



HAL
open science

Globules rouges et rotors moléculaires : vers le suivi de pathologies érythrocytaires par nanorhéologie

Alice Briole

► **To cite this version:**

Alice Briole. Globules rouges et rotors moléculaires : vers le suivi de pathologies érythrocytaires par nanorhéologie. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP7091 . tel-04556131

HAL Id: tel-04556131

<https://theses.hal.science/tel-04556131v1>

Submitted on 23 Apr 2024

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

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

Université Paris Cité

École doctorale n° 564 : Physique en Île de France

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes

**GLOBULES ROUGES ET ROTORS MOLÉCULAIRES :
VERS LE SUIVI DE PATHOLOGIES ÉRYTHROCYTAIRES
PAR NANORHÉOLOGIE**

par **Alice BRIOLE**

Thèse de doctorat de Physique

Dirigée par **Bérengère ABOU**

Présentée et soutenue publiquement le 24 Mars 2023

Devant le jury composé de

Bérengère ABOU	Chargée de recherche	Univ. Paris Cité	Directrice de thèse
Philippe CONNES	Professeur	Univ. Lyon 1	Examineur
Emmanuèle HELFER	Directrice de recherche	Univ. Aix Marseille	Rapportrice
Julien HUSSON	Professeur	École Polytechnique	Examineur
Christian WAGNER	Full professor	Univ. des Saarlandes	Rapporteur
Caroline LE VAN KIM	Professeure	Univ. Paris Cité	Membre invitée
Mickaël MARIN	Ingénieur d'étude	Univ. Paris Cité	Membre invité

RÉSUMÉ

Résumé

Nous proposons une nouvelle technique de nanorhéologie des globules rouges basée sur les rotors moléculaires, sondes fluorescentes de viscosité. Nous identifions le DASPI, un rotor moléculaire adapté à l'hémoglobine, qui pénètre spontanément dans les globules rouges. Sa sensibilité à la viscosité dans les fluides simples le rend attractif pour l'étude de pathologies érythrocytaires caractérisées par la rigidification des globules rouges. Nous étudions sa réponse dans des solutions de protéines et dans des suspensions de globules rouges. Dans les solutions de protéines, le rotor agit comme sonde d'environnement via la concentration protéinaire, plutôt que comme sonde de viscosité. Dans les globules rouges sains, le rotor permet de distinguer des globules dont la rigidité est variée par température ou entre les donneurs, fournissant la preuve de concept de notre technique de nanorhéologie intracellulaire. Nous étudions la pertinence de la nanorhéologie par rapport à l'ektacytométrie, la technique de référence des pathologies érythrocytaires. Dans le cas de la drépanocytose, nous proposons de nouveaux indicateurs qui pourraient compléter les suivis cliniques actuels.

Mots clés : globule rouge, rotor moléculaire, viscosité, nanorhéologie, microrhéologie, protéine, fluorescence, absorbance, ektacytométrie, drépanocytose

Abstract

We propose a new technique for nanorheology of red blood cells based on molecular rotors, fluorescent viscosity probes. We identify DASPI, a molecular rotor adapted to haemoglobin, which spontaneously penetrates into red blood cells. Its sensitivity to viscosity in simple fluids makes it attractive for the study of erythrocyte disorders characterised by red cell stiffening. We study its response in protein solutions and in red blood cell suspensions. In protein solutions, the rotor acts as an environment probe via protein concentration, rather than as a viscosity probe. In healthy red blood cells, the rotor allows us to distinguish between cells whose stiffness is varied by temperature or between donors, providing the proof of concept for our intracellular nanorheology technique. We investigate the relevance of nanorheology compared to ektacytometry, the reference technique for erythrocyte disorders. In the case of sickle cell disease, we propose new indicators that could complement current clinical monitoring.

Key words : red blood cell, molecular rotor, viscosity, nanorheology, microrheology, protein, fluorescence, absorbance, ektacytometry, sickle cell disease

Table des matières

Introduction	1
I Concepts et méthodes	3
Chapitre 1 Généralités	5
1.1 Rhéologie et microrhéologie	5
1.2 Le sang et ses composants	8
1.3 Globule rouge et déformabilité	12
1.4 Fluorescence	17
1.5 Rotors moléculaires	19
Chapitre 2 Matériel et méthodes	23
2.1 Préparation des solutions	23
2.2 Microscopie inversée : fluorescence et microrhéologie	26
2.3 Microscopie confocale	31
2.4 Analyse des GRs en microscopie de fluorescence	33
2.5 Analyse de corrélations	39
II Rotors moléculaires en solution	41
Chapitre 3 Le DASPI, sonde de viscosité dans les fluides simples	43
3.1 Propriétés du rotor moléculaire DASPI	43
3.2 Relation de Förster-Hoffmann dans les fluides simples	45
Chapitre 4 Le DASPI dans les protéines	49
4.1 Problématique	49
4.2 Microrhéologie dans les protéines	50
4.3 Absorbance et correction dans l'hémoglobine	51
4.4 Réponse du DASPI	56
III Rotors moléculaires dans les globules rouges	63
Chapitre 5 Incubation des globules et signal du DASPI	65
5.1 Le DASPI dans les globules rouges	65
5.2 Comprendre et interpréter le signal du DASPI	71
Chapitre 6 Nanorhéologie : preuves de concept	81
6.1 Rigidification par température	81
6.2 La MCHC comme paramètre de rigidité	86
Chapitre 7 Potentiels de la nanorhéologie	91
7.1 Contexte	91
7.2 Hétérogénéité d'une population de GRs	91
7.3 Couplage morphologie-rigidité de sous-populations	94

