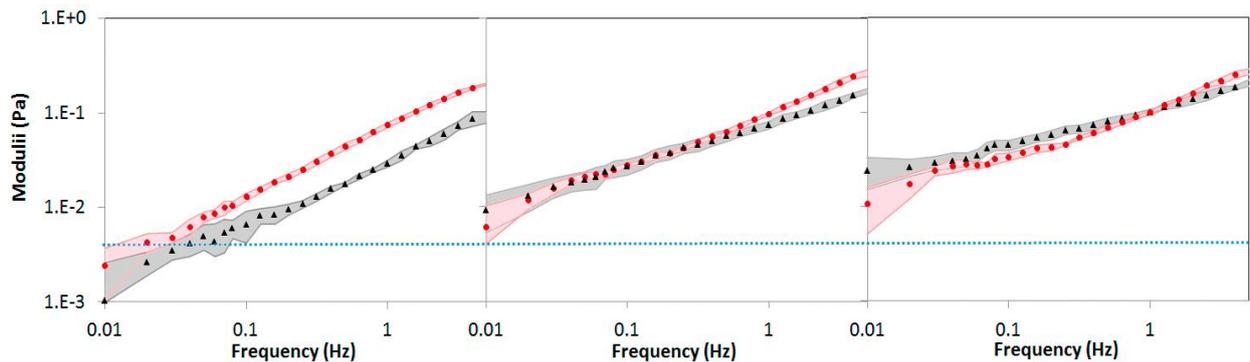
equal to  $1/f_{low}$ . An in depth discussion of this method can be found in [27]. The detailed rheometry tools and protocol are described in the supplementary material where we show that this method is able to capture the slow temporal evolution due to sedimentation. How to suppress the artifacts produced by protein denaturation and a demonstration of its efficiency is also discussed there.

Each measurement is repeated twice at a one minute interval to check for any temporal evolution. If no evolution is found (almost in all cases), the two results are validated. Experiments are performed for the three donors. The error bars are the standard deviation of the 6 experiments together.

### III. Results and discussion

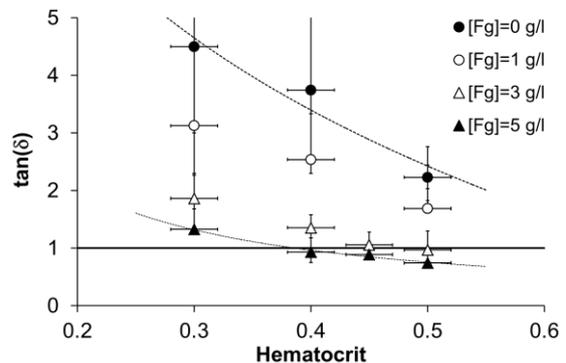
We first present experimental results at  $Ht=0.5$ , a rather elevated, but still in the normal range of hematocrits, while varying the fibrinogen concentration. We only observed minor variations in viscoelasticity when changing the albumin and IgG content (see section 5 of SM), variation that can be reduce to their effect on the total solid volume fraction. We choose to stay at  $[IgG]=0g/l$  to reduce costs and human products consumption. In all the following, the albumin and immunoglobulin concentrations are kept fixed at respectively  $30g/l$  and  $0g/l$ .

#### 1. sol-gel transition



**Fig. 1** Elastic (red) and viscous (black) moduli as a function of frequency at  $Ht=0.5$ . Left  $[Fg]=0g/l$ ; center  $[Fg]=3g/l$ ; right  $[Fg]=5g/l$ ; light red and grey shades are experimental error bars.

The frequency dependent viscoelastic moduli of model blood ( $Ht=0.5$ ;  $[Alb]=30g/l$ ) for  $[Fg]=0-5 g/l$  are presented in fig. 1. At low fibrinogen concentrations ( $[Fg]=0-1g/l$ ), the viscous moduli are about 5 times larger than the elastic moduli, meaning that blood is essentially viscous. When fibrinogen concentration is increased up to and above physiological levels ( $[Fg]=3-5g/l$ ), a very different picture is obtained. At  $[Fg]=3g/l$ , the elastic modulus is considerably larger than previously reported. Both moduli are equal on a large part of the frequency range. According to the well-known Winter and Chambon criterion ([28]) this superposition indicates a true sol-gel



**Fig. 2** Ratio of viscous to elastic moduli as a function of hematocrit and fibrinogen concentration.

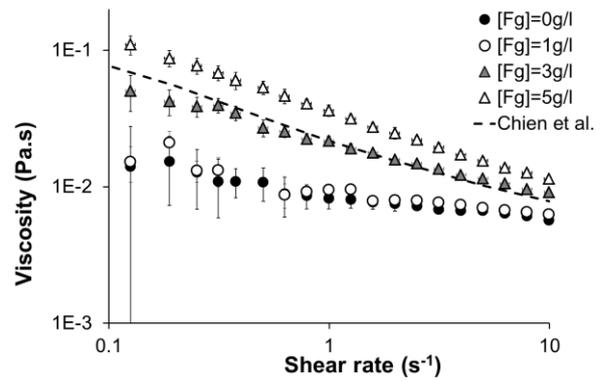
transition. This transition is confirmed at  $[Fg]=5g/l$  where the elastic modulus is 50% larger than the dissipation modulus from 0.01Hz to 1 Hz.

The same sol-gel transition is also observed when varying the hematocrit at fixed  $[Fg]$ . To better visualize the transition it is helpful to plot the ratio of the viscous to the elastic modulus,  $G''/G'=\tan(\delta)$  at a single, representative frequency (here 0.2Hz). When  $\tan(\delta)>1$ , the material is predominantly viscous while it is solid when  $\tan(\delta)<1$ . Figure 2 shows that a sol-gel transition exists as a function of both hematocrit and fibrinogen.

## 2. Viscosity

While the above plots extract much information from the data, linking them with existing measurements is not trivial. Indeed, as described in the introduction, most of the literature is concerned with the steady state viscosity and/or the existence of a yield stress.

To relate our linear viscoelastic measurements with viscosity ones, oscillatory viscoelastic spectra are transformed into viscosity curves using the empirical Cox-Merz (CM) rule. In practice, frequency is transformed into shear rate and viscoelastic moduli into viscosity. Figure 3 shows the CM viscosity for different  $[Fg]$  concentrations while the dashed line represents the shear viscosity measured by Chien et al. ([29]) using a Couette viscometer and averaged over 68 healthy donors. The curve obtained for a model blood with average human-like composition ( $[Fg]=3g/l$  and  $Ht=0.4$ ) is almost superimposed with the donor's average curve. The closeness of the two curves indicates that the CM rule is valid for blood and shows excellent agreement between our data and Chien's.



**Fig. 3** Viscosity for different  $[Fg]$  using the CM rule. Dashed line: Chien et al. data.[2]

## 3. RBC network fractal dimension

Blood sol-gel transition necessarily comes from the aggregation of RBCs which should form large scale structures at rest. Superposed elastic and viscous moduli are observed in Fig. 1 and several other  $[Ht,Fg]$  conditions show (see SM fig. S5). Furthermore, the moduli vary as a power law of exponent  $n$  of frequency ( $G'=G''\sim f^n$ ). While the superposition indicates the sol-gel transition, the exponent  $n$  is informative of the underlying geometrical structure of the aggregates. Applying Muthukumar's theory ([30], [31]), the fractal dimension of the embedded RBCs aggregates can be calculated:  $d_f = \frac{5}{2} \left( \frac{2n-3}{n-3} \right) = 2.08 \pm 0.04$  for all conditions. This value is in close agreement with the value deduced by Snabre and Mills [32] from their optical 2D measurement. Indeed their 2D fractal dimension ( $d_f^{2D} = 1.59 \pm 0.03$ ) is very close to the prediction from the Reaction Limited Aggregation model (RLA) in 2D while ours is very close to the 3D prediction ( $d_{fRLA}^{2D} = 1.55$  and  $d_{fRLA}^{3D} = 2.0$ ).

## 4. Phase diagram and sol-gel transition theory.

The above experimental results can be summarized in the phase diagram shown in fig. 5. Since depletion interaction studies have shown that the depletion energy is well predicted by standard models ([8], [11], [12]), the RBCs-fibrinogen suspension should behave similarly to colloid-polymer systems. This explains the origin of the sol-gel transition as several theories do predict entropy-driven sol-gel transitions in ideal hard spheres-polymers suspensions (see a comparison between the different theories in [33]). Better, simplified Mode Coupling theory (sMCT) or percolation theory (PcT) should give order-of-magnitude estimates of this sol-gel transition. To calculate the gelation transition boundary using both sMCT or PcT as exposed in [33], three main ingredients are needed: the asymmetry ratio of the colloids to the protein size, the critical overlap concentration for the “polymer” and obviously the volume fraction in colloids. While the volume fraction is well defined, the definition of the two other parameters is not straightforward as fibrinogen is not a polymer and RBCs are far from hard spheres. A detailed discussion of the choices for those parameters is proposed in the supplementary materials S.4. A surprisingly good agreement is obtained with sMCT theory as shown in fig. 5, while MCT theory was not far off. This agreement confirms that the sol-gel transition is the consequence of the depletion-driven aggregation of erythrocytes.

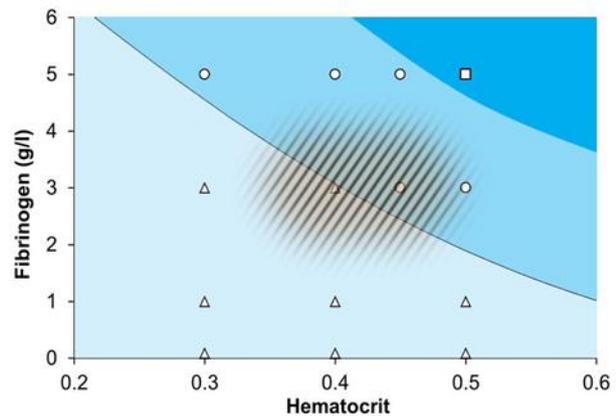


Fig. 5 Blood phase diagram as a function of hematocrit and fibrinogen. The line is the sol-gel prediction from percolation theory. The small ellipse

While this sol-gel transition may *a priori* seem surprising, it is actually coherent with existing literature. For instance, it is well known that in plasma, RBCs can be structured in networks of rouleaux, both under large oscillatory shear ([34], [35]) or at rest [32]. When structures span the entire space, a solid, elastic response is expected. The sol-gel transition therefore means that the existence of a yield stress depends not only on the hematocrit but rather on the combined effect of hematocrit and fibrinogen content, as well as, to a lesser extent, in the additional proteins such as albumin that modify the total solid volume fraction. In this framework, Picart et al. experimental results ([16]), in particular fig. 6, suggests strongly that there should indeed be a sol-gel transition at  $Ht \sim 0.45-0.5$  for healthy donors. Supposing that donors had a normal fibrinogen concentration ( $[Fg] \sim 2.5g/l$ ), we obtain another estimation of the sol-gel transition very close to the one determined here. In summary, as expected for a colloid-polymer suspension, blood is a liquid with no yield stress at low volume fractions or fibrinogen content, while in its gel phase it should present a yield stress, shedding new light on the yield stress debate.

#### IV. Conclusion.

A final, but very important observation is that the gelation transition (hatched zone in Fig. 5) sits at elevated values of hematocrit and  $[Fg]$ , but still within the normal range for humans. The presence of elasticity at high hematocrit and fibrinogen concentrations necessarily impacts the flow properties of blood. The question of how much and in what direction is completely open as it is known that elasticity can either enhance or decrease the flow rate depending on the detailed rheology and the

frequency of the pulsed flow ([36], [37]). Interestingly, the fact that both moduli are almost equal means that the main relaxation time is of the order of 1s.

In particular, pathological conditions where Ht and [Fg] are in the hatched zone or above, for example in Polycytema Vera or EPO sportive abuse associated with chronic inflammation, increased cardiovascular risk is expected because of the increasing the power demand on the heart. Another possible negative consequence of the sol gel transition is that even prior to clotting, a fibrinogen-RBCs network is already present in the plug, allowing thrombi to develop on an existing network, therefore potentially increasing the risk of thrombosis.

The method demonstrated here could be used as a new exploration approach of those pathological conditions, as well as help defining new therapeutic targets.

## V. Bibliography

- [1] A. M. Benis and J. Lacoste, "Study of erythrocyte aggregation by blood viscometry at low shear rates using a balance method," *Circ. Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 29–42, 1968.
- [2] I. Chien, S., Usami, S., Taylor, HM., Lundberg, JL., Gregersen, "Effect of hematocrit and plasma proteins on human blood rheology at low shear rates," *J. Appl. Physiol.*, vol. 21, pp. 81–87, 1966.
- [3] S. E. Charm and G. S. Kurland, "Static Method for determining Blood Yield Stress," *Nature*, vol. 216, no. 5120, pp. 1121–1123, 1967.
- [4] E. W. Merrill, E. R. Gilliland, G. Cokelet, H. Shin, A. Britten, and R. E. Wells, "Rheology of Human Blood, near and at Zero Flow," *Biophys. J.*, vol. 3, no. 3, pp. 199–213, 1963.
- [5] E. W. Merrill, A. M. Benis, E. R. Gilliland, T. K. Sherwood, and E. W. Salzman, "Pressure-flow relations of human blood in hollow fibers at low flow rates," *J. Appl. Physiol.*, vol. 20, no. 5, pp. 954–967, 1965.
- [6] R. Wells and E. Merrill, "Shear rate dependence of the viscosity of whole blood and plasma," *Science (80-. )*, vol. Vol. 133, no. 3455, pp. 763–764, 1961.
- [7] H. J. Meiselman, "Red blood cell aggregation: 45 years being curious.," *Biorheology*, vol. 46, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2009.
- [8] B. Neu and H. Meiselman, "Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions," *Biophys. J.*, vol. 83, no. November, pp. 2482–2490, 2002.
- [9] B. Neu and H. Meiselman, "Depletion interactions in polymer solutions promote red blood cell adhesion to albumin-coated surfaces," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General ...*, vol. 1760, pp. 1772–1779, 2006.
- [10] J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman, and T. C. Fisher, "The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation.," *Biophys. J.*, vol. 87, no. 6, pp. 4259–70, Dec. 2004.

- [11] P. Steffen, C. Verdier, and C. Wagner, "Quantification of Depletion-Induced Adhesion of Red Blood Cells," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 110, no. 1, p. 018102, 2013.
- [12] M. Brust, O. Aouane, M. Thiébaud, D. Flormann, C. Verdier, L. Kaestner, M. W. Laschke, H. Selmi, a Benyoussef, T. Podgorski, G. Coupier, C. Misbah, and C. Wagner, "The plasma protein fibrinogen stabilizes clusters of red blood cells in microcapillary flows.," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 4348, Jan. 2014.
- [13] M. W. Rampling, H. J. Meiselman, B. Neu, and O. K. Baskurt, "Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation.," *Biorheology*, vol. 41, no. 2, pp. 91–112, Jan. 2004.
- [14] E. Merrill, E. Gilliland, G. Cokelet, and H. Shin, "Rheology of human blood, near and at zero flow: effects of temperature and hematocrit level," *Biophys. J.*, 1963.
- [15] W. Merrill, "Rheology of Blood," *Physiol. Rev.*, vol. 49, no. 4, 1969.
- [16] C. Picart, J. Piau, H. Galliard, and P. Carpentier, "Human blood shear yield stress and its hematocrit dependence," *J. Rheol. (N. Y. N. Y.)*, no. February, pp. 1–12, 1998.
- [17] C. Picart, P. H. Carpentier, H. Galliard, and J. M. Piau, "Blood yield stress in systemic sclerosis.," *Am. J. Physiol.*, vol. 276, no. 2 Pt 2, pp. H771–7, Feb. 1999.
- [18] J. Dufaux, D. Quemada, and P. Mills, "Determination of rheological properties of red blood cells by Couette viscometry," *Rev. Phys. appliquée*, vol. 15, pp. 1367–1374, 1980.
- [19] G. B. Thurston, "Viscoelasticity of human blood.," *Biophys. J.*, vol. 12, no. 9, pp. 1205–17, Sep. 1972.
- [20] G. B. Thurston, "Frequency and shear rate dependence of viscoelasticity of human blood.," *Biorheology*, vol. 10, no. 3, Sep. 1973.
- [21] G. B. Thurston, "The viscosity and viscoelasticity of blood in small diameter tubes," *Microvasc. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 133–146, 1976.
- [22] S. Roman, S. Lorthois, P. Duru, and F. Risso, "Velocimetry of red blood cells in microvessels by the dual-slit method: effect of velocity gradients.," *Microvasc. Res.*, vol. 84, no. 3, pp. 249–61, Nov. 2012.
- [23] A. Fall, H. de Cagny, D. Bonn, G. Ovarlez, E. Wandersman, J. a. Dijksman, and M. van Hecke, "Rheology of sedimenting particle pastes," *J. Rheol. (N. Y. N. Y.)*, vol. 57, no. 4, p. 1237, 2013.
- [24] V. Sharma, A. Jaishankar, Y.-C. Wang, and G. H. McKinley, "Rheology of globular proteins: apparent yield stress, high shear rate viscosity and interfacial viscoelasticity of bovine serum albumin solutions," *Soft Matter*, vol. 7, no. 11, p. 5150, 2011.
- [25] O. K. Baskurt, M. Uyklu, P. Ulker, M. Cengiz, N. Nemeth, T. Alexy, S. Shin, M. R. Hardeman, and H. J. Meiselman, "Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation.," *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, vol. 43, no. 4, pp. 283–98, Jan. 2009.
- [26] A. R. Mackie, A. P. Gunning, P. J. Wilde, and V. J. Morris, "Orogenic Displacement of Protein from the Air / Water Interface by Competitive Adsorption," vol. 166, pp. 157–166, 1999.