Chapitre 8	Étude comparative nanorhéologie et ektacytométrie	97
8.1	Contexte	97
8.2	Comparaison des techniques	98
8.3	Perspectives	104
Chapitre 9	Rotors moléculaires et globules rouges drépanocytaires	105
9.1	Contexte	105
9.2	Échantillons drépanocytaires en nanorhéologie	107
9.3	Indicateurs nanorhéologiques et perspectives	115
IV	Rhéologie de solutions de BSA	119
Chapitre 10	Rhéologie de solutions de BSA : dynamique lente de sphères molles	121
10.1	Contexte	121
10.2	Généralités	122
10.3	Article : Slow and fluctuating dynamics of concentrated solutions of BSA proteins . . .	125
	Conclusion générale et perspectives	135
	Bibliographie	137

INTRODUCTION

Les globules rouges (GRs), aussi appelés érythrocytes, sont des cellules sanguines qui ont pour rôle principal le transport d'oxygène dans l'organisme. Pendant leur durée de vie de 120 jours, les GRs sous écoulement sont soumis à des cisaillements élevés et passent par des capillaires dont le diamètre est parfois inférieur au leur. Par conséquent, il est essentiel que les GRs soient capables de se déformer de manière répétée et réversible.

Certaines pathologies érythrocytaires sont marquées par une rigidification des GRs, au niveau membranaire (la sphérocytose héréditaire par exemple), d'autres également au niveau intracellulaire (la drépanocytose par exemple). Depuis les années 1970, il existe des techniques de mesure de déformabilité des GRs mais peu s'intéressent aux propriétés intracellulaires. La mise en œuvre de techniques classiques de rhéologie dans des compartiments cellulaires n'étant pas évidente, ce projet a débuté avec l'idée d'utiliser des sondes fluorescentes de viscosité, appelées rotors moléculaires, dans les globules rouges. Par leur taille nanométrique, ils pénètrent dans les cellules et sont donc particulièrement attractifs pour la rhéologie intracellulaire.

En Avril 2019, je suis arrivée au laboratoire pour mon stage de M2, sur le projet ambitieux d'utiliser de tels biomarqueurs dans les globules rouges pour le suivi de pathologies érythrocytaires. Des expériences réalisées entre les laboratoires MSC et Sys2Diag (Montpellier) avaient permis l'identification d'un rotor moléculaire, le DASPI. Plus tard, le rotor a été introduit dans les GRs en collaboration avec le LIPhy (Grenoble). Ce projet hautement pluridisciplinaire et expérimental a pris son essor au cours de mon stage et de ma thèse. Je me suis dans un premier temps familiarisée avec les rotors moléculaires en caractérisant leurs réponses dans des fluides simples et dans des solutions de protéines. J'ai ensuite montré que le rotor pénétrait dans les GRs et qu'il était sensible à des variations de rigidité entre cellules. Nous avons alors attribué le mot nanorhéologie à l'utilisation du DASPI comme sonde de rigidité des GRs, et plus largement à notre nouvelle technique. À ce stade, nous avons débuté une collaboration avec le laboratoire BIGR de l'INSERM, spécialistes des pathologies du globule rouge, et avec des cliniciennes de l'hôpital Necker impliquées dans le suivi d'enfants drépanocytaires. Au sein de cette collaboration, nous avons pu étudier la pertinence de notre technique en comparaison à l'ektacytométrie, technique de référence de mesure de déformabilité des GRs en recherche clinique. Des premières expériences exploratoires m'ont permis de faire le lien entre notre nouvelle technique de nanorhéologie et les applications cliniques.

Le manuscrit est composé de quatre parties.

Dans la première partie, nous apportons les notions fondamentales à la compréhension des parties suivantes (Chapitre 1) et présentons les dispositifs expérimentaux et les méthodes communes aux expériences réalisées (Chapitre 2).

Dans la deuxième partie, nous proposons des études de calibration du rotor moléculaire DASPI dans des fluides simples (Chapitre 3), et dans des solutions de protéines (Chapitre 4), avec un intérêt particulier pour l'hémoglobine, majoritairement présente dans les globules rouges.