- [27] L. a Pugnali, E. Dickinson, R. Ettelaie, A. R. Mackie, and P. J. Wilde, "Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 107, no. 1, pp. 27–49, Jan. 2004.
- [28] H. H. Winter and F. Chambon, "Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point," vol. 30, no. 2, pp. 367–382, 1986.
- [29] S. Chien, "Shear dependence of effective cell volume as a determinant of blood viscosity.," *Science (80-. )*, vol. 168, no. 3934, pp. 977–9, 1970.
- [30] M. Muthukumar, "Dynamics of polymeric fractals," *J. Chem. Phys.*, vol. 83, no. 6, pp. 3161–3168, 1985.
- [31] M. Muthukumar, "Screening effect on viscoelasticity near the gel point," *Macromolecules*, vol. 22, no. 12, pp. 4656–4658, Dec. 1989.
- [32] P. Snabre and P. Mills, "I. Rheology of weakly flocculated suspensions of rigid particles," *J. Phys. III*, vol. 6, pp. 1811–1834, 1996.
- [33] S. Ramakrishnan, M. Fuchs, K. S. Schweizer, and C. F. Zukoski, "Entropy driven phase transitions in colloid–polymer suspensions: Tests of depletion theories," *J. Chem. Phys.*, vol. 116, no. 5, p. 2201, 2002.
- [34] S. Chien, R. King, R. Skalak, S. Usami, and A. Copley, "Viscoelastic properties of human blood and red cell suspensions.," *Biorheology*, 1975.
- [35] A. Copley, R. King, S. Chien, and S. Usami, "Microscopic observations of viscoelasticity of human blood in steady and oscillatory shear.," *Biorheology*, vol. 12, no. 5, pp. 257–263, 1975.
- [36] L. Casanellas and J. Ortín, "Experiments on the laminar oscillatory flow of wormlike micellar solutions," *Rheol. Acta*, vol. 51, no. 6, pp. 545–557, Mar. 2012.
- [37] E. E. Herrera, F. Calderas, a. E. Chávez, and O. Manero, "Study on the pulsating flow of a worm-like micellar solution," *J. Nonnewton. Fluid Mech.*, vol. 165, no. 3–4, pp. 174–183, Feb. 2010.

## VI. Supplementary Materials

### 1. Rheometry methods and materials

#### ▪ Optimal Fourier Rheometry

Optimal Fourier Rheometry (OFR) is a new oscillatory rheometry method aimed at optimizing the time necessary to perform a spectral measurement of the viscoelastic moduli. In short, for a given a low frequency  $f_{low}$  usual discrete sinus methods take about  $10/f_{low}$  to  $50/f_{low}$ . In contrast the OFR, which is a continuous, exponential modulation of frequency, takes exactly  $1/f_{low}$ . Furthermore, it can be shown that it is also optimal in signal to noise ratio.

#### ▪ Instrument and geometry

The measurement setup is composed of a TA instruments ARES-G2 rheometer equipped with a double wall concentric cylinder geometry (cup: inner diameter: 27.729 mm, outer diameter: 33.997 mm; bob: inner diameter: 29.395 mm, outer diameter: 32.078 mm; height: 51.557 mm). Temperature is maintained at  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  thanks to a Peltier element.

#### ▪ Protocol

Just before an experiment, the blood sample is brought to  $37^\circ\text{C}$  in a water bath. Then it is injected in the geometry using a syringe, and a drop of oil is deposited on the free surface. Absence of hemolysis due to the injection was checked by photometry. The suspension is then sheared at  $100\text{s}^{-1}$  during 60s to break eventual aggregates (?mention état reference)?. The sample is left at rest for another 60s. Then the exponential frequency sweep is performed. The low, high frequency and acquisition time are respectively 0.01Hz, 10Hz, 100s. For all experiments the deformation is 4% and the sampling frequency 150Hz.

### 2. inertia corrections

In oscillatory rheometry, the fluid is submitted to periodic accelerations. For low viscosity fluids this tends to increase the storage modulus  $G'$  and decrease the loss modulus  $G''$  in the high frequency zone. . In other words, even a perfectly Newtonian fluid seems to exhibit the rheological behavior of a viscoelastic fluid. Following Böhme [28], the apparent measured complex modulus  $G_a^*$  is:

$$G_a^* = i \omega \eta^* \frac{\left(\frac{i \rho \omega s^2}{\eta^*}\right)^{\frac{1}{2}}}{sh\left(\left(\frac{i \rho \omega s^2}{\eta^*}\right)^{\frac{1}{2}}\right)}$$

$\omega$ ,  $\rho s$  and  $\eta^*$  are respectively the phase of the applied strain, the density of the material, the gap of the measurement setup and the true complex viscosity of the material. The raw data were corrected by the inversion of the Taylor series expansion of the above relation. An average of the first (that under-corrects the data) and second order (that over-corrects the data) expansion was used. This correction performs better than the inversion of the third order expansion, and is much simpler.

The Optimal Fourier Rheometry technique and fluid inertia correction are checked on a 3.3mPa.s Newtonian oil, using a 500 $\mu$ m double wall concentric cylinder geometry. Without the inertia correction, Fig S1.a shows that the storage modulus is an increasing function of the frequency, and is larger than the loss modulus above 10Hz. When applying the fluid inertia correction (fig. S1b), the expected loss modulus is recovered perfectly. The elastic modulus stays below the sensitivity threshold of our setup.

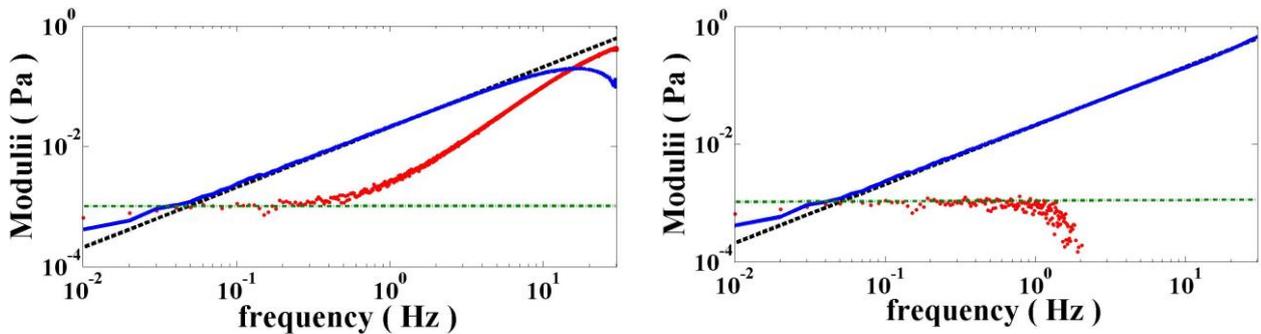


Figure S1 a) Apparent elastic modulus (blue line), viscous modulus (red line) and theoretical viscous modulus (black dashed line). b) Inertia corrected elastic modulus (blue line), viscous modulus (red line) and theoretical viscous modulus (black dashed line) 3.3mPa.s Newtonian oil, 500  $\mu$ m gap double wall concentric cylinder Horizontal dashed line: sensitivity limit of the system.

### 3. Validation of the experimental methods

#### ▪ Temporal evolution of the moduli

Since blood may sediment we checked the existence a slow temporal evolution of its mechanical properties. Figure 3 shows a clear evolution of the viscoelastic moduli for  $H=0.4$  and  $[fg]=3g/l$ , on a time scale which is in very good agreement with Brust et al. [12].

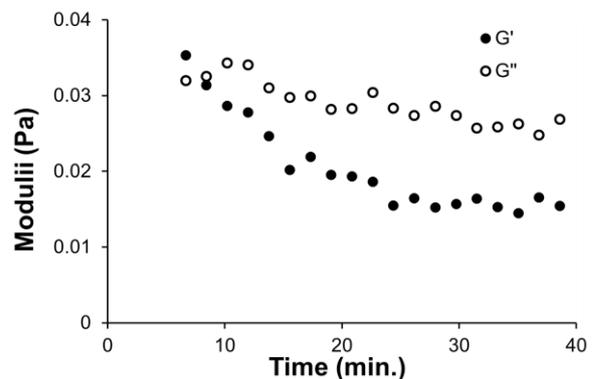


Figure S2 Temporal evolution of viscoelastic moduli For  $Ht=0.4$ ,  $[Fg]=3g/l$ .

#### ▪ Effect of tween 20 on the rheology of blood.

As discussed above, proteins migrate to interfaces and are in competition with each other to adsorb on those interfaces, in particular liquid-air interfaces [competition  $Fg/Alb$ ]. To avoid this effect, common sense is to add an oil droplet on the free surface (water-air interface). To test whether this is sufficient to inhibit protein adsorption, Tween 20 (Sigma Aldrich) was added to the solutions. Without fibrinogen the elastic modulus of RBCs with 30g/l albumin shows (Fig. S3 a) the expected low frequency plateau (Sharma 2012) which is absent in the presence of tween. This surfactant effect has been previously described in but never used in the study of blood's rheology. As expected from the relative affinity of fibrinogen and albumin to interfaces [], the same effect is observed in the presence of fibrinogen (Fig. S3 b).

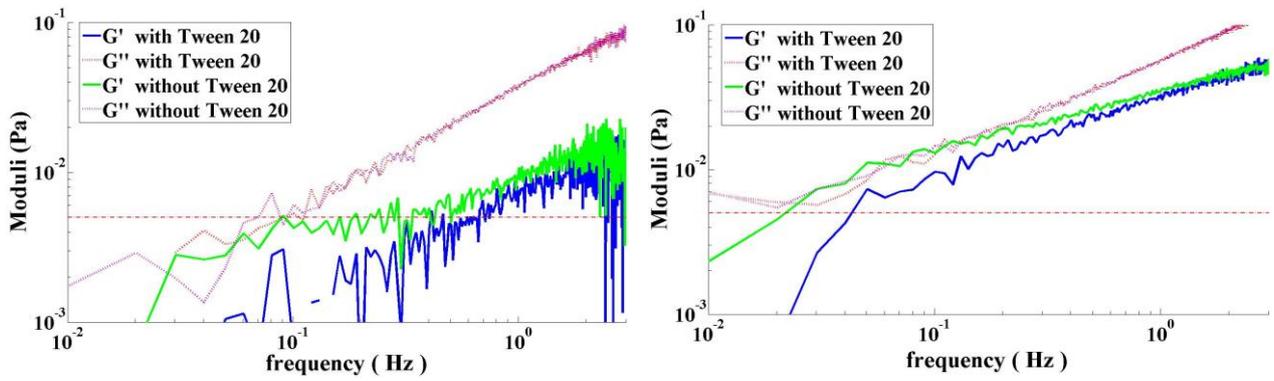


Figure S3 Left) Viscoelastic moduli of two RBCs suspensions at  $[Fg]=0g/l$ , and  $Ht=0.4$ , with and without Tween20. Right) Viscoelastic moduli of two RBCs suspensions at  $[Fg]=3g/l$ ,  $Ht=0.4$ , with and without Tween20. In both case, the elastic modulus is significantly overestimated. Without Tween20, the curves would be interpreted as the beginning of gelation.

#### ▪ Linear viscoelastic regime

The viscoelastic measurements are performed in the linear regime, i.e. in the regime where the moduli do not depend on the deformation. Fig. 5 shows an example of the determination of linear domain for  $[Fg]=3g/l$  and  $H=0.3$ . Similar curves were obtained at the different hematocrits. While the linear domain seems to extend up to 10% in strain, all the experiments presented below were performed at 4% strain.

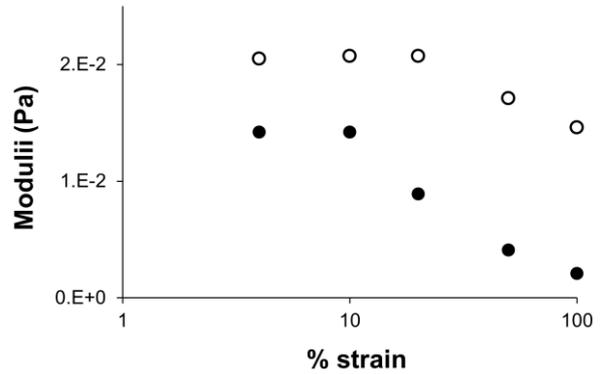


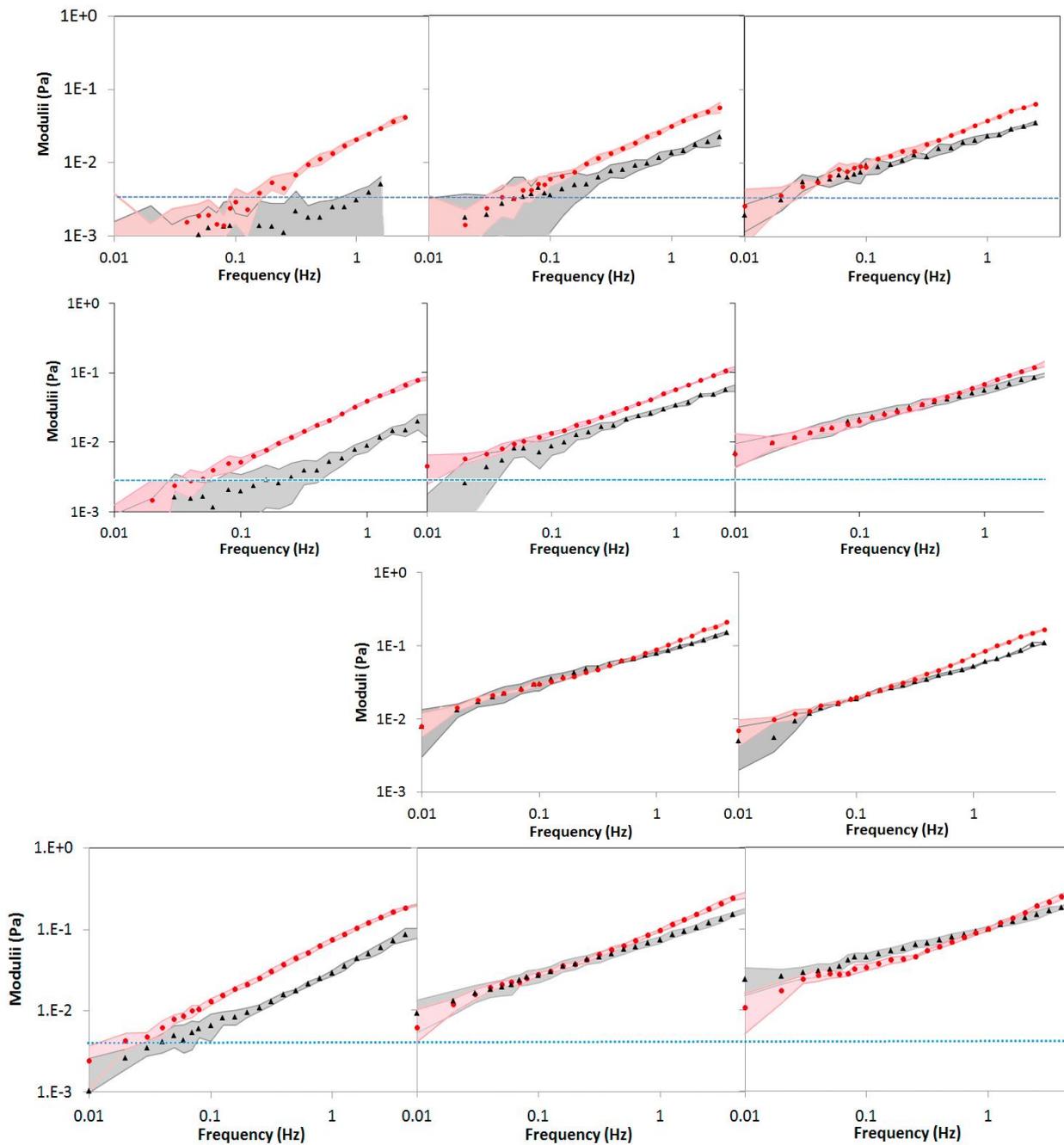
Figure S4 Evolution of viscoelastic moduli vs strain for  $Ht=0.4$ ,  $[Fg]=3g/l$ .

#### 4. Parameters for the sol gel transition model

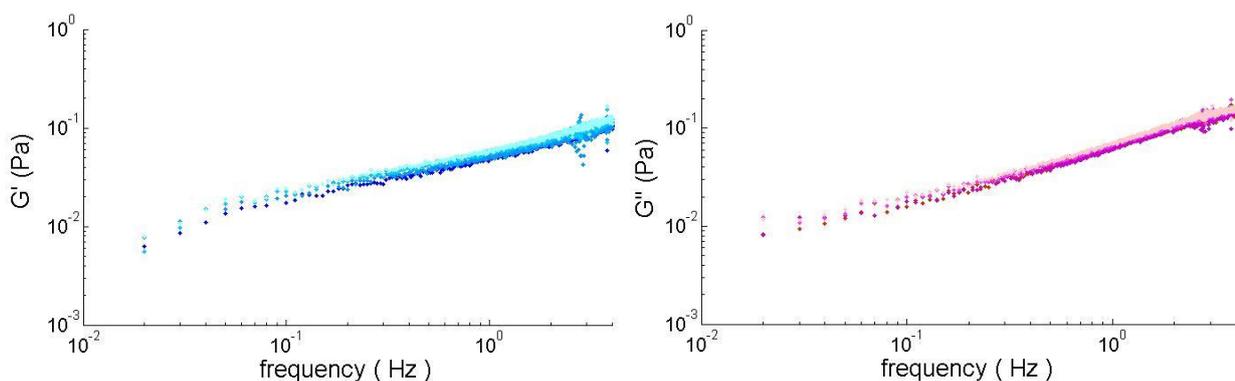
Since fibrinogen is excluded from the top and bottom surfaces of the RBCs when aggregated, the dimension of the RBCs was chosen as their largest dimension ( $d \sim 7.5 \mu m$ ). A gyration radius of 14nm [32] has recently been measured for fibrinogen, giving an asymmetry ratio much smaller than one ( $Rg/d = 0.002$ ). As for the critical overlap concentration, no measurement exists for fibrinogen, and one cannot choose arbitrarily between the many existing formulas (e.g. [33]) as they give predictions differing by a factor of 10 at least. Alternatively, one may deduce the overlapping concentration from the volume of the fibrinogen molecule in dilute conditions simply by stating that at the dilute semi-dilute transition, the molecules are in average at the random packing volume fraction  $\phi_0=0.64$ . So, the overlapping concentration is simply  $c^*=0.64 * M_w / (V_{Fb} N_A)$ . Recent hydrodynamic measurement and simulations obtained a molecular volume of  $470 nm^3$  ([34]), from which  $c^*=0.78 kg/l$  is obtained. While this value may seem high, it is similar to that obtained using a wormlike chain model, and 3 times smaller than using the random coil formula.

#### 5. Further experimental results.

We provide in figure S5 all the graphs that were obtained during the systematic screening of  $Ht$  and  $[Fg]$  at  $[Alb]=30g/l$  to determine the phase diagram. Finally, we show an exploration of the effect of albumin on the viscoelasticity of blood for  $[Ht]=0.5$ ,  $[Fg]=5g/l$ . One can clearly see the small effect of albumin. Essentially identical results were obtained at a few other  $Ht$  and  $[Fg]$ , with or without IgG.



**Fig. S5** Elastic (red) and viscous (black) moduli as a function of frequency. From top to bottom,  $Ht=0.3;0.4;0.45;0.5$ . From Left to right  $[Fg]=0;3;5$  g/l. Light red and grey shades are experimental error bars.



**Fig. S6.** Elastic modulus (left) and dissipation modulus (right) as a function of albumin concentration. There is a slight increase corresponding to the increase of solid volume fraction.

## **Cinquième partie .**

### **Vers le suivi des propriétés mécaniques du caillot en formation**



# Table des matières

---

<b>5. Vers le suivi de la coagulation</b>	<b>143</b>
5.1. Introduction . . . . .	143
5.1.1. L'hémostase . . . . .	143
5.1.2. Le fibrinogène . . . . .	143
5.1.3. Processus de formation du caillot . . . . .	144
5.1.4. Suivi mécanique de la formation du caillot sanguin . . . . .	145
5.2. Matériaux et méthodes . . . . .	147
5.3. Suivi mécanique de l'évolution du caillot sanguin au cours de sa formation . . . . .	148
5.3.1. Activation par voie de contact . . . . .	148
5.3.2. Activation par adjonction de facteur tissulaire . . . . .	151

---



# 5. Vers le suivi de la coagulation

## 5.1. Introduction

### 5.1.1. L'hémostase

Le rôle physiologique de l'hémostase est de maintenir l'intégrité d'un vaisseau lors d'une agression vasculaire. C'est un processus qui conduit à terme à la formation d'un caillot composé de plaquettes agrégées et de fibrine polymérisée qui enserre les éléments figurés du sang. Il est activé par une lésion de la monocouche endothéliale vasculaire ou par la mise en contact du sang avec le sous-endothélium s'il y a rupture de l'intégrité vasculaire. À l'état normal, en revanche, les cellules épithéliales ont des propriétés antithrombotiques.

Le processus hémostatique se divise en plusieurs étapes :

- Une constriction du vaisseau sanguin lésé, qui dure entre 15 et 60 s. Elle a pour fonction de ralentir la circulation sanguine, ceci permettant à la fois de ralentir l'épanchement sanguin, et de maximiser l'efficacité des étapes suivantes de l'hémostase.
- L'hémostase primaire : les plaquettes se lient au collagène des parois vasculaires et se lient entre elles pour former un agrégat, le clou plaquettaire de Hayem. C'est la première étape d'arrêt du saignement.
- L'hémostase secondaire, ou coagulation, implique une cascade complexe de facteurs de coagulation initiée par la libération de facteur tissulaire. Elle aboutit à la génération de thrombine. La thrombine active ensuite le fibrinogène en fibrine. Les monomères de fibrine vont polymériser en un réseau enserrant les éléments figurés du sang, appelé caillot sanguin.
- La dernière étape est la fibrinolyse. Elle permet la dissolution du caillot par la plasmine.

### 5.1.2. Le fibrinogène

Le fibrinogène est une protéine sanguine présente abondamment dans le plasma (voir section 2.3.1.2). Il a été mis en évidence par des méthodes de diffraction de rayons X aux petits angles [Bailey *et al.*, 1943] et par des méthodes hydrodynamiques (mesures de mobilité électrophorétique, de coefficients de sédimentation et de diffusion) [Laskowski *et al.*, 1956] [Mihalyi, 1954] [Shulman et Ferry, 1950] que le

## 5. Vers le suivi de la coagulation

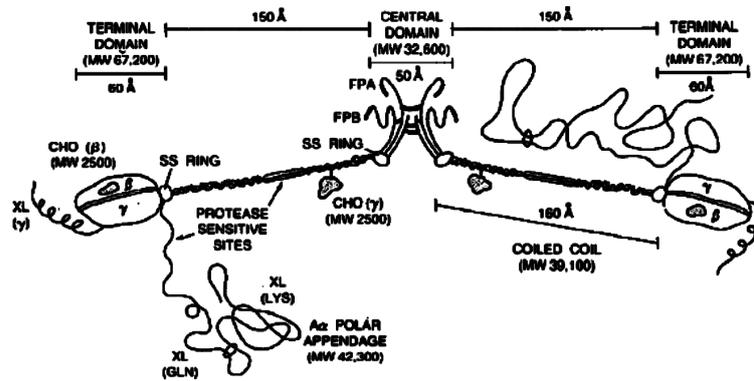


Figure 5.1.: Représentation schématique de la molécule de fibrinogène (d'après [Doolittle, 1984])

fibrinogène est une molécule trinodulaire en forme d'ellipsoïde de révolution allongée, centrosymétrique, de longueur entre 45 [Freyssinet *et al.*, 1983] [Torbet *et al.*, 1981] et 47.5 nm et de diamètre 4.5 nm. A l'extrémité de la molécule se trouvent deux domaines D de diamètre 6 nm et au centre un domaine E de diamètre 5 nm. Il a été possible d'isoler trois paires de chaînes peptidiques différentes par électrophorèse : les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  [Henschen, 1964]. La masse molaire du fibrinogène de 340 kDa a pu être établie de façon sûre en déterminant la séquence des acides aminés constituant les chaînes [Doolittle *et al.*, 1979] [Lottspeich et Henschen, 1977], ce qui est en accord avec des mesures précédentes. Il a également été possible ainsi de mettre à jour l'existence sur le domaine E d'un fibrinopeptide clivable sur chaque extrémité N-terminale des chaînes  $\alpha$  (fibrinopeptide A) et  $\beta$  (fibrinopeptide B).

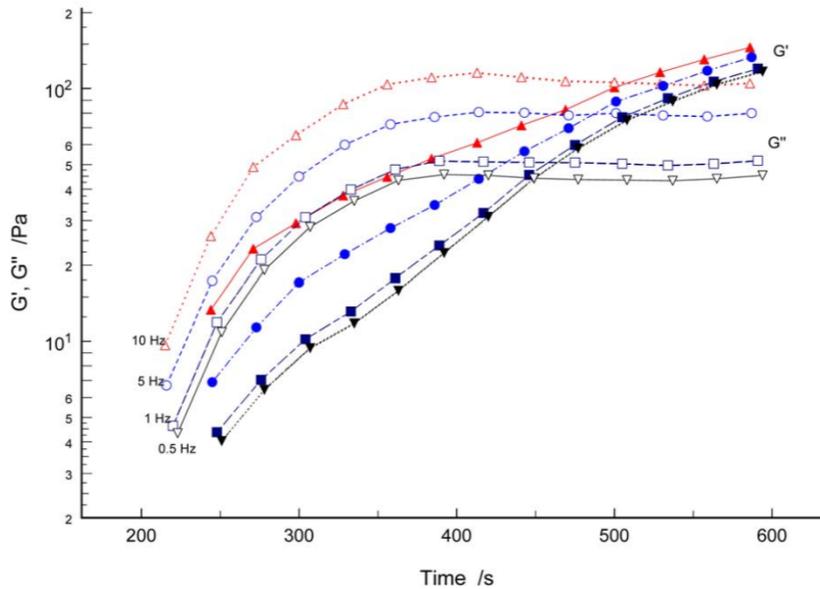
Une représentation schématique de la molécule de fibrinogène est donnée dans la figure 5.1.

### 5.1.3. Processus de formation du caillot

Le clivage des fibrinopeptides A par la thrombine marque le passage du fibrinogène à la fibrine. Cet événement initie l'assemblage des monomères de fibrine entre eux, en exposant un site de polymérisation appelé  $E_A$  [Laudano et Doolittle, 1978] [Siebenlist *et al.*, 1990].

Le site  $E_A$  se combine avec une poche complémentaire appelée  $D_A$  située sur le domaine D d'une molécule voisine [Everse *et al.*, 1998] [Pratt *et al.*, 1997] [Yee *et al.*, 1997]. L'association entre les sites  $E_A$  et  $D_A$  entraîne l'appariement et l'alignement des molécules de fibrine en hémichevauchement pour former les protofibrilles [Ferry, 1952] [Fowler *et al.*, 1981]. Les protofibrilles présentent donc une périodicité structurale d'environ 23 nm [Hall, 1949] [Porter et Hawn, 1949], et sont flexibles.

Le clivage du fibrinopeptide B par la thrombine, plus lent que celui du fibrinopeptide A [Scheraga et Laskowski, 1957] [Blomback *et al.*, 1978] [Janmey, 1982], expose



**Figure 5.2.:** Modules viscoélastiques obtenu par FTMS en fonction du temps pour différentes fréquences lors de la prise d'un caillot de sang total. D'après [Williams *et al.*, 2006]

le site de polymérisation  $E_B$  situé sur la chaîne  $\beta$  [Shainoff et Dardik, 1983] [Laudano et Doolittle, 1978] qui va alors interagir avec avec le site complémentaire  $Db$  se trouvant sur le segment de chaîne  $\beta$  du domaine D [Shainoff et Dardik, 1983] [Medved *et al.*, 1993].

Par la suite, les protofibrilles s'agrègent latéralement pour former des fibres [Moesson *et al.*, 1989] [Hewat *et al.*, 1983]. Ces fibres sont épaisses ou fines, en fonction du pH et de la force ionique du solvant.

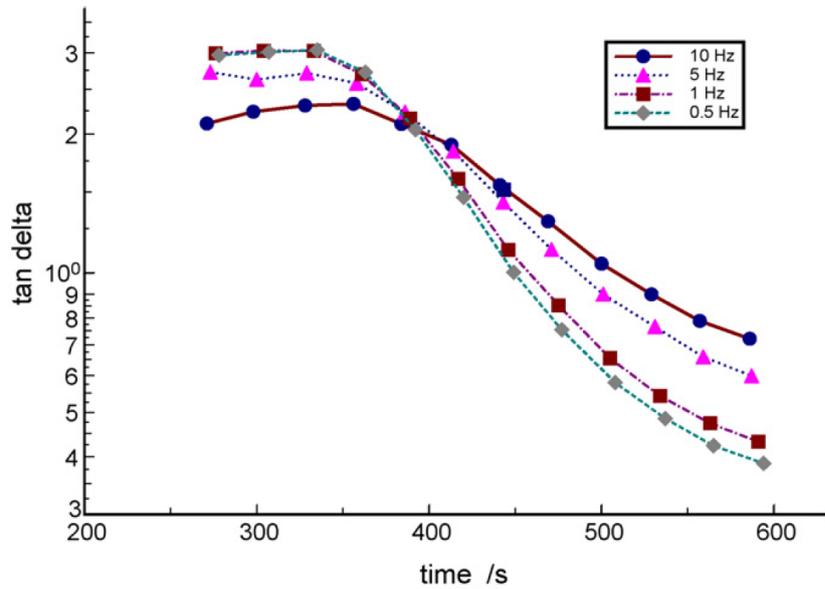
#### 5.1.4. Suivi mécanique de la formation du caillot sanguin

En 2006, Evans *et al.* ont réalisé un état de l'art de l'étude des propriétés viscoélastiques du caillot en formation [Evans *et al.*, 2006]. Dans cette publication, ils ont souligné la nécessité de mettre en place un critère ne se basant sur aucun paramètre arbitraire pour définir le point de gel du matériau. D'après eux, le critère de Chambon et Winter ( $G' \propto G'' \propto \omega^n$ ) est bien adapté pour cela.

Dans un article complémentaire, ils ont utilisé la FTMS (voir section 1.2.2.4.1) pour suivre l'évolution mécanique d'échantillons de sang total en train de coaguler [Williams *et al.*, 2006]. Dans la figure 5.2 sont représentés les modules viscoélastiques  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps pour différentes fréquences.

Il apparait clairement que les modules viscoélastiques se croisent à des temps distincts à différentes fréquences. À  $0,5 \text{ Hz}$ , le croisement des modules viscoélastiques a lieu à environ  $450 \text{ s}$ , tandis qu'à  $10 \text{ Hz}$ , il a lieu à  $510 \text{ s}$ , soit à plus de  $60 \text{ s}$

## 5. Vers le suivi de la coagulation



**Figure 5.3.:**  $\tan(\delta)$  obtenu par FTMS en fonction du temps pour différentes fréquences lors de la prise d'un caillot de sang total. D'après [Evans *et al.*, 2008b]

d'écart alors que la résolution temporelle de leur méthode de mesure est d'environ 30 s. En 2008, Evans *et al.* ont également utilisé la FTMS pour suivre la coagulation sanguine [Evans *et al.*, 2008b] [Evans *et al.*, 2008a]. Dans la figure 5.3 est représenté  $\tan(\delta)$  pour les différentes fréquences en fonction du temps.

D'après eux, il existe un temps pour lequel  $\tan(\delta)$  a la même valeur quelle que soit la fréquence (à environ 390 s sur la figure 5.3). Ils concluent que la coagulation passe par un point de gel en s'appuyant sur le critère de Winter et Chambon (voir section 3.3). Pourtant, en regardant plus attentivement, il apparaît que les valeurs de  $\tan(\delta)$  pour 0, 5 et 1 Hz sont égales à environ 370 s, et pour 5 et 10 Hz à environ 410 s, soit à plus de 40 s d'écart. Mais leur résolution temporelle étant d'environ 30 s, elle ne leur permet pas d'être suffisamment précis sur ce point.

En 2010, ils utilisent la FTMS pour suivre la coagulation de sang total, et de sang total dans lequel ils ajoutent un petit volume d'héparine [Evans *et al.*, 2010a]. À partir de ces données, ils calculent la dimension fractale du caillot final de la même façon que dans la section 3.3. Pour les caillots de sang total, ils trouvent une dimension fractale moyenne de 1,74. Pour les caillots de sang total avec ajout d'héparine, ils trouvent une dimension fractale moyenne de 1,69 en présence de 0,52 U/ml d'héparine, et 1,58 en présence de 0,76 U/ml d'héparine. Ceci est curieux puisque le sang total est un système déjà très encombré qui devrait être au minimum au delà de la dimension fractale de percolation (2,05).

En 2010 toujours, ils poursuivent le travail précédent en proposant une méthode numérique automatisée permettant selon eux d'obtenir le point de gel de caillots

de sang total [Evans *et al.*, 2010b]. Ils proposent d'appliquer cette méthode pour l'étude systématique des effets de l'héparine sur la coagulation.

## 5.2. Matériaux et méthodes

Le sang utilisé pour ces mesures est collecté par ponction veineuse sur des volontaires sains, dans des tubes de 5 *ml* de type vacutainer pour tests de coagulation (contenant 0,5 *ml* de citrate de sodium et acide citrique à 0,109 *M*). Ces tubes sont stockés à 4°C en attendant la mesure, qui a lieu dans les 4 heures suivant le prélèvement. Le sang est amené à 37°C dans un bain-marie juste avant la mesure, qui est ensuite réalisée à cette température.

Le rhéomètre utilisé est un Ares-G2, muni d'une géométrie de type cylindres coaxiaux de diamètre 32 *mm* en acier inoxydable et titane.

Pour les mesures réalisées lors d'une coagulation activée par voie de contact, 9,89 *ml* de sang citraté sont mélangés à 0,11 *ml* de solution de  $CaCl_2$  à 1 *M* par agitation manuelle, puis immédiatement injecté à l'aide d'une seringue dans l'entrefer du rhéomètre amené à une température de 37°C. Une goutte d'huile de faible viscosité est immédiatement déposée à l'interface pour prévenir à la fois l'évaporation et la formation d'une croûte dans la zone en contact avec l'air. Le sang de deux volontaires a été utilisé pour réaliser cette partie de l'étude.

Pour les mesures réalisées lors d'une coagulation activée par du facteur tissulaire, 9,8 *ml* de sang citraté sont mélangés à 0,1 *ml* de solution de  $CaCl_2$  à 1 *M* et 0,1 *ml* de solution de facteur tissulaire à 200 *pM* préparée à partir d'Innovin (Siemens Healthcare Diagnostics, Allemagne) par agitation manuelle, puis immédiatement injecté dans l'entrefer du rhéomètre à température, en utilisant une seringue. Pour les mêmes raisons que précédemment, une goutte d'huile de faible viscosité est immédiatement déposée à l'interface sang-air. Le sang d'un volontaire a été utilisé pour cette partie de l'étude.