Dans la troisième partie, nous nous intéressons à l'utilisation du rotor moléculaire DASPI dans des globules rouges. Le Chapitre 5 étudie la pénétration du rotor dans les GRs sains et le signal de fluorescence en résultant. Le Chapitre 6 fournit deux preuves de concept de la sensibilité du rotor à la rigidité cellulaire. Le Chapitre 7 s'intéresse aux potentiels de la technique comme outil de

caractérisation d'échantillons sanguins. Le Chapitre 8 fournit une étude comparative entre la nanorhéologie et la technique d'ektacytométrie. Enfin, le Chapitre 9 s'intéresse à l'étude de globules rouges drépanocytaires avec la nanorhéologie.

Dans la quatrième et dernière partie (Chapitre 10), nous présentons les résultats d'une étude annexe au principal fil directeur. Il s'agit d'une étude rhéologique sur des suspensions de protéines – la BSA – concentrées. Nous nous intéressons à la dynamique lente et aux mouvements collectifs observés dans ces solutions. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article récemment soumis.



CONCEPTS ET MÉTHODES

1

GÉNÉRALITÉS

Le travail réalisé au cours de cette thèse est un travail pluridisciplinaire faisant appel à des domaines variés. Chaque domaine étant extrêmement vaste, ce premier chapitre a pour objectif de restituer les notions fondamentales à la compréhension des chapitres suivants.

1.1	Rhéologie et microrhéologie	5
1.2	Le sang et ses composants	8
1.2.1	Le sang	8
1.2.2	Le globule rouge	8
1.2.3	L'hémoglobine	10
1.3	Globule rouge et déformabilité	12
1.3.1	Mesure de déformabilité	12
1.3.2	Paramètres de contrôle de rigidité	15
1.4	Fluorescence	17
1.4.1	Principe physique	17
1.4.2	Rendement quantique	18
1.4.3	Sondes de fluorescence	19
1.5	Rotors moléculaires	19
1.5.1	Aspects structuraux et diagramme énergétique	19
1.5.2	Sonde de viscosité	20
1.5.3	Attrait pour les rotors moléculaires et applications	21

1.1 Rhéologie et microrhéologie

J'introduis ici quelques concepts sur la rhéologie en général, et sur la microrhéologie de suivi de particules, technique utilisée au cours de ma thèse.

Qu'est-ce que la rhéologie?

La rhéologie est l'étude de l'écoulement et de la déformation d'un matériau sous l'action d'une contrainte ou déformation. La rhéologie repose sur des théories qui décrivent les matériaux idéaux.

- Robert Hooke (1635-1703) décrit le comportement d'un solide élastique idéal qui se déforme proportionnellement à la force qui lui est imposée. La relation contrainte σ - déformation ϵ est donnée par la loi de Hooke et fait apparaître un module élastique, aussi appelé module de Young E :

$$\sigma = E \cdot \epsilon \quad (1.1)$$

- Isaac Newton (1643-1727) décrit le comportement d'un liquide idéal qui s'écoule tant qu'une contrainte lui est appliquée. La relation contrainte σ - taux de déformation $\dot{\epsilon}$ fait apparaître une viscosité η qui représente la résistance à l'écoulement :

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\epsilon} \quad (1.2)$$

η s'exprime classiquement en mPa.s. Pour les fluides dits Newtoniens, la viscosité η ne dépend pas de la contrainte imposée. C'est le cas pour l'eau ou le miel.

La plupart des matériaux ne sont ni des solides idéaux, ni des liquides idéaux, et présentent des comportements plus riches. On parle alors de fluides complexes. Ils sont souvent constitués de polymères, de molécules chargées ou de composants solides en suspension. On trouve par exemple des matériaux rhéo-épaississants ou rhéo-fluidifiants dont la viscosité dépend du taux de déformation. Certains matériaux ont des comportements à la fois visqueux et élastique, ce sont les matériaux visco-élastiques. Dans ce dernier cas, la réponse du fluide dépend de l'échelle de temps d'observation. On définit alors un module élastique complexe, $G^* = G' + iG''$, dont on distingue la partie réelle G' appelée module élastique de la partie imaginaire G'' appelée module visqueux.

Les propriétés rhéologiques d'un matériau sont classiquement mesurées avec un rhéomètre. Le matériau est cisailé dans une cellule de mesure (cylindres coaxiaux, plan-plan, cône-plan) et l'appareil détermine la relation entre la contrainte et la déformation. Pour un fluide, le volume nécessaire pour faire une mesure est de l'ordre du millilitre. Les situations dans lesquelles les rhéomètres traditionnels sont difficiles à utiliser ont encouragé le développement de nouvelles techniques et ces techniques ont étendu la variété de matériaux pouvant faire l'objet de mesures rhéologiques. La microrhéologie s'intéresse aux paramètres rhéologiques de la matière à l'échelle "micro" et permet d'étudier des fluides dont on ne dispose que d'un faible volume, de l'ordre du microlitre. La technique consiste à sonder la matière à l'aide de microsondes (billes, bâtonnets, aiguilles) insérées en solution. Par analogie avec la rhéométrie classique, il s'agit de déterminer la relation entre la contrainte et la déformation à l'échelle de la sonde. La microrhéologie est particulièrement intéressante pour étudier des fluides et milieux biologiques [1-5], ainsi que pour accéder aux hétérogénéités des propriétés rhéologiques d'un échantillon [6-8]. Quand les mesures de microrhéologie sont réalisées en appliquant une contrainte extérieure pour déplacer les microsondes (pince optique ou champ magnétique par exemple), on parle de microrhéologie active. Quand elles sont réalisées en mesurant le déplacement des microsondes par agitation thermique (mouvement Brownien), on parle de microrhéologie passive [9]. Au cours de ma thèse, nous avons utilisé une technique de microrhéologie passive de suivi de particules.

Microrhéologie de suivi de particules

La microrhéologie de suivi de particules consiste à mesurer par vidéo-microscopie le déplacement de microsondes par agitation thermique. Leur déplacement quadratique moyen $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$, également noté MSD, est alors calculé. On le définit par :

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = \left\langle \sum_{i=1}^d [r_{i,j}(t+\tau) - r_{i,j}(t)]^2 \right\rangle_{t,j} \quad (1.3)$$

où d représente la dimension spatiale et $r_{i,j}(t)$ la $i^{\text{ème}}$ coordonnée spatiale de la microsonde j à l'instant t .

Dans le cas de microsondes sphériques de rayon R , nous décrivons la réponse en microrhéologie – fonction $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ – de fluides purement visqueux, de fluides visco-élastiques et de matériaux purement élastiques.

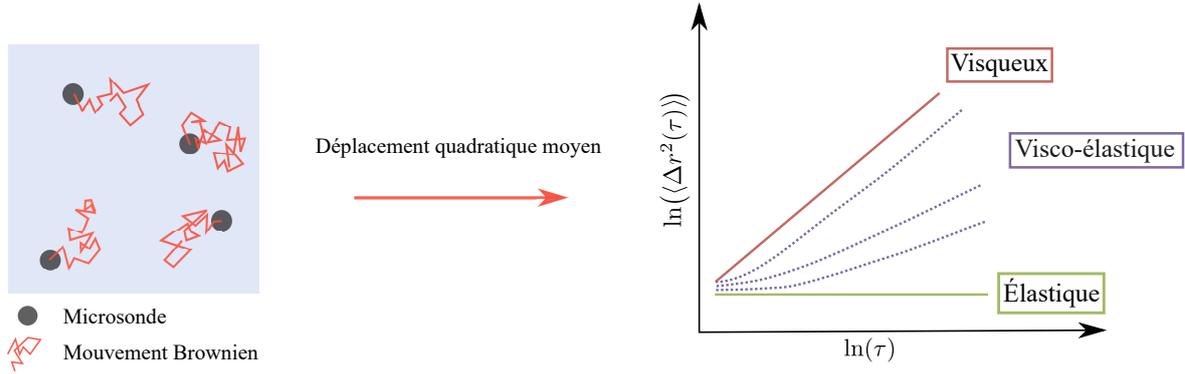


FIGURE 1.1 – **Microrhéologie de suivi de particules.** Des microsondes sont insérées en solution et se déplacent par agitation thermique (mouvement Brownien). Selon si le matériau est visqueux, visco-élastique ou élastique, la courbe du déplacement quadratique moyen prend une signature particulière. Les exemples présentés ici sont non-exhaustifs.

- Dans le cas d'un fluide purement visqueux, le mouvement des microsondes est diffusif et le MSD s'écrit :

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = 2dD\tau \quad (1.4)$$

avec D le coefficient de diffusion des microsondes dans le fluide. Le coefficient de diffusion est donné par la relation de Stokes-Einstein [10] :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (1.5)$$

avec T la température en Kelvin. Ainsi, tracer $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ en fonction de τ permet de mesurer D puis η .

- Dans le cas de fluides visco-élastiques, le MSD n'est plus linéaire avec τ . La relation de Stokes-Einstein s'écrit sous une forme généralisée dans le domaine de Laplace [11] :

$$\langle \tilde{\Delta r}^2(s) \rangle = \frac{dk_B T}{3\pi R s \tilde{G}(s)} \quad (1.6)$$

avec s la variable complexe de Laplace. Différentes méthodes calculatoires permettent d'extraire G' et G'' à partir de $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ [12].

- Dans le cas d'un milieu purement élastique de module de Young E , le déplacement des microsondes atteint un maximum lorsque l'énergie thermique $k_B T$ est égale à l'énergie élastique. Ceci se traduit par l'apparition d'un plateau sur la courbe de MSD aux temps longs [9] :

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle_{\tau \rightarrow \infty} = \frac{dk_B T}{3\pi R E} \quad (1.7)$$

On trouve donc des relations du type $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle \sim \tau^\alpha$ avec $\alpha = 1$ dans le cas purement visqueux et $\alpha = 0$ dans le cas purement élastique. Des écarts de α à ces valeurs entières indiquent un processus de relaxation visco-élastique dans le milieu [9]. Dans ce cas, la pente du MSD pourra être analysée par morceau, et interprétée en rapport avec l'échelle de temps considérée. Le principe de la microrhéologie passive de suivi de particules et des exemples non-exhaustifs de MSDs dans les différents types de fluides sont présentés en Figure 1.1.