Lors de la création d'une procédure de mesure, il nous est apparu que la version du logiciel de contrôle du rhéomètre était incapable d'appliquer plus d'environ une soixantaine d'oscillations via la procédure « arbitrary waveform » sans engendrer un blocage. Par conséquent, la procédure de mesure utilisée pour les caillots activés par voie de contact est construite comme suit :

- 60 oscillations OFR consécutives de 0,1 à 30 *Hz* pendant 10 *s*, avec 2 *s* de pause entre deux oscillations,
- Quelques secondes de pause le temps de lancer manuellement la procédure suivante,
- 55 oscillations OFR consécutives de 0,1 à 30 *Hz* pendant 10 *s*, avec 70 *s* de pause entre deux oscillations.

De même, la procédure de mesure utilisée pour les caillots activés par du facteur tissulaire est construite comme suit :

## 5. Vers le suivi de la coagulation

- 69 oscillations OFR consécutives de 0,1 à 30  $Hz$  pendant 10  $s$ , avec 2  $s$  de pause entre deux oscillations,
- Quelques secondes de pause le temps de lancer la procédure suivante,
- 40 oscillations OFR consécutives de 0,1 à 30  $Hz$  pendant 10  $s$ , avec 90  $s$  de pause entre deux oscillations.

## 5.3. Suivi mécanique de l'évolution du caillot sanguin au cours de sa formation

### 5.3.1. Activation par voie de contact

L'activation par voie de contact, ou voie endogène, ne nécessite pas l'ajout de réactifs dans le sang total. C'est le contact du sang avec une surface chargée négativement qui va enclencher le processus de coagulation. C'est par la neutralisation du citrate à l'aide de calcium que l'on initie la coagulation par ce processus dans du sang prélevé dans des tubes pour coagulation. Ce mécanisme de coagulation débute par l'activation via changement de conformation d'un des facteurs de la coagulation (le facteur XII), qui lui même va ensuite provoquer une cascade d'activations enzymatiques, dont l'aboutissement est la production de thrombine.

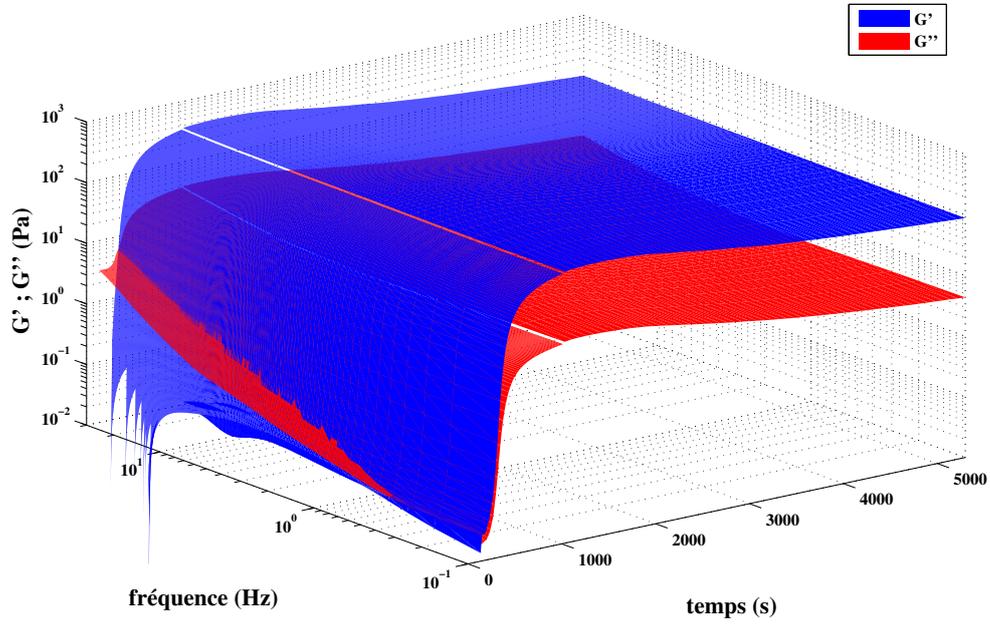
Dans le cas présent, la coagulation est activée par l'intermédiaire du contact avec la géométrie de mesure.

Les phases présentes lors d'une mesure de thromboélastographie sont également observables par le biais des mesures par OFR (voir figures 5.4 et 5.7). Dans un premier temps, entre le début de la mesure et environ quelques dizaines de secondes, les modules viscoélastiques sont comparables à ceux observés sur du sang total (voir chapitre 4). L'état initial du matériau, qui est lié à la variabilité entre individus au niveau des concentrations plasmatiques en protéines, et des protéines de surface des globules rouges, varie en fonction de l'individu. Par exemple, sur la figure 5.4, on constate que dès l'état initial pour l'individu A, il existe une bande de fréquences pour laquelle le module élastique  $G'$  est supérieur au module visqueux. Pour l'individu B (voir figure 5.7), dans l'état initial, le module visqueux  $G''$  est supérieur au module élastique  $G'$  sur toute la gamme de fréquences explorée. Dans cette phase, la chute observée sur le module élastique est un artéfact de mesure lié à l'inertie du fluide (voir section 3.4.1). Cela n'a pas de signification physique.

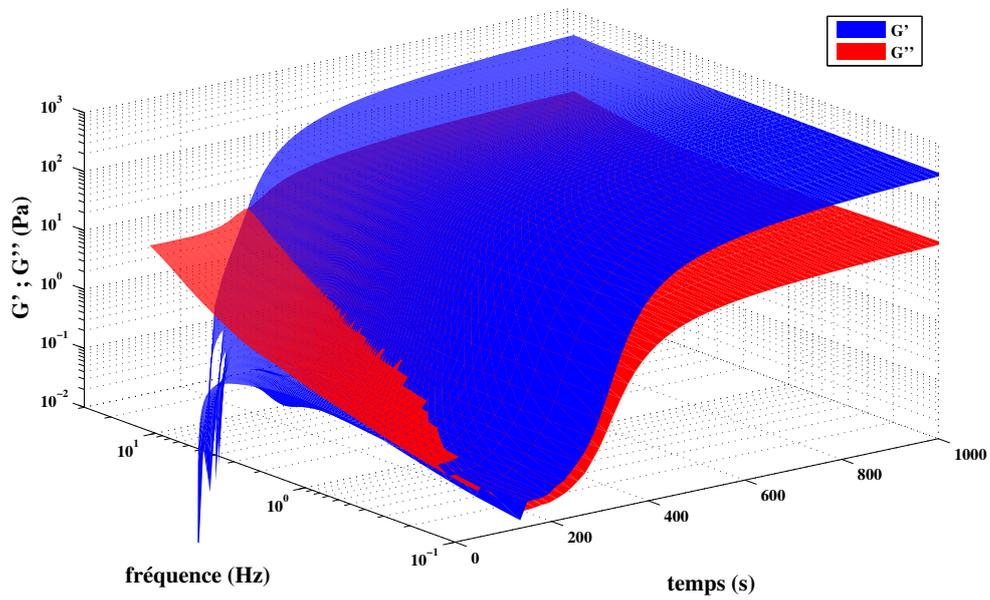
Par la suite, modules visqueux et élastiques connaissent une phase de croissance rapide, pendant environ 200 ou 300  $s$ . Pendant cette période, en fonction de l'état initial du matériau, le module élastique  $G'$  peut être supérieur au module visqueux  $G''$ . Pour l'individu A, cela se produit pour des fréquences comprises entre 0,1 et 0,25  $Hz$  environ. Pour l'individu B, cela ne se produit pas sur toute la bande de fréquence explorée.

Le croisement des modules viscoélastiques est intéressant car il peut fournir des

5.3. Suivi mécanique de l'évolution du caillot sanguin au cours de sa formation



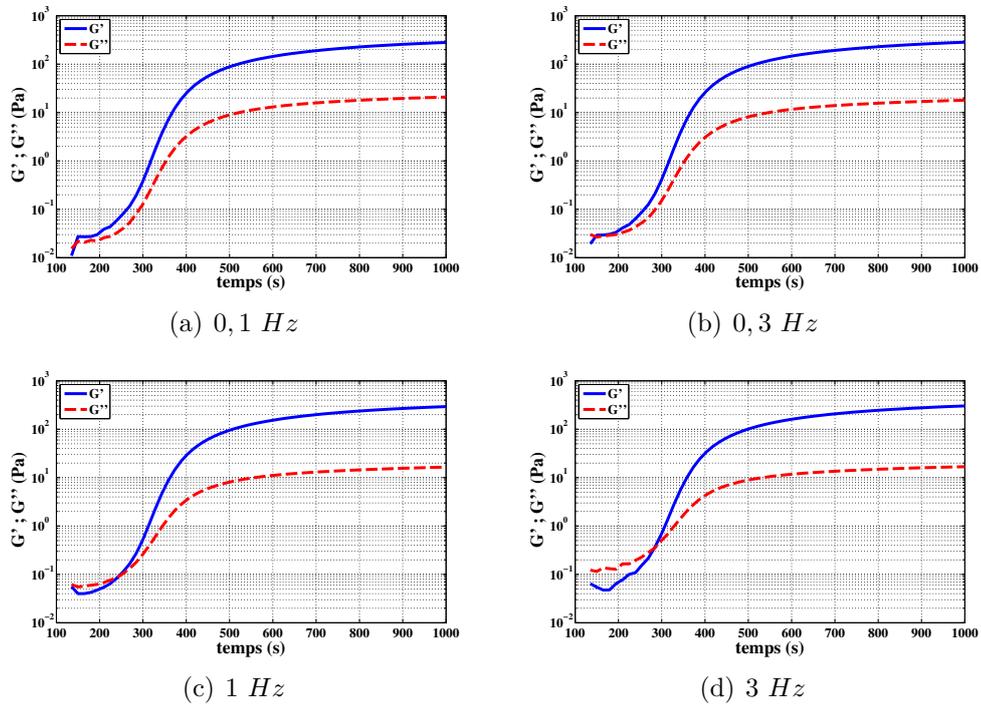
(a) Entre 0 et 5300 s



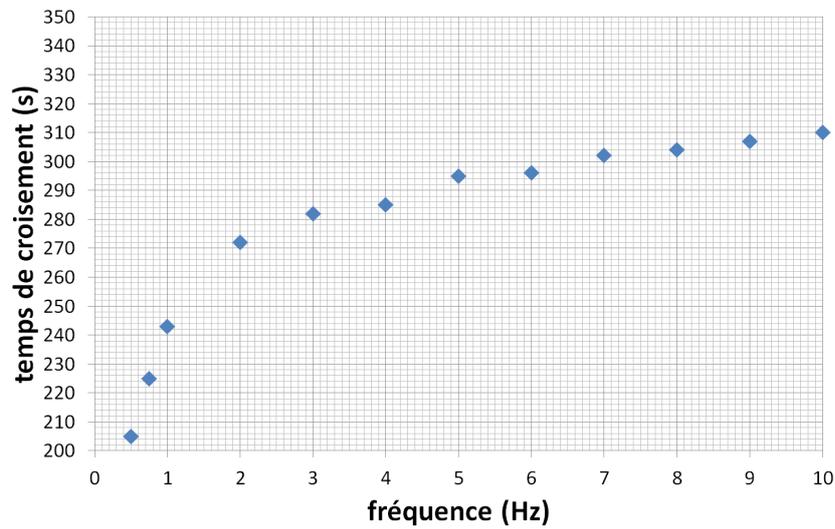
(b) Entre 0 et 1000 s

**Figure 5.4.:** Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur A en fonction de la fréquence et du temps. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre.

## 5. Vers le suivi de la coagulation



**Figure 5.5.:** Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur A en fonction du temps à différentes fréquences données. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre.



**Figure 5.6.:** Temps auquel les modules viscoélastiques se croisent en fonction de la fréquence lors de la formation d'un caillot de sang total du donneur A activé par voie de contact.

### 5.3. Suivi mécanique de l'évolution du caillot sanguin au cours de sa formation

informations sur le processus de coagulation. Sur les figures 5.6 et 5.9, il apparaît clairement que le croisement entre  $G'$  et  $G''$  n'est pas simultané pour toutes les fréquences. Pour l'individu A, le module élastique étant initialement au dessus du module visqueux pour des fréquences inférieures à  $0,3 \text{ Hz}$ , il n'y a même pas de croisement dans le temps sur cette plage de fréquence. Le croisement des modules viscoélastiques s'effectue d'autant plus tard que la fréquence est élevée. Pour l'individu A, entre  $0,5$  et  $10 \text{ Hz}$ , le croisement s'effectue entre  $205$  et  $310 \text{ s}$ , soit à  $105 \text{ s}$  d'écart. Pour l'individu B, entre  $0,1$  et  $10 \text{ Hz}$ , le croisement s'effectue entre  $293$  et  $372 \text{ s}$ , soit à  $79 \text{ s}$  d'écart. Ces intervalles de temps sont environ 10 fois supérieurs à la résolution temporelle de la méthode, et donc fiables. Par conséquent, la coagulation du sang n'est pas un point de gel.

Suite à la phase de croissance des modules viscoélastiques, ceux-ci atteignent un maximum. Le module élastique est alors environ une décade au-dessus du module visqueux sur toute la gamme de fréquences explorée. Les ordres de grandeur des modules viscoélastiques maximums sont (à  $3 \text{ Hz}$ ) :

- Individu A, temps :  $1400 \text{ s}$ , module élastique :  $175 \text{ Pa}$ , module visqueux :  $15 \text{ Pa}$ ,
- Individu B, temps :  $1300 \text{ s}$ , module élastique :  $220 \text{ Pa}$ , module visqueux :  $15 \text{ Pa}$ .

Ensuite, les modules viscoélastiques se mettent tout deux à décroître lentement. Cette phase correspond à la rétraction du caillot. Si l'on considère les modules viscoélastiques  $3000 \text{ s}$  après leur maximum (à  $3 \text{ Hz}$ ), on a :

- Individu A, temps :  $4400 \text{ s}$ , module élastique :  $115 \text{ Pa}$ , module visqueux :  $5 \text{ Pa}$ ,
- Individu B, temps :  $4300 \text{ s}$ , module élastique :  $185 \text{ Pa}$ , module visqueux :  $10 \text{ Pa}$ .

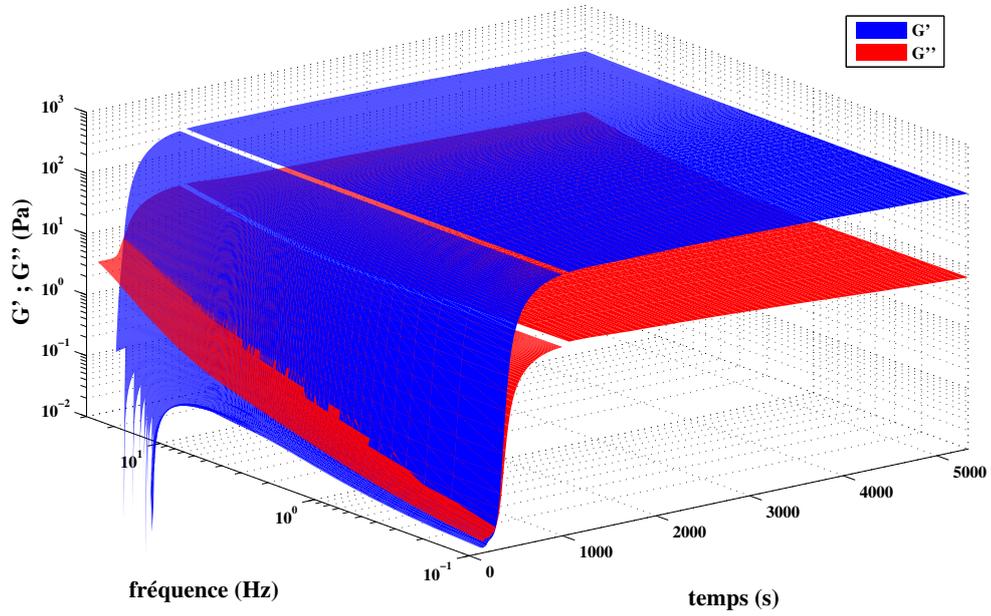
Pour l'individu A, cela représente un décroissance de plus de  $30 \%$  sur le module élastique, et d'environ  $70 \%$  sur le module visqueux. Pour l'individu B, cela représente un décroissance d'environ  $15 \%$  sur le module élastique, et de plus de  $30 \%$  sur le module visqueux.

#### 5.3.2. Activation par adjonction de facteur tissulaire

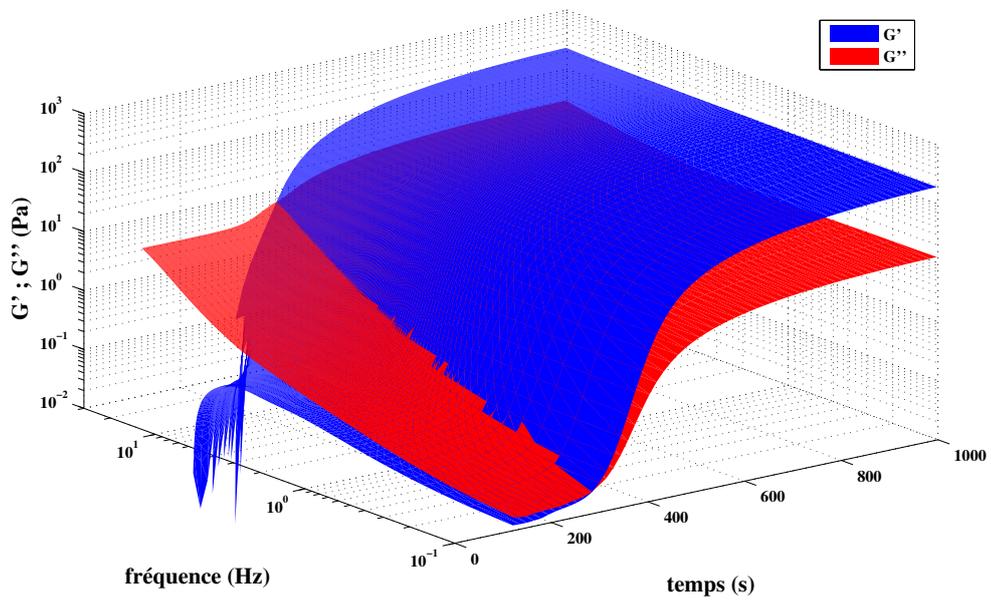
L'activation par ajout de facteur tissulaire, ou voie exogène, est physiologiquement déclenchée lors d'une lésion vasculaire. Le facteur tissulaire est une glycoprotéine membranaire présente au niveau du sous-endothélium. En cas de rupture d'un vaisseau, le facteur tissulaire est mis en contact avec le sang. Une cascade de réaction enzymatique complexe, dont l'aboutissement est la production de thrombine, s'initie alors. Cela se traduit par le début de la polymérisation du fibrinogène en fibrine.