1.2 Le sang et ses composants

1.2.1 Le sang

Dans cette thèse, nous nous intéressons uniquement au sang humain. Il s'agit du liquide biologique circulant dans le système vasculaire. Ses fonctions sont vitales car il transporte l'oxygène des poumons vers les différents organes ainsi que les éléments nutritifs et les déchets des cellules de l'organisme. D'un point de vue physique, c'est une suspension de cellules dans un fluide aqueux, le plasma. Il peut donc être décrit comme un fluide complexe. Les cellules sanguines sont les globules rouges (GRs), les globules blancs et les plaquettes sanguines.

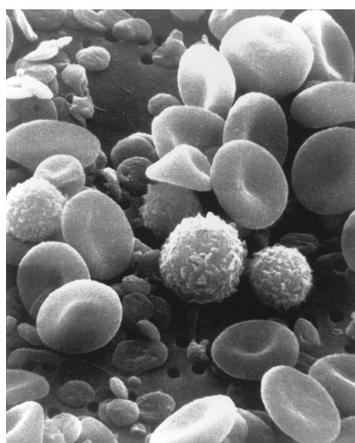


FIGURE 1.2 – **Cellules sanguines.** Image prise en 1982 par Wetzel B. et Schaefer H. au microscope à balayage électronique. On reconnaît les globules rouges par leur forme biconcave, les globules blancs par leur taille importante, leur forme sphérique et leur surface granuleuse et les plaquettes sanguines par leur plus petite taille. Source : <http://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=2129>.

Le plasma représente environ 55% du volume total du sang. Il est composé majoritairement d'eau (90%), de protéines (8%) et de sels (2%). Le pH du sang dans l'organisme est maintenu autour de 7,4.

Les globules rouges (GRs) – aussi hématies ou érythrocytes – représentent environ 98% des cellules sanguines et ont pour rôle principal le transport d'oxygène dans le corps. La fraction volumique de globules rouges dans le sang varie d'un individu à l'autre et se quantifie par l'hématocrite notée Ht. Une hématocrite normale se situe entre 37% et 52% [13].

Les globules blancs – ou leucocytes – sont les acteurs principaux du système immunitaire. Ils luttent de manière coordonnée contre les agressions d'organismes pathogènes extérieurs. Ils ne représentent que 0,4% du volume sanguin.

Les plaquettes sanguines – ou thrombocytes – agissent dans la coagulation sanguine. Elles s'activent en cas de lésion vasculaire afin de stopper l'hémorragie. Elles représentent environ 0,1% du volume sanguin.

1.2.2 Le globule rouge

Les globules rouges sont formés dans la moelle osseuse et perdent leur noyau avant d'entrer en circulation, ce qui leur confère leur forme caractéristique de discoïde biconcave (Figure 1.3). Contrairement aux autres cellules, les globules rouges ne possèdent ni noyau, ni organites. Ils sont souvent représentés comme un sac – la membrane – contenant une solution d'hémoglobine. Il s'agit donc d'une des cellules les plus simples du corps humain.

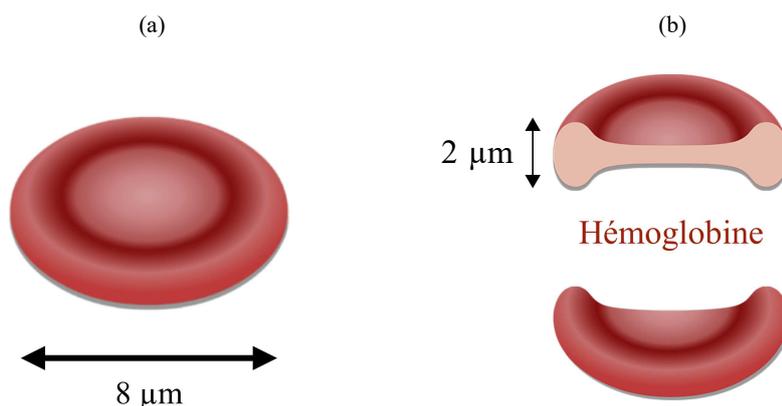


FIGURE 1.3 – **Schéma d'un globule rouge.** (a) Vue de dessus. (b) Vue de côté. La membrane renferme une solution d'hémoglobine de concentration comprise entre 30 g/dL et 36 g/dL. Le diamètre d'un globule rouge est de l'ordre de 8 µm et la hauteur de l'ordre de 2 µm.

Le rôle principal des GRs est le transport d'oxygène. La forme discocytaire permet d'optimiser les échanges au sein des vaisseaux capillaires grâce à un rapport surface/volume maximisé. Le volume d'un GR est de 95 ± 10 fL pour une surface de 135 ± 12 µm² [14]. Cette surface est supérieure de 40% à celle d'une cellule sphérique de même volume [15]. Le diamètre d'un GR est proche de 8 µm, et l'épaisseur de 2 µm. Le diamètre des GRs est supérieur à celui des capillaires dans lesquels ils circulent, typiquement 2 à 5 µm. La déformabilité des GRs est donc primordiale pour assurer une bonne circulation. La durée de vie moyenne des globules rouges en circulation est de 120 jours. C'est la rate qui élimine les globules rouges anciens et/ou endommagés de la circulation sanguine.

La membrane constitue l'enveloppe du globule rouge. Elle est formée d'une bicouche lipidique dans laquelle se trouvent différentes protéines de surface. Un cytosquelette – réseau de spectrine – tapisse la partie interne de la membrane. La bicouche lipidique sert de barrière au milieu extracellulaire et régule le passage de molécules tels que les ions et l'hémoglobine. Le réseau de spectrine sert au maintien de la structure de la cellule.

Si la majorité des globules rouges sont discocytaires, d'autres morphologies peuvent être observés chez des individus atteints de maladie érythrocytaire ou lorsque les conditions de stockage ou d'observation des suspensions sanguines ne sont pas adéquates. Nous décrivons certaines formes observées au cours de ma thèse, des images sont présentées en Figure 1.4.

- Les échinocytes : ce sont des GRs possédant sur leur surface des spicules fins et régulièrement répartis (Figure 1.4-(b)). Les échinocytes sont souvent observés suite à une trop longue conservation du sang, ou lorsque les GRs sont à proximité d'une surface chargée, une lame de verre non traitée par exemple.
- Les sphérocytes : ce sont des GRs denses et sphériques de taille réduite (Figure 1.4-(c)). On peut en fabriquer artificiellement par traitement thermique (voir section 1.3.2). Ils sont présents dans certaines pathologies, la plus connue étant la sphérocytose héréditaire.
- Les fantômes (ghost en anglais) : ce sont des GRs totalement vidés de leur contenu en hémoglobine (Figure 1.4-(d)). On les observe suite à la lyse des globules, c'est à dire la destruction de la membrane provoquant la mort de la cellule.

- Les globules rouges falciformes : ce sont des GRs observés chez les individus atteints de la drépanocytose. Les globules sont allongés en forme de faucille (Figure 1.4-(e)).

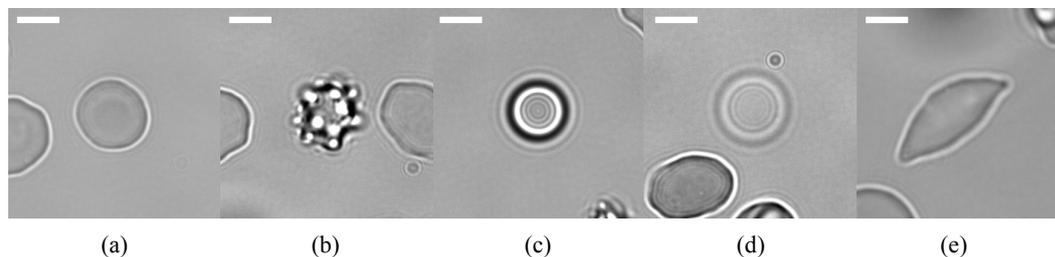


FIGURE 1.4 – **Différentes morphologies du globule rouge.** (a) Biconcave, (b) échinocyte, (c) sphérocyte, (d) fantôme, (e) falciforme. Images réalisées au microscope optique au grossissement X100. Échelle : 5 µm.

1.2.3 L'hémoglobine

L'hémoglobine est la protéine majoritairement présente dans le cytosol d'un globule rouge. Elle est responsable de la couleur rouge des globules et du sang. Elle permet le transport de l'oxygène et participe à l'élimination du dioxyde de carbone. L'hémoglobine est un tétramère constitué de quatre chaînes « globines » identiques deux à deux : deux chaînes de globine α et deux chaînes de globine non- α . Il existe plusieurs hémoglobines que l'on trouve aux différents stades de développement de l'être humain et qui se distinguent par la nature des chaînes globines :

- Chez le fœtus, les globules rouges contiennent différentes sortes d'Hb embryonnaires (Gower 1, Gower 2, Portland 1) pendant les 3 premiers mois, puis l'hémoglobine fœtale HbF apparaît et devient prédominante. Les chaînes non- α de l'HbF sont des chaînes γ .
- Après la naissance et passé un an, l'HbF ne persiste qu'à l'état de traces (< 1%), sauf chez des individus atteints de pathologies particulières telles que la drépanocytose. Chez les individus sains, l'HbA devient alors majoritaire et atteint son taux définitif de 95-98%. L'HbA est composée de deux chaînes α et deux chaînes β . Il existe une variante de l'hémoglobine HbA, l'hémoglobine l'HbA₂, formée de deux chaînes α et deux chaînes δ . L'HbA₂ représente environ 2,5% de l'hémoglobine totale tout au long de la vie.