De même que précédemment, les phases présentes lors d'une mesure de thromboélastographie sont également observées ici (voir figure 5.10). Dans un premier temps, les modules viscoélastiques sont identiques à ceux du sang total, puis ceux-ci connaissent une phase de croissance rapide pendant laquelle le module élastique  $G'$  passe au-dessus du module visqueux  $G''$  sur toute la bande de fréquence explorée pour atteindre un maximum, puis ils décroissent finalement lentement.

5. Vers le suivi de la coagulation



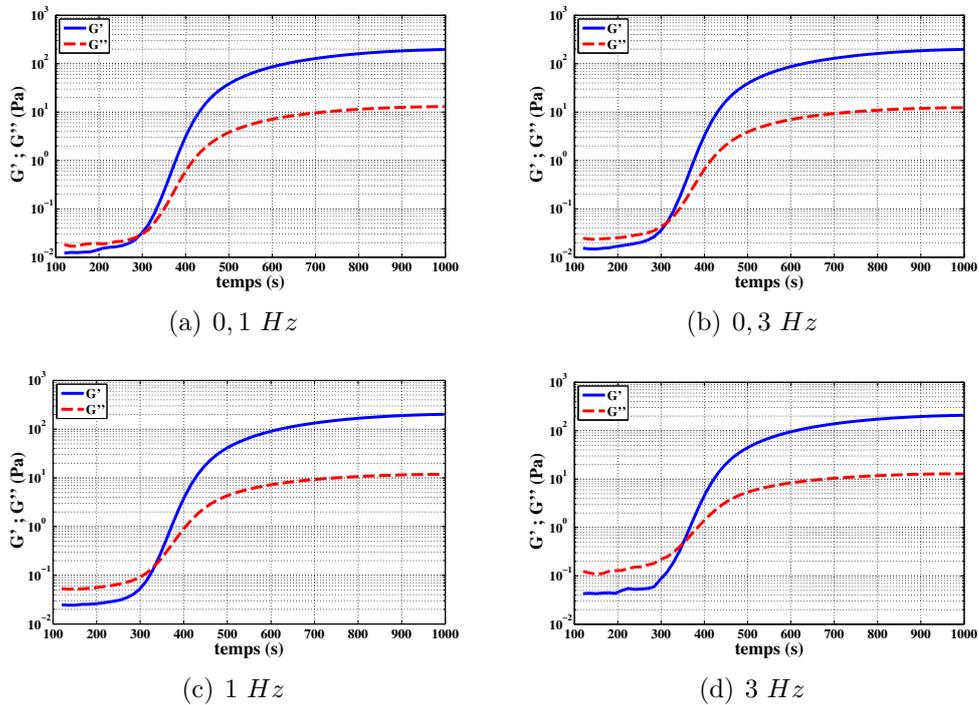
(a) Entre 0 et 5300 s



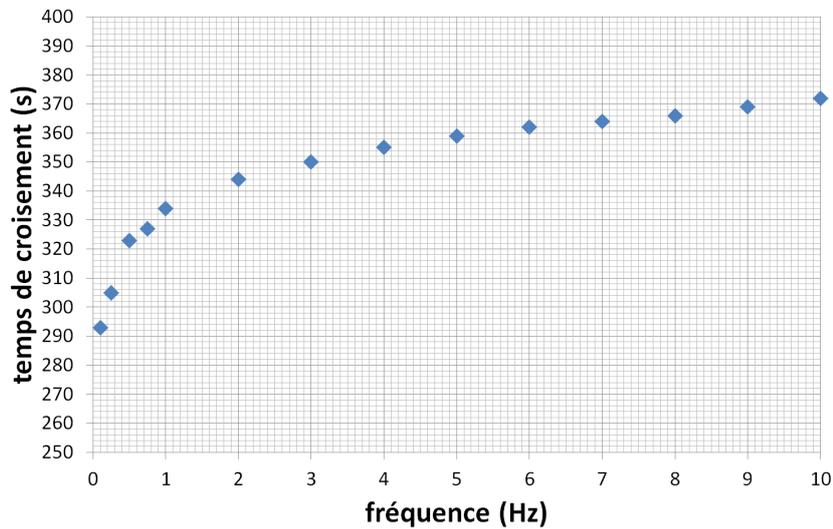
(b) Entre 0 et 1000 s

**Figure 5.7.:** Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur B en fonction de la fréquence et du temps. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre.

### 5.3. Suivi mécanique de l'évolution du caillot sanguin au cours de sa formation



**Figure 5.8.:** Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur B en fonction du temps à différentes fréquences données. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre.



**Figure 5.9.:** Temps auquel les modules viscoélastiques se croisent en fonction de la fréquence lors de la formation d'un caillot de sang total du donneur B activé par voie de contact.

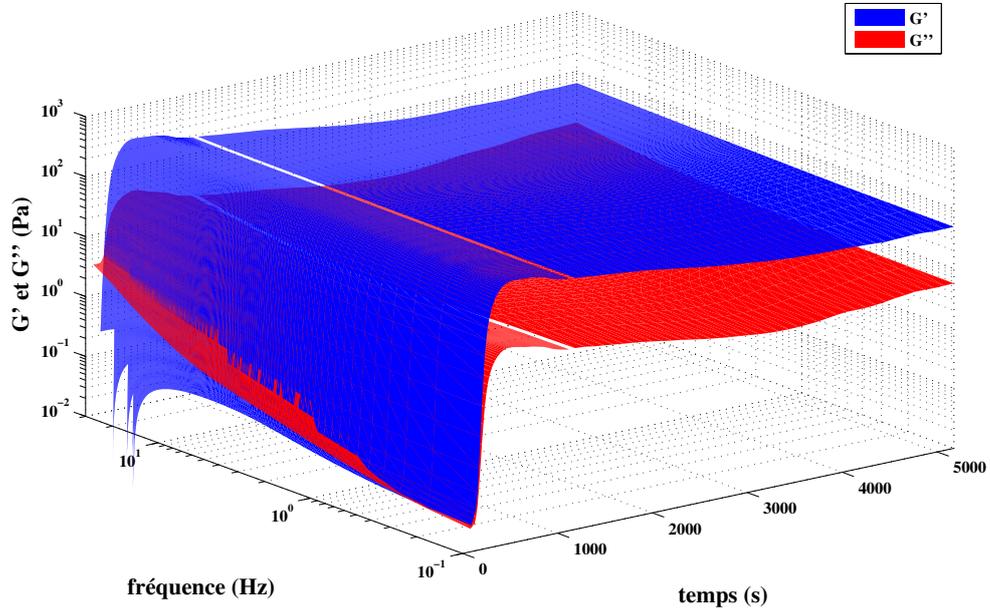
## 5. Vers le suivi de la coagulation

De même que dans la section 5.3.1 pour l'individu A, dans l'état initial le module élastique du matériau est supérieur au module visqueux entre 0,1 et environ 0,3 Hz.

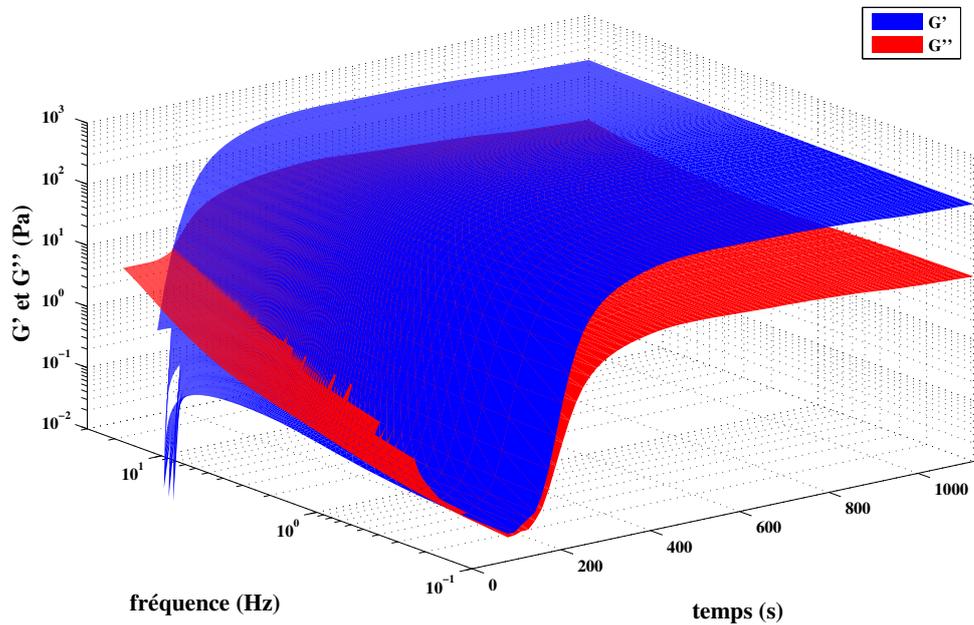
Comparé au cas d'activation par voie de contact, le maximum pour les modules viscoélastiques est atteint beaucoup plus rapidement. À environ 500 s, le module élastique  $G'$  atteint 250 Pa, et le module visqueux  $G''$  atteint 15 Pa (à 3 Hz). Si l'on se place 3000 s plus tard, le module élastique  $G'$  vaut 60 Pa (soit une baisse de 75 % de la valeur maximale), et le module visqueux  $G''$  5 Pa (soit une baisse d'environ 70 % de la valeur maximale). La rétraction du caillot est donc plus importante que dans le cas d'activation par voie de contact.

De même que dans le cas d'activation par voie de contact, il apparaît dans la figure 5.12 que le croisement des modules viscoélastiques n'est pas instantané sur toute la gamme de fréquences. Par conséquent, la coagulation initiée par le facteur tissulaire ne passe pas par un point de gel.

### 5.3. Suivi mécanique de l'évolution du caillot sanguin au cours de sa formation



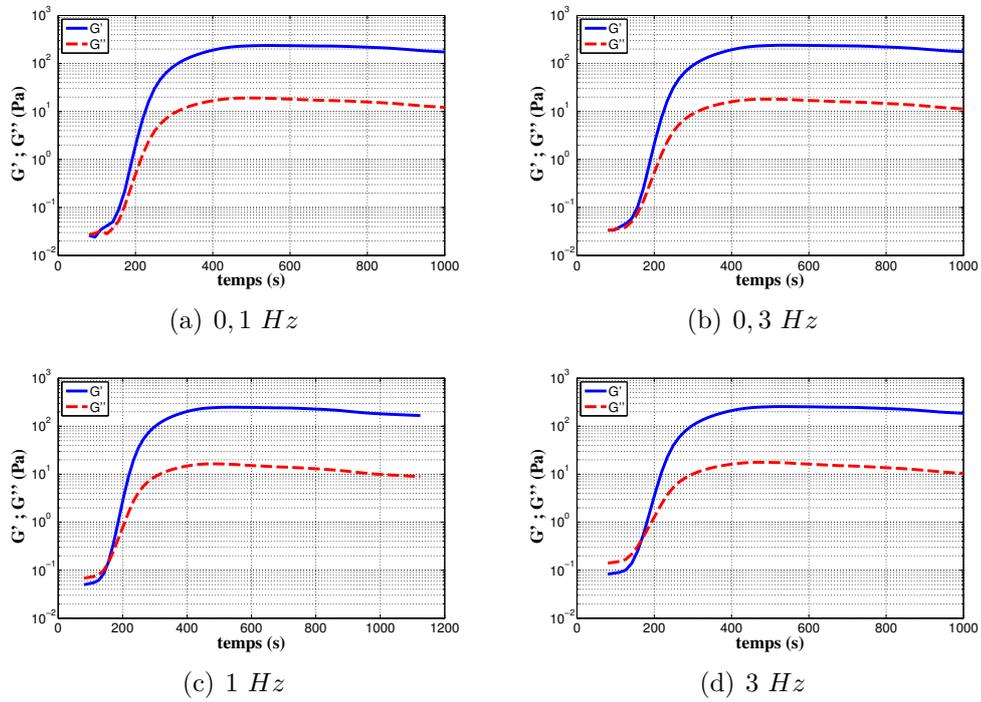
(a) Entre 0 et 5300 s



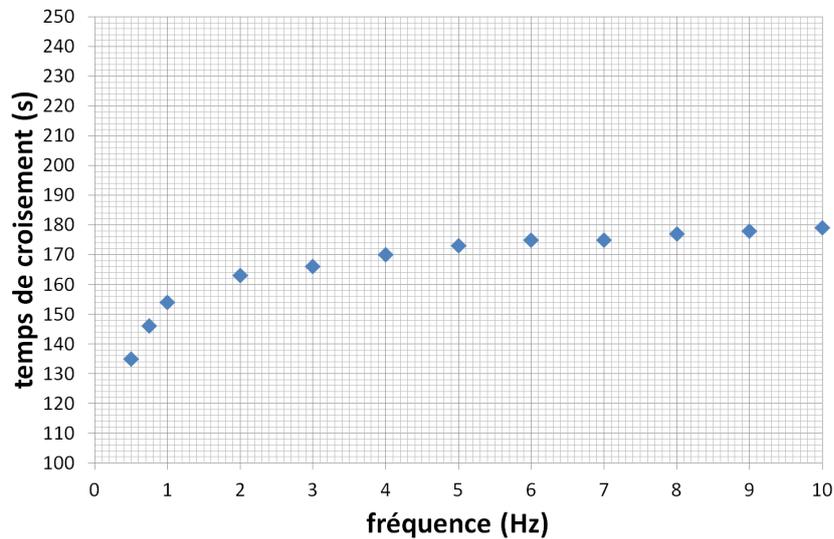
(b) Entre 0 et 1000 s

**Figure 5.10.:** Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total en fonction de la fréquence et du temps. La coagulation a été activée par adjonction de facteur tissulaire.

## 5. Vers le suivi de la coagulation



**Figure 5.11.:** Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total en fonction du temps à différentes fréquences données. La coagulation a été activée par adjonction de facteur tissulaire.



**Figure 5.12.:** Temps auquel les modules viscoélastiques se croisent en fonction de la fréquence lors de la formation d'un caillot de sang total activé par adjonction de facteur tissulaire.

**Sixième partie .**  
**Conclusion générale**



Le rôle d'un caillot sanguin, est intimement lié à ses propriétés mécaniques. Celui-ci doit supporter les contraintes qui lui sont imposées par l'écoulement sanguin, et être toutefois assez poreux pour permettre une lyse efficace une fois les tissus réparés.

Or, le principal verrou technologique qui entrave la progression des connaissances sur la viscoélasticité du caillot est qu'il n'existe aucune méthode rigoureuse adaptée au suivi des propriétés mécaniques du caillot pendant sa formation. Même de « simples mesures » de viscoélasticité du sang n'ont été menées que dans le domaine non-linéaire du matériau à cause de la sensibilité trop faible des appareils de mesure. Par conséquent, il était nécessaire de produire une méthode de mesure rapide, couplée à un dispositif expérimental assez sensible.

Ce travail de thèse a montré que l'OFR est une technique de mesure fonctionnelle, fiable et optimale temporellement. Elle permet, avec des paramètres adaptés, le suivi de grandeurs mécaniques dont le temps caractéristique de mutation est inférieur à la minute. Cette technique a été validée avec succès sur différents matériaux de plus en plus complexes : une huile newtonienne, une gomme viscoélastique (PDMS), une suspension de micelles vermiformes (CpCl Nasal) et enfin un alginat dentaire pendant sa gélification. Le sang étant, en raison de la sédimentation, un fluide évoluant dans le temps, l'OFR est bien adaptée pour la mesure de ses propriétés viscoélastiques. Un balayage systématique des concentrations de composants sanguins les plus abondants a permis de mettre en lumière les paramètres ayant le plus d'influence sur la viscoélasticité sanguine. Cela nous a conduits à mettre au point un sang modèle composé de globules rouges en suspension dans une solution isotonique à pH 7,4 de fibrinogène et d'albumine. La présence d'une petite quantité de surfactant non ionique est indispensable pour éviter l'artéfact de mesure lié à la formation d'un film viscoélastique de protéines à l'interface entre la suspension et l'huile. De cette façon, il est possible de minimiser l'effet de la variabilité biologique. À l'aide de ce sang modèle, nous avons pu mettre en évidence que l'agrégation érythrocytaire est à l'origine d'une élasticité importante, du même ordre de grandeur que la viscosité du matériau. Cette élasticité augmente avec la concentration en fibrinogène, et avec l'hématocrite. Lorsque ces deux paramètres sont suffisamment élevés, un réseau percolé de globules rouges agrégés existe dans la suspension. Cet effet est visible pour des valeurs quasi physiologiques du taux de fibrinogène et de l'hématocrite. L'OFR a par la suite été appliquée au suivi de la coagulation sanguine. L'activation par voie intrinsèque et extrinsèque a été employée sur du sang. Cela a permis de montrer que le procédé d'activation n'avait d'effet que sur la cinétique de la réaction, mais que cela ne changeait pas les étapes mécaniques observées. Contrairement à ce qui a pu être observé dans la littérature, l'OFR permet de par sa résolution fréquentielle élevée et son temps de mesure très court, d'affirmer que la coagulation du sang n'est pas un point de gel.