La Figure 1.5 résume sous forme de diagramme la proportion relative des diverses hémoglobines chez le fœtus et l'enfant. Dans cette thèse, les dénominations "hémoglobine" et "Hb" feront appel à l'HbA et nous spécifierons explicitement lorsque nous parlerons d'hémoglobine HbF ou HbS (Sickle Hemoglobin dans la drépanocytose).

La structure tri-dimensionnelle d'une molécule d'hémoglobine est présentée en Figure 1.6-(a). On retrouve les deux chaînes α et les deux chaînes β . Au centre de chaque chaîne se trouve une poche hydrophobe dans laquelle est logée une molécule d'hème (Figure 1.6-(b)). Quand l'hème s'unit à une molécule d'oxygène, on parle d'oxyhémoglobine. Quand l'hème s'unit à une molécule de dioxyde de carbone, on parle de carbhémoglobine. L'hémoglobine forme ainsi une protéine globulaire, caractérisée par une forme 3D sphérique et compacte, de masse molaire $M_{Hb} = 64$ kDa [16] et de dimensions $6 \times 5 \times 5$ nm [17].

La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine dans un globule rouge, notée MCHC, est proche de 33 g/dL et varie d'un individu à l'autre. L'hémoglobine est décrite comme un fluide purement visqueux et, autour des concentrations physiologiques, typiquement 30-36 g/dL, une faible variation de concentration induit une grande variation de viscosité, de 6 à 20 mPa.s [18] comme illustré en Figure 1.7. On comprend donc qu'il existe une hétérogénéité de viscosité intracellulaire au sein même d'un échantillon mais également entre individus.

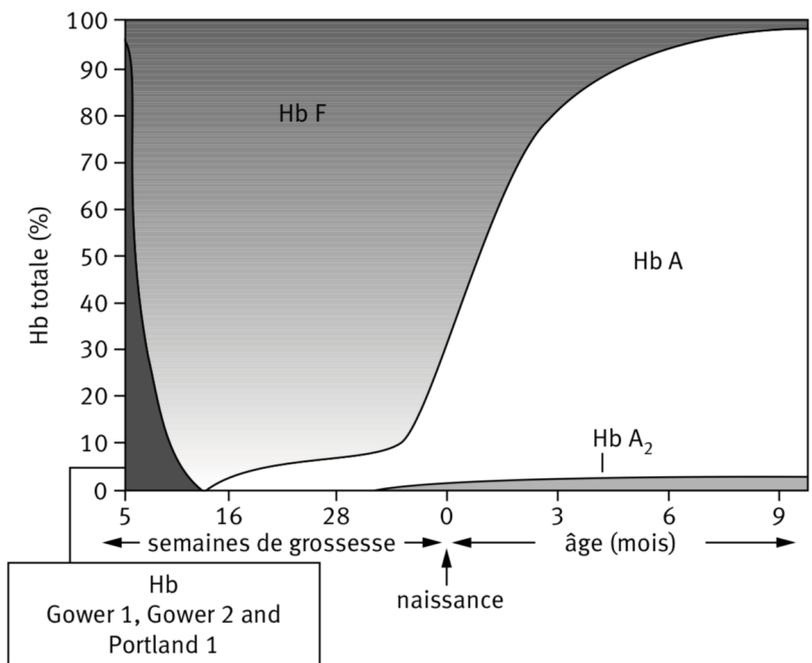


FIGURE 1.5 – **Hémoglobines chez le fœtus et l’enfant.** Les pourcentages des différentes hémoglobines présentes chez le fœtus et chez l’enfant jusqu’à 9 mois sont représentés sur ce diagramme. Source : <https://www.lab-cerba.com/files/live/sites/Cerba/files/documents/FR/0273F.pdf>.

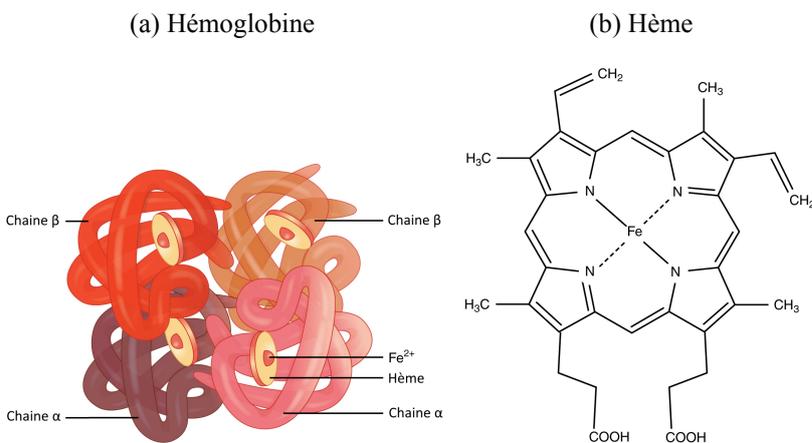


FIGURE 1.6 – **Hémoglobine et hème.** (a) Structure tri-dimensionnelle de l’hémoglobine. (b) Représentation d’une molécule d’hème. Figure adaptée de <https://fr.wikipedia.org/wiki/Érythropoïèse>.