Ce travail sera poursuivi par l'étude systématique des propriétés mécaniques de sang modèle en train de coaguler. Pour cela, les paramètres influents sur les propriétés viscoélastiques du caillot (concentration en fibrinogène, hématocrite) seront

balayés pour réaliser des échantillons de sang modèle, qui seront utilisés pour former des caillots par les deux voies d'activation. L'aboutissement de ce travail pourrait être le développement d'une méthode de diagnostic permettant d'évaluer les propriétés mécaniques du caillot dans la prise en charges des pathologies vasculaires.

# Bibliographie

- ALONSO, C., PRIES, A. et GAEHTGENS, P. (1993). Time-dependent rheological behavior of blood at low shear in narrow vertical tubes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 265(2):H553–H561.
- ALONSO, C., PRIES, A., KIESSLICH, O., LERCHE, D. et GAEHTGENS, P. (1995). Transient rheological behavior of blood in low-shear tube flow : velocity profiles and effective viscosity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 268(1):H25–H32.
- ANONYME (2014). Schéma de la membrane d'un érythrocyte. <http://monde.ccdmd.qc.ca/media/image1024/55912.jpg>. accédé le 7 Février 2014.
- ARMSTRONG, J., MEISELMAN, H. et FISHER, T. (1997). Covalent binding of poly(ethylene glycol) (PEG) to the surface of red blood cells inhibits aggregation and reduces low shear blood viscosity. *American Journal of Hematology*, 56(1):26–28.
- ARMSTRONG, J., MEISELMAN, H. et FISHER, T. (1999). Evidence against macromolecular "bridging" as the mechanism of red blood cell aggregation induced by nonionic polymers. *Biorheology*, 36(5-6):433–437.
- ARMSTRONG, J., WENBY, R., MEISELMAN, H. et FISHER, T. (2004). The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophysical Journal*, 87(6):4259–4270.
- BAILEY, K., ASTBURY, W. et RUDALL, K. (1943). Fibrinogen and fibrin as members of the keratin-myosin group. *Nature*, 151(3843):716 – 717.
- BARBEE, J. (1973). The effect of temperature on the relative viscosity of human blood. *Biorheology*, 10(1):1–5.
- BASKURT, O., BOYNARD, M., COKELET, G., CONNES, P., COOKE, B., FORCONI, S., LIAO, F., HARDEMAN, M., JUNG, F., MEISELMAN, H., NASH, G., NEMETH, N., NEU, B., SANDHAGEN, B., SHIN, S., THURSTON, G. et WAUTIER, J.-L. (2009). New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 42(2):75–97.
- BASKURT, O., FARLEY, R. et MEISELMAN, H. (1997a). Erythrocyte aggregation tendency and cellular properties in horse, human, and rat : a comparative study. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 273(6):2604–2612.

## Bibliographie

- BASKURT, O., HARDMAN, M., RAMPLING, M. et MEISELMAN, H. (2007). *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*. IOS Press.
- BASKURT, O., TEMIZ, A. et MEISELMAN, H. (1997b). Red blood cell aggregation in experimental sepsis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 130(2):183–190.
- BASKURT, O., TEMIZ, A. et MEISELMAN, H. (1998). Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(1):102–110.
- BAUERSACHS, R., SHAW, S., ZEIDLER, A. et MEISELMAN, H. (1987). Hemorheological findings in uncontrolled type-ii diabetes-mellitus - effects of acute insulin therapy. *Clinical Hemorheology*, 7(3):432–432.
- BAUERSACHS, R., WENBY, R. et MEISELMAN, H. (1989). Determination of specific red blood-cell aggregation indexes via an automated-system. *Clinical Hemorheology*, 9(1):1–25.
- BAUMLER, H., DONATH, E., PRATSCH, L. et LERSCHKE, D. (1989). Aggregation and disaggregation of human red blood cells in neutral polymer electrolytesolutions. In *Hémorhéologie et agrégation érythrocytaire*, volume III, pages 24–36. Ed. J.F. Stolz.
- BENIS, A. et LACOSTE, J. (1968). Study of erythrocyte aggregation by blood viscometry at low shear rates using a balance method. *Circulation Research*, 22(1):29–42.
- BERRET, J.-F., ROUX, D. et LINDNER, P. (1998). Structure and rheology of concentrated wormlike micelles at the shear-induced isotropic-to-nematic transition. *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems*, 5(1):67–77.
- BIRD, R., ARMSTRONG, R. et HASSAGER, O. (1987). *Dynamics of polymeric liquids. Vol. 1, 2nd Ed. : Fluid mechanics*. Wiley.
- BISHOP, J., NANCE, P., POPEL, A., INTAGLIETTA, M. et JOHNSON, P. (2001). Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 280(1):H222–H236.
- BLOMBACK, B., HESSEL, B., HOGG, D. et THERKILDSEN, L. (1978). A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation. *Nature*, 275(5680):501–505.
- BÖHME, G. et STENGER, M. (1990). On the influence of fluid inertia in oscillatory rheometry. *Journal of Rheology*, 34:415.
- BORUN, E., FIGUEROA, W. et PERRY, S. (1957). The distribution of fe59 tagged human erythrocytes in centrifuged specimens as a function of cell age. *Journal of Clinical Investigation*, 36(5):676–679.
- BOS, M. A. et van VLIET, T. (2001). Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants : a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3):437–471.

- BRENNER, H. (1974). Rheology of a dilute suspension of axisymmetric brownian particles. *International journal of multiphase flow*, 1(2):195–341.
- CANHAM, P. et BURTON, A. (1968). Distribution of size and shape in populations of normal human red cells. *Circulation Research*, 22(3):405–422.
- CHARM, S. et KURLAND, G. (1967). Static method for determining blood yield stress. *Nature*, 216(5120):1121–1123.
- CHIEN, S. (1970). Shear dependence of effective cell volume as a determinant of blood viscosity. *Science*, 168(3934):977–979.
- CHIEN, S. et JAN, K. (1973). Ultrastructural basis of the mechanism of rouleaux formation. *Microvascular Research*, 5(2):155–166.
- CHIEN, S., KING, R., SKALAK, R., USAMI, S. et COPLEY, A. (1975). Viscoelastic properties of human-blood and red-cell suspensions. *Biorheology*, 12(6):341–346.
- CHIEN, S., USAMI, S., TAYLOR, H., LUNDBERG, J. et GREGERSEN, M. (1966). Effects of hematocrit and plasma proteins on human blood rheology at low shear rates. *Journal of Applied Physiology*, 21(1):81–87.
- COKELET, G., BROWN, J., CODD, S. et SEYMOUR, J. (2005). Magnetic resonance microscopy determined velocity and hematocrit distributions in a couette viscometer. *Biorheology*, 42(5):385–399.
- COKELET, G. et GOLDSMITH, H. (1991). Decreased hydrodynamic resistance in the two-phase flow of blood through small vertical tubes at low flow rates. *Circulation research*, 68(1):1–17.
- COPLEY, A., KING, R., CHIEN, S., USAMI, S., SKALAK, R. et HUANG, C. (1975). Microscopic observations of viscoelasticity of human-blood in steady and oscillatory shear. *Biorheology*, 12(5):257–263.
- COPLEY, A. et STAINSBY, G. (1960). *Flow properties of blood and other biological systems*. New York : Pergamon Press.
- DONATH, E., KUZMIN, P., KRABI, A. et VOIGT, A. (1993). Electrokinetics of structured interfaces with polymer depletion - a theoretical study. *Colloid and Polymer Science*, 271(10):930–939.
- DOOLITTLE, R. (1984). Fibrinogen and fibrin. *Annual Review of Biochemistry*, 53:195 – 229.
- DOOLITTLE, R., WATT, K., COTTRELL, B., STRONG, D. et RILEY, M. (1979). The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen. *Nature*, 280(5722):464 – 468.
- EINSTEIN, A. (1906). Eine neue bestimmung der moleküldimensionen. *Annalen der Physik*, 19:289–306.
- EINSTEIN, A. (1911). Berichtigung zu meiner arbeit : eine neue bestimmung der moleküldimensionen. *Annalen der Physik*, 34:591–592.

## Bibliographie

- EVANS, E. et FUNG, Y. (1972). Improved measurements of the erythrocyte geometry. *Microvascular Research*, 4(4):335–347.
- EVANS, E. et NEEDHAM, D. (1988). Attraction between lipid bilayer membranes in concentrated solutions of nonadsorbing polymers : comparison of mean-field theory with measurements of adhesion energy. *Macromolecules*, 21(6):1822–1831.
- EVANS, P., HAWKINS, K., LAWRENCE, M., WILLIAMS, R., BARROW, M., THIRUMALAI, N. et WILLIAMS, P. (2008a). Rheometry and associated techniques for blood coagulation studies. *Medical Engineering & Physics*, 30(6):671–679.
- EVANS, P., HAWKINS, K., MORRIS, R., THIRUMALAI, N., MUNRO, R., WAKEMAN, L., LAWRENCE, M. et WILLIAMS, P. (2010a). Gel point and fractal microstructure of incipient blood clots are significant new markers of hemostasis for healthy and anticoagulated blood. *Blood*, 116(17):3341–3346.
- EVANS, P., HAWKINS, K., WILLIAMS, P. et WILLIAMS, R. (2008b). Rheometrical detection of incipient blood clot formation by fourier transform mechanical spectroscopy. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 148(1-3):122–126.
- EVANS, P., LAWRENCE, M., MORRIS, R., THIRUMALAI, N., MUNRO, R., WAKEMAN, L., BEDDEL, A., WILLIAMS, P., BARROW, M., CURTIS, D., BROWN, M. et HAWKINS, K. (2010b). Fractal analysis of viscoelastic data with automated gel point location and its potential application in the investigation of therapeutically modified blood coagulation. *Rheologica Acta*, 49(9):901–908.
- EVANS, P. A., HAWKINS, K. et WILLIAMS, P. R. (2006). Rheometry for blood coagulation studies. *Rheology Reviews*, 2006:255.
- EVERSE, S., SPRAGGON, G., VEERAPANDIAN, L., RILEY, M. et DOOLITTLE, R. (1998). Crystal structure of fragment double-d from human fibrin with two different bound ligands. *Biochemistry*, 37(24):8637–8642.
- FAHRAEUS, R. et LINDQVIST, T. (1931). The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *American Journal of Physiology*, 96:562–568.
- FALL, A., BERTRAND, F., OVARLEZ, G. et BONN, D. (2009). Yield stress and shear banding in granular suspensions. *Physical Review Letters*, 103(17):178301.
- FALL, A., de CAGNY, H., BONN, D., OVARLEZ, G., WANDERSMAN, E., DIJKSMAN, J. et van HECKE, M. (2013). Rheology of sedimenting particle pastes. *Journal of Rheology*, 57(4):1237.
- FERRY, J. (1952). The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38(7):566–569.
- FOWLER, W., HANTGAN, R., HERMANS, J. et ERICKSON, H. (1981). Structure of the fibrin protofibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8):4872–4876.
- FREYSSINET, J.-M., TORBET, J., HUDRY-CLERGEON, G. et MARET, G. (1983). Fibrinogen and fibrin structure and fibrin formation measured by using magnetic

- orientation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(6):1616–1620.
- FUNG, Y., PERRONE, N. et ANLIKER, M. (1972). The rheology of human blood. *In Biomechanics : its foundations and objectives*, pages 75–101. Prentice-Hall.
- GAME, L., VOEGEL, J., SCHAAF, P. et STOLTZ, J. (1996). Do physiological concentrations of IgG induce a direct aggregation of red blood cells : comparison with fibrinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1291(2):138–142.
- GASPARROSAS, A. et THURSTON, G. (1988). Erythrocyte aggregate rheology by transmitted and reflected light. *Biorheology*, 25(3):471–487.
- GENOVESE, D. (2012). Shear rheology of hard-sphere, dispersed, and aggregated suspensions, and filler-matrix composites. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172:1–16.
- GHIRINGHELLI, E., ROUX, D., BLESES, D., GALLIARD, H. et CATON, F. (2012). Optimal fourier rheometry. *Rheologica Acta*, 51(5):413–420.
- GROB, P., FROMMEL, D., ISLIKER, H. C. et MASOUREDIS, S. P. (1967). Interaction of IgG and its fragments with red cells. *Immunology*, 13(5):489–499.
- HALL, C. (1949). Studies of fibrinogen and fibrin with the electron microscope. *Journal of the American Chemical Society*, 71(3):1138–1139.
- HARKNESS, J. et WHITTINGTON, R. (1971). The viscosity of human blood plasma : its change in disease and on the exhibition of drugs. *Rheologica Acta*, 10(1):55–60.
- HARTET, H. (1948). Blutgerinnung studien mit der thromboelastographie, einen neuen untersuchungsverfahren. *Klinische Wochenschrift*, 26:577.
- HEIN, H., BAUERSACHS, R., FEINSTEIN, E. et MEISELMAN, H. (1987). Hemorheological abnormalities in chronic-renal-failure patients. *Clinical Hemorheology*, 7(3):430–430.
- HENSCHEN, A. (1964). Paper electrophoretic pattern and mobilities of unmodified, sulfitolysed and reducedalkylated fibrinogen and fibrin in buffered 6m urea. *Arkiv for kemi*, 22:397.
- HEWAT, E., TRANQUI, L. et WADE, R. (1983). Electron microscope structural study of modified fibrin and a related modified fibrinogen aggregate. *Journal of Molecular Biology*, 170(1):203–222.
- HOLLY, E., VENKATARAMAN, S., CHAMBON, F. et WINTER, H. (1988). Fourier transform mechanical spectroscopy of viscoelastic materials with transient structure. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 27(1):17–26.
- IKEDA, S. et NISHINARI, K. (2000). Intermolecular forces in bovine serum albumin solutions exhibiting solidlike mechanical behaviors. *Biomacromolecules*, 1(4):757–763.

## Bibliographie

- IKEDA, S. et NISHINARI, K. (2001). On solid-like rheological behaviors of globular protein solutions. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6):401–406.
- IZUMIDA, Y., SEIYAMA, A. et MAEDA, N. (1991). Erythrocyte aggregation : Bridging by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1067(2):221–226.
- JAN, K. et CHIEN, S. (1973). Role of surface electric charge in red blood cell interactions. *The Journal of general physiology*, 61(5).
- JANMEY, P. (1982). Kinetics of formation of fibrin oligomers. i. theory. *Biopolymers*, 21(11):2253–2264.
- KAIBARA, M. (1983). Rheological behaviors of bovine blood forming artificial rouleaux. *Biorheology*, 20(5):583–592.
- KARNIS, A., GOLDSMITH, H. et MASON, S. (1966). The flow of suspensions through tubes : V. inertial effects. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 44(4):181–193.
- KIKUCHI, Y. et KOYAMA, T. (1984). Red blood cell deformability and protein adsorption on red blood cell surface. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 247(5):739–747.
- KIM, S., ONG, P., YALCIN, O., INTAGLIETTA, M. et JOHNSON, P. (2009). The cell-free layer in microvascular blood flow. *Biorheology*, 46(3):181–189.
- KRIEGER, I. (1972). Rheology of monodisperse latices. *Advances in Colloid and Interface Science*, 3(2):111–136.
- LADYZHINSKY, I. et URIEV, N. (1996). Whether or not two types of layer coexist in colloidal gels under shear. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 108(1):13–25.
- LANG, T., BAUTERS, A., BRAUN, S., POTZSCH, B., von PAPE, K.-W., KOLDE, H.-J. et LAKNER, M. (2005). Multi-centre investigation on reference ranges for rotem thromboelastometry. *Blood Coagulation & Fibrinolysis June 2005*, 16(4):301–310.
- LAPASIN, R., GRASSI, M. et PRICL, S. (1996). Rheological modeling of fractal and dense suspensions. *The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal*, 64(1):99–106.
- LASKOWSKI, M., DONNELLY, T., VAN TIJN, B. et SCHERAGA, H. (1956). The proteolytic action of thrombin on fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 222(2):815 – 821.
- LAUDANO, A. et DOOLITTLE, R. (1978). Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(7):3085–3089.
- LERCHE, D. (1983). The role of electrostatic and structural properties of the cell surface in the energetics of the cell-cell and cell-surface interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 416(1):66–81.

- LERCHE, D. (1984). Electrostatic fixed charge distribution in the RBC-glycocalyx and their influence upon the total free interaction energy. *Biorheology*, 21(4):477–492.
- LINDERKAMP, O. et MEISELMAN, H. (1982). Geometric, osmotic, and membrane mechanical-properties of density-separated human red-cells. *Blood*, 59(6):1121–1127.
- LOTTSPREICH, F. et HENSCHEN, A. (1977). Amino acid sequence of human fibrin. preliminary note on the completion of the gamma-chain sequence. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 358(7):935 – 938.
- LOWE, G. (1988). *Clinical Blood Rheology*. Taylor & Francis.
- MACOSKO, C. (1994). *Rheology : principles, measurements, and applications*. VCH, New York.
- MAEDA, N., IMAIZUMI, K., SEKIYA, M. et SHIGA, T. (1984). Rheological characteristics of desialylated erythrocytes in relation to fibrinogen-induced aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 776(1):151–158.
- MAEDA, N., SEIKE, M., KUME, S., TAKAKU, T. et SHIGA, T. (1987). Fibrinogen-induced erythrocyte aggregation : erythrocyte-binding site in the fibrinogen molecule. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 904(1):81–91.
- MAEDA, N. et SHIGA, T. (1986). Opposite effect of albumin on the erythrocyte aggregation induced by immunoglobulin g and fibrinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 855(1):127–135.
- MATSUMOTO, T. et INOUE, H. (1993). Small angle x-ray scattering and viscoelastic studies of the molecular shape and colloidal structure of bovine and rat serum albumins in aqueous systems. *Chemical Physics*, 178(1-3):591–598.
- MEDVED, L., LITVINOVICH, S., UGAROVA, T., LUKINOVA, N., KALIKHEVICH, V. et ARDEMASOVA, Z. (1993). Localization of a fibrin polymerization site complementary to gly-his-arg sequence. *FEBS Letters*, 320(3):239–242.
- MEISELMAN, H. (1993). Red-blood-cell role in rbc aggregation - 1963-1993 and beyond. *Clinical Hemorheology*, 13(5):575–592.
- MEISELMAN, H. (2009). Red blood cell aggregation : 45 years being curious. *Biorheology*, 46(1):1–19.
- MEISELMAN, H., MERRILL, E., GILLILAND, E., PELLETIER, G. et SALZMAN, E. (1967). Influence of plasma osmolarity on the rheology of human blood. *Journal of applied physiology*, 22(4).
- MERRILL, E., BENIS, A., GILLILAND, E., SHERWOOD, T. et SALZMAN, E. (1965). Pressure-flow relations of human blood in hollow fibers at low flow rates. *Journal of Applied Physiology*, 20(5):954–967.

## Bibliographie

- MERRILL, E., COKELET, G., BRITTEN, A. et WELLS, R. (1963a). Non-newtonian rheology of human blood - effect of fibrinogen deduced by "Subtraction". *Circulation Research*, 13(1):48–55.
- MERRILL, E. et PELLETIER, G. (1967). Viscosity of human blood : transition from newtonian to non-newtonian. *Journal of Applied Physiology*, 23(2):178–182.
- MERRILL, E. W., GILLILAND, E. R., COKELET, G., SHIN, H., BRITTEN, A. et WELLS, R. E. (1963b). Rheology of human blood, near and at zero flow. *Biophysical Journal*, 3(3):199–213.
- MIHALYI, E. (1954). Transformation of fibrinogen into fibrin i. electrochemical investigation of the activation process. *Journal of Biological Chemistry*, 209(2):723 – 732.
- MOSESSON, M., SIEBENLIST, K., AMRANI, D. et DIORIO, J. (1989). Identification of covalently linked trimeric and tetrameric d domains in crosslinked fibrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(4):1113–1117.
- MOURS, M. et WINTER, H. (1994). Time resolved rheometry. *Rheologica Acta*, pages 385–397.
- MUELLER, S., LLEWELLIN, E. et MADER, H. (2010). The rheology of suspensions of solid particles. *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Science*, 466(2116):1201–1228.
- MURATA, T. et SECOMB, T. (1987). Effects of shear rate on rouleau formation in simple shear flow. *Biorheology*, 25(1-2):113–122.
- MURPHY, J. (1973). Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 82(2).
- NAPPER, D. (1970). Colloid stability. *Industrial and Engineering Chemistry, Product Research and Development*, 9(4):467–477.
- NASH, G. et MEISELMAN, H. (1985). Alteration of red-cell membrane viscoelasticity by heat-treatment - effect on cell deformability and suspension viscosity. *Biorheology*, 22(1):73–84.
- NASH, G., WENBY, R., SOWEMIMOCOKER, S. et MEISELMAN, H. (1987). Influence of cellular properties on red-cell aggregation. *Clinical Hemorheology*, 7(1):93–108.
- NEU, B. et MEISELMAN, H. (2002). Depletion-mediated red blood cell aggregation in polymer solutions. *Biophysical Journal*, 83(5):2482–2490.
- NEU, B., SOWEMIMO-COKER, S. et MEISELMAN, H. (2003). Cell-cell affinity of senescent human erythrocytes. *Biophysical Journal*, 85(1):75–84.
- NEU, B., WENBY, R. et MEISELMAN, H. J. (2008). Effects of dextran molecular weight on red blood cell aggregation. *Biophysical Journal*, 95(6):3059–3065.
- NORDT, F. (1983). Hemorheology in cerebrovascular diseases : Approaches to drug development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 416(1):651–661.

- PATAPOFF, T. et ESUE, O. (2009). Polysorbate 20 prevents the precipitation of a monoclonal antibody during shear. *Pharmaceutical Development and Technology*, 14(6):659–664.
- PEARSON, M. (1996). *An investigation into the mechanisms of rouleaux formation and the development of improved techniques for its quantitation*. Ph.D., Imperial College London (University of London).
- PICART, C. (1997). *Rhéométrie de cisaillement et microstructure du sang. Applications cliniques*. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier Grenoble 1.
- PICART, C., CARPENTIER, P., BAUMLER, H. et PIAU, J.-M. (1999). Blood yield stress in systemic sclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 276(2):H771–H777.
- PICART, C., PIAU, J.-M., GALLIARD, H. et CARPENTIER, P. (1998). Human blood shear yield stress and its hematocrit dependence. *Journal of Rheology*, 42(1):1–12.
- PORTER, K. et HAWN, C. (1949). Sequences in the formation of clots from purified bovine fibrinogen and thrombin : A study with the electron microscope. *The Journal of Experimental Medicine*, 90(3):225–232.
- PRATT, K., CĂ ’TÉ, H., CHUNG, D., STENKAMP, R. et DAVIE, E. (1997). The primary fibrin polymerization pocket : Three-dimensional structure of a 30-kda c-terminal gamma chain fragment complexed with the peptide gly-pro-arg-pro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14):7176–7181.
- PRIES, A., NEUHAUS, D. et GAEHTGENS, P. (1992). Blood viscosity in tube flow : dependence on diameter and hematocrit. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 263(6):1770–1778.
- QUEMADA, D. (1977). Rheology of concentrated disperse systems and minimum energy dissipation principle. *Rheologica Acta*, 16(1):82–94.
- QUEMADA, D. (1978). Rheology of concentrated disperse systems III. general features of the proposed non-newtonian model. comparison with experimental data. *Rheologica Acta*, 17(6):643–653.
- QUEMADA, D. (2006). *Modélisation rhéologique structurelle : dispersions concentrées et fluides complexes*. Editions TEC & DOC.
- QUEMADA, D. et BERLI, C. (2002). Energy of interaction in colloids and its implications in rheological modeling. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98:51–85.
- RAINER, C., KAWANISHI, D., CHANDRARATNA, P., BAUERSACHS, R., REID, C., RAHIMTOOLA, S. et MEISELMAN, H. (1987). Changes in blood rheology in patients with stable angina pectoris as a result of coronary artery disease. *Circulation*, 76(1):15–20.
- RAMPLING, M. (1980). The binding of fibrinogen and fibrinogen degradation products to the erythrocyte membrane and its relationship to haemorheology. *Acta biologica et medica Germanica*, 40(4-5):373–378.

## Bibliographie

- RAMPLING, M. et MARTIN, G. (1992). Albumin and rouleaux formation. *Clinical Hemorheology*, 12(5):761–765.
- RAMPLING, M., WHITTINGSTALL, P., MARTIN, G., BIGNALL, S., RIVERS, R., LISSAUER, T. et BAILEY, P. (1989). A comparison of the rheologic properties of neonatal and adult blood. *Pediatric Research*, 25(5):457–460.
- RAMPLING, M. W., MEISELMAN, H. J., NEU, B. et BASKURT, O. K. (2004). Influence of cell-specific factors on red blood cell aggregation. *Biorheology*, 41(2):91–112.
- RAND, P., AUSTIN, W., LACOMBE, E. et BARKER, N. (1968). pH and blood viscosity. *Journal of applied physiology*, 25(5).
- REINKE, W., GAEHTGENS, P. et JOHNSON, P. C. (1987). Blood viscosity in small tubes : effect of shear rate, aggregation, and sedimentation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 253(3):H540–H547.
- REINKE, W., JOHNSON, P. et GAEHTGENS, P. (1986). Effect of shear rate variation on apparent viscosity of human blood in tubes of 29 to 94 microns diameter. *Circulation Research*, 59(2):124–132.
- RIVARD, G., BRUMMEL-ZIEDINS, K., MANN, K., FAN, L., HOFER, A. et COHEN, E. (2005). Evaluation of the profile of thrombin generation during the process of whole blood clotting as assessed by thrombelastography. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(9):2039–2043.
- ROMAN, S., LORTHOIS, S., DURU, P. et RISSO, F. (2012). Velocimetry of red blood cells in microvessels by the dual-slit method : Effect of velocity gradients. *Microvascular Research*, 84(3):249–261.
- SARELIUS, I. et DULING, B. (1982). Direct measurement of microvessel hematocrit, red cell flux, velocity, and transit time. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 243(6):H1018–H1026.
- SCHERAGA, H. et LASKOWSKI, M. (1957). The fibrinogen-fibrin conversion. In C.B. ANFENSEN, M. A., éditeur : *Advances in Protein Chemistry*, volume Volume 12, pages 1–131. Academic Press.
- SECOMB, T., STYP-REKOWSKA, B. et PRIES, A. (2007). Two-dimensional simulation of red blood cell deformation and lateral migration in microvessels. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(5):755–765.
- SHAINOFF, J. et DARDIK, B. (1983). Fibrinopeptide b in fibrin assembly and metabolism : Physiologic significance in delayed release of the peptide\*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 408(1):254–268.
- SHARMA, V., JAISHANKAR, A., WANG, Y.-C. et MCKINLEY, G. (2011). Rheology of globular proteins : apparent yield stress, high shear rate viscosity and interfacial viscoelasticity of bovine serum albumin solutions. *Soft Matter*, 7(11):5150–5160.

- SHIGA, T., IMAIZUMI, K., HARADA, N. et SEKIYA, M. (1983). Kinetics of rouleaux formation using TV image analyzer. i. human erythrocytes. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 245(2):252–258.
- SHIGA, T., MAEDA, N. et KON, K. (1990). Erythrocyte rheology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 10(1):9–48.
- SHULMAN, S. et FERRY, J. (1950). The the conversion of fibrinogen to fibrin. II. influence of pH and ionic strength on clotting time and clot opacity. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 54(1):66 – 79.
- SIEBENLIST, K., DIORIO, J., BUDZYNSKI, A. et MOSESSON, M. (1990). The polymerization and thrombin-binding properties of des-(b beta 1-42)-fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(30):18650–18655.
- SIMON, A., O’ROURKE, M. et LEVENSON, J. (1991). Arterial distensibility and its effect on wave reflection and cardiac loading in cardiovascular disease. *Coronary artery disease*, 2(10):1111–1120.
- SNABRE, P. et MILLS, P. (1985). Effect of dextran polymer on glycocalyx structure and cell electrophoretic mobility. *Colloid and Polymer Science*, 263(6):494–500.
- SNABRE, P. et MILLS, P. (1986). Role of electrostatic interactions in the phenomenon of erythrocyte aggregation. *Biorheology*, 23(2):140–140.
- SNABRE, P. et MILLS, P. (1996). Rheology of weakly flocculated suspensions of rigid particles. *Journal de Physique III*, 6:1811 – 1834.
- SOWEMIMO-COKER, S., WHITTINGSTALL, P., PIETSCH, L., BAUERSACHS, R., WENBY, R. et MEISELMAN, H. (1989). Effects of cellular factors on the aggregation behavior of human, rat and bovine erythrocytes. *Clinical Hemorheology*, 9(5):723–737.
- STEFFEN, P., VERDIER, C. et WAGNER, C. (2013). Quantification of depletion-induced adhesion of red blood cells. *Physical Review Letters*, 110(1):018102.
- SUDA, T., MAEDA, N., SHIMIZU, D., KAMITSUBO, E. et SHIGA, T. (1982). Decreased viscosity of human-erythrocyte suspension due to drug-induced spherostomatocytosis. *Biorheology*, 19(4):555–565.
- THURSTON, G. (1972). Viscoelasticity of human blood. *Biophysical Journal*, 12(9):1205–1217.
- THURSTON, G. (1973). Frequency and shear rate dependence of viscoelasticity of human blood. *Biorheology*, 10(3):375–381.
- THURSTON, G. (1976). The viscosity and viscoelasticity of blood in small diameter tubes. *Microvascular Research*, 11(2):133–146.
- THURSTON, G. (1989). Plasma release-cell layering theory for blood-flow. *Biorheology*, 26(2):199–214.

## Bibliographie

- THURSTON, G. (1993). The elastic yield stress of human blood. *Biomedical sciences instrumentation*, 29.
- THURSTON, G. (1994). Non-newtonian viscosity of human blood - flow-induced changes in microstructure. *Biorheology*, 31(2):179–192.
- THURSTON, G. et HENDERSON, N. (2007). Blood viscoelasticity. In *Handbook of Hemorheology and Hemodynamics*, volume 69 de *Biomedical and health research*, pages 72 – 90. Baskurt O.K., Hardeman M.R., Rampling M.W. et Meiselman H.J., IOS press édition.
- TORBET, J., FREYSSINET, J.-M. et HUDRY-CLERGEON, G. (1981). Oriented fibrin gels formed by polymerization in strong magnetic fields. *Nature*, 289(5793):91 – 93.
- USAMI, S., KING, R., CHIEN, S., SKALAK, R., HUANG, C. et COPLEY, A. (1975). Microcinéphotographic studies on red-cell aggregation in steady and oscillatory shear. *Biorheology*, 12(5):323–325.
- VLASTOS, G., LERCHE, D., KOCH, B., SAMBA, O. et POHL, M. (1997). The effect of parallel combined steady and oscillatory shear flows on blood and polymer solutions. *Rheologica acta*, 36(2):160–172.
- WESTERHOF, N. et NOORDERGRAAF, A. (1970). Arterial viscoelasticity : A generalized model : Effect on input impedance and wave travel in the systematic tree. *Journal of Biomechanics*, 3(3):357–379.
- WHITTINGSTALL, P. et MEISELMAN, H. (1991). Effects of galactose incubation on the aggregation behavior of density separated human erythrocytes. In *Hémorhéologie et Aggrégation érythrocytaire*, pages 111–122. J.F. Stolz, M. Donner, A.L. Copley, éditions médicales internationales, paris édition.
- WILLIAMS, P., HAWKINS, K., WRIGHT, C., EVANS, A., SIMPKIN, H., BARROW, M. et WILLIAMS, R. (2006). Rheometrical and computational studies of blood viscoelasticity during coagulation. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 35(1):123–127.
- WINTER, H., MORGANELLI, P. et CHAMBON, F. (1988). Stoichiometry effects on rheology of model polyurethanes at the gel point. *Macromolecules*, 21(2):532–535.
- YEE, V., PRATT, K., CÔTÉ, H., TRONG, I., CHUNG, D., DAVIE, E., STENKAMP, R. et TELLER, D. (1997). Crystal structure of a 30 kda c-terminal fragment from the gamma chain of human fibrinogen. *Structure*, 5(1):125–138.

# Liste des tableaux

2.1. Corrélation entre l'agrégation induite par le plasma et celle induite par différents polymères [Rampling <i>et al.</i> , 2004] . . . . .	59
3.1. Comparaison entre les paramètres du modèle de Maxwell obtenus par OFR, et par méthode de croisement dans [Berret <i>et al.</i> , 1998] . . . . .	108
4.1. Constitution des différents échantillons étudiés . . . . .	118



# Table des figures

1.1.	Schéma représentant un écoulement de type cisaillement plan simple.	18
1.2.	(a). Relation entre viscosité et taux de cisaillement typique d'un fluide Newtonien. (b). Relation entre contrainte et taux de cisaillement typique d'un fluide Newtonien. . . . .	20
1.3.	Relation entre contrainte et taux de cisaillement typique d'un fluide viscoplastique. . . . .	20
1.4.	(a). Relation entre contrainte et taux de cisaillement typique d'un fluide rhéofluidifiant. (b). Relation entre viscosité et taux de cisaillement typique d'un fluide rhéofluidifiant. . . . .	21
1.5.	Contraintes caractéristiques en réponse à la déformation temporelle appliquée (a) pour : (b) un solide Hookéen parfait, (c) un fluide Newtonien et (d) un matériau viscoélastique (d'après [Macosko, 1994]). . .	22
1.6.	(a). Relaxation de contrainte pour un échantillon de polydiméthylsiloxane pour différentes valeurs de déformation. (b). Module de cisaillement temporel correspondant aux relaxations de contrainte en (a). Les données à faible déformation donnent toutes un module $G$ temporel identique (d'après [Macosko, 1994]). . . . .	23
1.7.	Modules de relaxation typiques pour différents matériaux (d'après [Macosko, 1994]). . . . .	25
1.8.	Mesures de fluage. (a). Échelon de contrainte appliqué au matériau. (b). Déformation enregistrée en fonction du temps. (c). Données représentées en tant que complaisance $J(t)$ (d'après [Macosko, 1994]). .	26
1.9.	Principe de décomposition de la contrainte en une composante $\tau'$ en phase avec la déformation, et une composante $\tau''$ en quadrature avec la déformation (d'après [Macosko, 1994]). . . . .	27
1.10.	Schéma d'une géométrie de type cylindres coaxiaux. . . . .	33
1.11.	Schéma d'une géométrie de type plans parallèles. . . . .	35
1.12.	Schéma d'une géométrie de type cône-plan. . . . .	36
2.1.	Reconstitution en 3 dimensions d'un globule rouge vu de face. . . . .	45
2.2.	Schéma de la membrane d'un érythrocyte (d'après [Anonyme, 2014]).	46
2.3.	Globules rouges agrégés observés par microscopie électronique en transmission [Chien et Jan, 1973]. . . . .	48

Table des figures

2.4.	(a) Schéma représentant l'agrégation par pontage macromoléculaire. (b) Schéma représentant l'agrégation par déplétion en macromolécule à proximité de la surface de l'érythrocyte [Baumler <i>et al.</i> , 1989]. . . . .	51
2.5.	Viscosité de sang reconstitué à hématocrite 40 % en fonction du taux de cisaillement à 25°C. Globules rouges normaux (cercles ouverts), globules rouges avec du PEG attaché en surface (carrés pleins). Les données sont moyennées sur 5 donneurs (courbes extraites de [Armstrong <i>et al.</i> , 1997]). . . . .	52
2.6.	Agrégation des globules rouges au travers de mesures de viscosité à bas taux de cisaillement en fonction de la mobilité électrophorétique de cellules traitées avec différentes enzymes (adapté depuis [Rampling <i>et al.</i> , 2004]). . . . .	55
2.7.	Indices d'agrégation pour des globules rouges de sujets normaux suspendus dans des solutions de viscosité différentes de dextrans dont le poids moléculaire varie [Neu <i>et al.</i> , 2008]. La valeur de M est calculée comme suit : En utilisant un instrument à géométrie cône plan transparente (Agrégomètre ; Myrenne, Röntgen, Allemagne) utilisant la méthode de transmission de lumière de Klose et al. Le sang est d'abord brièvement cisailé à $600 \text{ s}^{-1}$ afin de détruire les agrégats, puis le taux de cisaillement est fixé brutalement à 0, après quoi la transmission de lumière est intégrée pendant 10 s. . . . .	58
2.8.	Indices d'agrégation pour des globules rouges de sujets normaux suspendus dans du plasma autologue en fonction des indices d'agrégation des mêmes globules dans une solution de dextran 70 à 3 % [Rampling <i>et al.</i> , 2004] . . . . .	59
2.9.	Viscosité de sang total (courbe NP), de globules rouges suspendus dans une solution de 11 % albumine-Ringer (courbe NA) et de globules rouges durcis dans une solution de 11 % albumine-Ringer (HA) en fonction du taux de cisaillement (d'après [Chien, 1970]). . . . .	62
2.10.	Racine carrée de la contrainte en fonction de la racine carrée du taux de cisaillement pour du sang à hématocrite 0,40 et 2,7 g/l de fibrinogène à 37°C (d'après [Merrill et Pelletier, 1967]). . . . .	64
2.11.	Schéma illustratif expliquant la façon d'extraire la valeur du seuil de contrainte de mesures de relaxation de contrainte (d'après [Merrill <i>et al.</i> , 1963a]). . . . .	64
2.12.	Contraintes seuils estimées à partir de la valeur de contrainte à $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pour des sangs à hématocrite 0,6 d'individus atteints de sclérodémie (à gauche) et d'individus sains (à droite) (d'après [Picart <i>et al.</i> , 1999]).	67

2.13. Viscosité $\eta$ en fonction du taux de cisaillement pour du sang total à hématoците 0,45 moyennée sur 32 individus sains ; partie réelle $\eta'$ et imaginaire $\eta''$ de la viscosité complexe à 0,5 Hz en fonction du taux de cisaillement pour du sang total à hématoците 0,45 au repos (symboles pleins) et cisailé de façon constante à 0,2 s <sup>-1</sup> (symboles ouverts) moyennées sur 7 individus sains (d'après [Vlastos <i>et al.</i> , 1997]).	68
2.14. Schéma du dispositif expérimental de tubes oscillants utilisé par Thurston pour réaliser des mesures de viscoélasticité sanguine (d'après [Thurston, 1972]).	69
2.15. Module élastique $G'$ (cercles ouverts) et visqueux $G''$ (carrés pleins) en fonction de la fréquence pour du sang constitué de globules rouges resuspendus dans du plasma autologue à hématoците 0,5, et à 25°C, obtenus par une méthode de tubes oscillants (reconstitué à partir de [Thurston, 1973]).	70
2.16. Viscosité apparente $\eta_s$ , partie réelle $\eta'$ et imaginaire $\eta''$ de la viscosité complexe en fonction du diamètre du tube pour du sang constitué de globules rouges resuspendus dans du plasma autologue à hématoците 0,59, obtenues par une méthode de tubes oscillants. Les lignes représentent les données obtenues à l'aide d'un modèle prenant en compte l'existence d'une zone pariétale très cisailée, et d'une zone centrale bouchon (d'après [Thurston, 1976]).	70
2.17. Schéma explicitant les profils de vitesse lors d'un écoulement oscillatoire de sang dans des tubes. A. Cas de tubes de rayon important devant la taille caractéristique $t$ de la zone de cisaillement important. B. Cas de tubes de rayon faible devant $t$ (d'après [Thurston, 1976]).	71
2.18. Parties visqueuse et élastique de la contrainte mesurée à l'aide d'un montage de tubes oscillants sur du sang à hématoците 0,44 (d'après [Baskurt <i>et al.</i> , 2007]).	72
2.19. Parties réelles $\eta'$ et imaginaires $\eta''$ de la viscosité complexe en fonction du cisaillement effectif appliqué en oscillation à 2 Hz à du sang constitué de globules rouges resuspendus dans du plasma autologue à différents hématoцитes, et à 22°C, obtenues par une méthode de tubes oscillants (d'après [Thurston et Henderson, 2007]).	74
2.20. Viscosité relative apparente (par rapport à la viscosité de l'eau) de sang total humain en fonction de la température (d'après [Merrill <i>et al.</i> , 1963b]).	75
2.21. Viscosité relative apparente (par rapport à la viscosité de l'eau) de suspensions de globules rouges à hématoците 0,45 dans des tubes de verre de diamètre entre 3,3 et 1978 $\mu m$ (d'après [Pries <i>et al.</i> , 1992]).	77
3.1. Courbe typique obtenue par thromboélastographie, avec les différents paramètres mesurables représentés. Adapté depuis [Rivard <i>et al.</i> , 2005]	83

Table des figures

3.2. Schéma du raccordement entre l'Ares et le PC acquérant les données de mesure. . . . .	86
3.3. Schéma d'un rhéomètre à déformation contrôlée avec moteur et capteur de couple séparés. . . . .	87
3.4. Comparaison entre les modules viscoélastiques mesurés par OFR sur une huile étalon de viscosité à 3 <i>mPa.s</i> avec l'Ares-G2 installé sur une paillasse de laboratoire standard de jour (symboles rouges et bleus), et posé sur le bloc de béton de 2 tonnes la nuit (symboles noirs et gris). La limite de sensibilité théorique de l'expérience est représentée par une ligne rouge pointillée. . . . .	89
3.5. Densité spectrale d'énergie de la contrainte en fonction de la fréquence, de jour (courbes rouges) et de nuit (courbes bleues). . . . .	90
3.6. Densité spectrale d'énergie de la vitesse de vibration en fonction de la fréquence acquise à l'aide d'un sismomètre de jour et de nuit. . . . .	91
3.7. Transformée de Fourier de la contrainte mesurée sur 10 <i>s</i> sans sollicitation, sur une huile étalon de viscosité à 3 <i>mPa.s</i> avec l'Ares-G2 posé sur une table active à réduction de bruit par système pneumatique piezoélectrique activée, et non activée, ou sur un bloc de béton de 2 tonnes. . . . .	91
3.8. Modules viscoélastiques en fonction de la fréquence, mesurés sur une huile newtonienne à 3,3 <i>mPa.s</i> à 20°C à l'aide du balayage en fréquence classique implémenté sur l'Ares-G2, à l'aide de l'OFR et leurs ajustements utilisant le modèle de Bohme. . . . .	102
3.9. Modules viscoélastiques en fonction de la fréquence, mesurés par OFR sur une huile newtonienne à 4,4 <i>mPa.s</i> à 20°C, et le module visqueux théorique correspondant. . . . .	103
3.10. Schéma du modèle de Maxwell. . . . .	104
3.11. $G''$ et $G'''$ pour l'échantillon de CpCl NaSal à 5 %, avec les approximations théoriques. . . . .	105
3.12. $G''$ et $G'''$ pour l'échantillon de CpCl NaSal à 10 %, avec les approximations théoriques. . . . .	106
3.13. $G''$ et $G'''$ pour l'échantillon de CpCl NaSal à 15 %, avec les approximations théoriques. . . . .	106
3.14. $G''$ et $G'''$ pour l'échantillon de CpCl NaSal à 20 %, avec les approximations théoriques. . . . .	107
3.15. $G''$ et $G'''$ pour l'échantillon de CpCl NaSal à 25 %, avec les approximations théoriques. . . . .	107
3.16. $G''$ et $G'''$ pour l'échantillon de CpCl NaSal à 30 %, avec les approximations théoriques. . . . .	108

4.1. Modules viscoélastiques d'une suspension de globules rouges à hématocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> avec 30 <i>g/l</i> d'albumine, 3 <i>g/l</i> de fibrinogène, et 0,01 % ou 0,005 % de tween 20. La limite expérimentale du dispositif est représentée à l'aide d'une ligne pointillée rouge. . . . .	115
4.2. Modules viscoélastiques d'une suspension de globules rouges à hématocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> avec 30 <i>g/l</i> d'albumine, et 0,005 % de tween 20 (lignes) ou sans tween 20 (pointillés), avec 3 <i>g/l</i> de fibrinogène, et sans. La limite expérimentale du dispositif est représentée à l'aide d'une ligne pointillée rouge. . . .	115
4.3. Modules viscoélastiques en fonction du taux de déformation à 1 <i>Hz</i> d'une suspension de globules rouges à hématocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> avec 30 <i>g/l</i> d'albumine, 3 <i>g/l</i> de fibrinogène, 0,005 % de tween 20. . . . .	116
4.4. Évolution temporelle des modules viscoélastiques d'une suspension de globules rouges à hématocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> avec 30 <i>g/l</i> d'albumine, 3 <i>g/l</i> de fibrinogène et 0,005 % de tween 20 à 0,1 <i>Hz</i> . . . . .	117
4.5. Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> avec 30 <i>g/l</i> d'albumine, 0,005 % de tween 20, avec 0, 1, 3, ou 5 <i>g/l</i> de fibrinogène, en fonction de l'hématocrite (0,3, 0,4 ou 0,5). . . . .	120
4.6. Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges à différents hématocrites fixés dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> avec 30 <i>g/l</i> d'albumine, 0,005 % de tween 20, et 0 <i>g/l</i> , 1 <i>g/l</i> , 3 <i>g/l</i> ou 5 <i>g/l</i> de fibrinogène. . . . .	121
4.7. Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges à hématocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> , 3 <i>g/l</i> de fibrinogène, et 10 <i>g/l</i> , 20 <i>g/l</i> , 30 <i>g/l</i> ou 40 <i>g/l</i> d'albumine. . . . .	122
4.8. Modules viscoélastiques de suspensions de globules rouges à hématocrite 0,4 dans une solution de tampon HEPES à 300 <i>mOsm</i> avec 0,005 % de tween 20, 3 <i>g/l</i> de fibrinogène, 30 <i>g/l</i> d'albumine, et 0 <i>g/l</i> ou 12,5 <i>g/l</i> d'IgG. . . . .	123
4.9. Modules viscoélastiques d'un sang modèle à hématocrite 0,4, avec 30 <i>g/l</i> d'albumine et 3 <i>g/l</i> de fibrinogène, ajustés selon l'équation 4.1. . . . .	124
4.10. Paramètres du modèle empirique du sang en fonction de l'hématocrite et de la concentration en fibrinogène (voir texte pour la signification des paramètres). . . . .	125
5.1. Représentation schématique de la molécule de fibrinogène (d'après [Doolittle, 1984]) . . . . .	144

Table des figures

5.2.	Modules viscoélastiques obtenu par FTMS en fonction du temps pour différentes fréquences lors de la prise d'un caillot de sang total. D'après [Williams <i>et al.</i> , 2006] . . . . .	145
5.3.	$\tan(\delta)$ obtenu par FTMS en fonction du temps pour différentes fréquences lors de la prise d'un caillot de sang total. D'après [Evans <i>et al.</i> , 2008b] . . . . .	146
5.4.	Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur A en fonction de la fréquence et du temps. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre. . . . .	149
5.5.	Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur A en fonction du temps à différentes fréquences données. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre. . . . .	150
5.6.	Temps auquel les modules viscoélastiques se croisent en fonction de la fréquence lors de la formation d'un caillot de sang total du donneur A activé par voie de contact. . . . .	150
5.7.	Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur B en fonction de la fréquence et du temps. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre. . . . .	152
5.8.	Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total du donneur B en fonction du temps à différentes fréquences données. La coagulation a été activée par voie de contact avec la géométrie du rhéomètre. . . . .	153
5.9.	Temps auquel les modules viscoélastiques se croisent en fonction de la fréquence lors de la formation d'un caillot de sang total du donneur B activé par voie de contact. . . . .	153
5.10.	Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total en fonction de la fréquence et du temps. La coagulation a été activée par adjonction de facteur tissulaire. . . . .	155
5.11.	Modules viscoélastiques d'un caillot de sang total en fonction du temps à différentes fréquences données. La coagulation a été activée par adjonction de facteur tissulaire. . . . .	156
5.12.	Temps auquel les modules viscoélastiques se croisent en fonction de la fréquence lors de la formation d'un caillot de sang total activé par adjonction de facteur tissulaire. . . . .	156



## résumé

Le sang est un fluide complexe mis en écoulement par la pompe très peu puissante qu'est le cœur (environ  $1 W$ ), dans un réseau branché de plusieurs milliers de kilomètres de vaisseaux. Pour que cela soit réalisable, il se peut que les propriétés mécaniques du sang contribuent à l'entretien de l'écoulement. Malgré le nombre important d'études sur la rhéologie du sang, sa viscoélasticité n'a jamais été caractérisée en cisaillement simple.

Le rôle physiologique du caillot est, lui, d'éviter un épanchement excessif de sang en présence d'une brèche vasculaire. Une de ses fonctions principales est donc de résister aux contraintes générées par l'écoulement sanguin, c'est-à-dire d'avoir une résistance mécanique appropriée.

Que ce soit pour la caractérisation mécanique du sang ou du caillot, le principal verrou est l'absence de méthode de mesure adaptée à un matériau peu consistant, et dont les propriétés mécaniques sont en évolution rapide. Il est donc nécessaire de produire une méthode de mesure adéquate, couplée à un système de mesure assez sensible. Dans ce travail, nous présentons la méthode de rhéométrie que nous avons développée dans ce but, baptisée Optimal Fourier Rheometry (OFR). Cette technique a été validée avec succès sur différents matériaux modèles de plus en plus complexes : une huile newtonienne, une gomme viscoélastique (PDMS), une suspension de micelles vermiformes (CpCl Nasal) et enfin un alginate dentaire tout au long de sa gélification. Nous montrons ainsi que l'OFR est une technique de mesure fonctionnelle, fiable et optimale temporellement. Elle permet le suivi de grandeurs mécaniques dont le temps caractéristique de mutation est très inférieur à la minute.

En raison de la sédimentation des globules rouges, le sang est un fluide évoluant dans le temps. Par conséquent, l'OFR est bien adaptée pour la mesure de ses propriétés viscoélastiques. Pour nous affranchir de la variabilité très importante du sang de témoins, nous avons balayé de façon systématique la concentration en les composants sanguins les plus abondants sur des suspensions de globules rouges lavés.

De façon a priori surprenante, nous montrons qu'en présence de fibrinogène, le sang présente une élasticité importante, du même ordre de grandeur, voire plus grande que sa viscosité. Cette élasticité augmente avec la concentration en fibrinogène et l'hématocrite et provient du réseau percolé de globules rouges agrégés de dimension fractale 2,08 qui existe dans la suspension lorsqu'elle est peu cisailée.

L'OFR a également été appliquée au suivi de la coagulation activée par voie intrinsèque et extrinsèque. Cela a permis de montrer que le procédé d'activation n'avait d'effet que sur la cinétique de la réaction, mais que cela ne changeait pas les étapes mécaniques observées. L'OFR permet grâce à sa résolution fréquentielle élevée et son temps de mesure minimal, d'affirmer que le processus de coagulation du sang n'est pas une transition sol-gel.

## Abstract

Blood is a complex fluid set into flow by the heart, which is a very low power pump (approximately  $1 W$ ), in a connected network consisting of several thousand kilometers of vessels. To do so, it seems reasonable that the mechanical properties of blood contribute to the maintenance of the flow. In spite of the important number of studies on blood rheology, the viscoelasticity of blood has never been characterized in simple shear.

The physiological role of the blood clot is to avoid an excessive effusion of blood in the presence of a vascular breach. Thus, it has to resist to the stress induced by the blood flow. So, one of its essential functions is this mechanical resistance.

Whether it is for the mechanical characterization of the blood or the clot, the main obstacle is the absence of viscoelasticity measurement techniques adapted to a low viscosity material evolving rapidly in time. So, it is necessary to provide an adapted measurement method, coupled with a sensitive enough measurement.

In this work, we present the new rheometry method we developed, named Optimal Fourier Rheometry (OFR) as it is optimal both in duration and signal to noise ratio. This method was successfully validated on materials of increasing complexity : a Newtonian oil, a viscoelastic gum (PDMS), a suspension of wormlike micelles (CpCl Nasal) and a dental alginate during its gelation.

Because of the sedimentation of red blood cells, the mechanical properties of blood are evolving in time. Consequently the use of the OFR is well suited for the measurement of its viscoelastic properties. A systematic scanning of the concentrations in the most abundant blood components added to washed blood allowed to highlight the most important parameters. Our results show that blood has a surprisingly large elasticity, which is of the same order of magnitude as the viscosity of the material. This elasticity increases with fibrinogen concentration and hematocrit. When these two parameters are in the physiological range, a percolated network of aggregated red blood cells exists in the suspension of fractal dimension 2.08.

The, OFR was applied to the monitoring of blood clot formation. The activation by intrinsic and extrinsic pathway was used on whole blood. It showed that the process of activation affects only the kinetics of the reaction, but does not change the observed mechanical  $s$ . Due to its high frequency resolution and minimal measurement time, OFR shows that coagulation is not a gelation process.