La courbe caractéristique $\eta(c)$ de l’hémoglobine présentée en Figure 1.7 a été obtenue et étudiée par plusieurs groupes [19-22]. Comme pour d’autres protéines globulaires, les données expérimentales s’ajustent très bien sur toute la gamme de concentration selon un modèle de Mooney, ou de quasi-sphères dures [23] :

$$\eta(c) = \eta_0 \cdot \exp \left[\frac{[\eta] \cdot c}{1 - (k/v) \cdot [\eta] \cdot c} \right] \tag{1.8}$$

avec η_0 la viscosité du milieu suspensif, $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{1}{c} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$ la viscosité intrinsèque, k un facteur d’encombrement et v un facteur de forme.

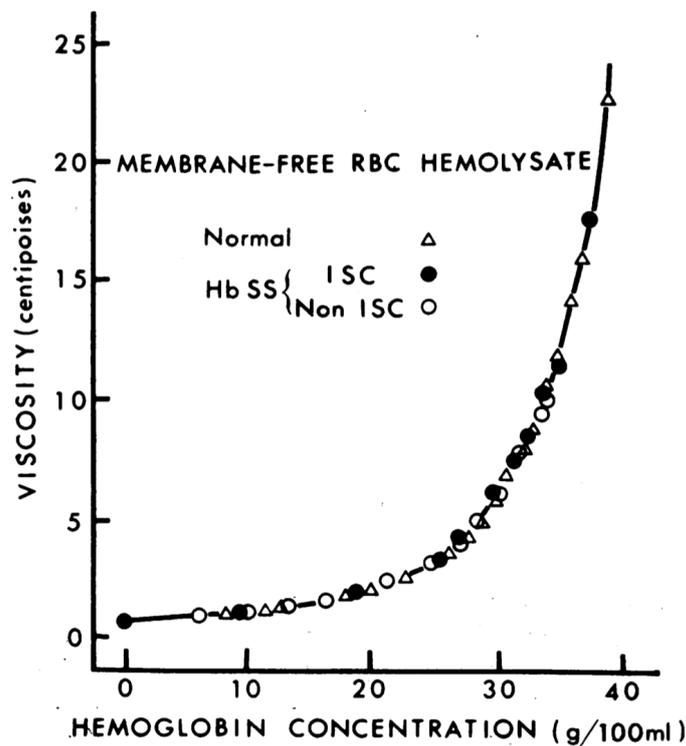


FIGURE 1.7 – **Viscosité de l'hémoglobine.** Viscosité de solutions d'hémoglobine en fonction de la concentration. L'hémoglobine est issue de la lyse de globules sains (Δ) et drépanocytaires (\circ et \bullet). Les ronds vides correspondent à l'Hb issue de globules faucilles réversibles, les ronds pleins correspondent à l'Hb issue de globules faucilles irréversibles (voir le paragraphe sur la drépanocytose). Résultats de Chien et al. [18].

1.3 Globule rouge et déformabilité

La rigidité et la déformabilité d'un globule rouge sont intrinsèquement liées. Elles dépendent des propriétés physiques des GRs dont notamment :

- Le rapport surface sur volume, S/V. Un globule rouge au repos adopte une forme de discoïde biconcave avec un rapport S/V maximisé et 1,5 fois supérieur à celui d'une sphère de même volume. Toute diminution de ce rapport contribue à réduire la déformabilité des globules [24, 25]. C'est le cas pour la sphérocytose héréditaire où les GRs sont sphériques, et en cas d'infection au virus de la malaria (paludisme) qui entraîne une augmentation du volume des GRs [26, 27].
- La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine, MCHC. Elle détermine la viscosité cytoplasmique qui affecte la rigidité des GRs [28]. L'augmentation de MCHC est associée à une réduction de la déformabilité.
- Les propriétés rhéologiques des membranes. Elles sont quantifiées par des modules visco-élastiques et influencent directement la déformabilité et la rigidité des GRs [29].

1.3.1 Mesure de déformabilité

Il existe aujourd'hui un certain nombre de méthodes permettant de mesurer la déformabilité du globule rouge en réponse à une force extérieure. Nous présentons quelques méthodes de référence sur cellule individuelle et sur échantillon sanguin global.

Mesure sur cellule individuelle

Les mesures sur cellules individuelles s'intéressent principalement aux mesures des paramètres rhéologiques de membranes. On retrouve notamment l'aspiration par pipette développée par Evans dans les années 1975 [30], largement utilisée ensuite [31-34], les pinces optiques [35-37], le microscope à force atomique [38-40] et la microrhéologie magnétique [41, 42] dont les principes sont présentés en Figure 1.8. Ces techniques sont intéressantes dans un contexte de recherche fondamentale de par leur sensibilité et précision mais nécessitent parfois un équipement lourd. De plus, elles ne sont pas adaptées à une étude statistique, comme la caractérisation d'une population de globules, ni à l'analyse clinique de routine.

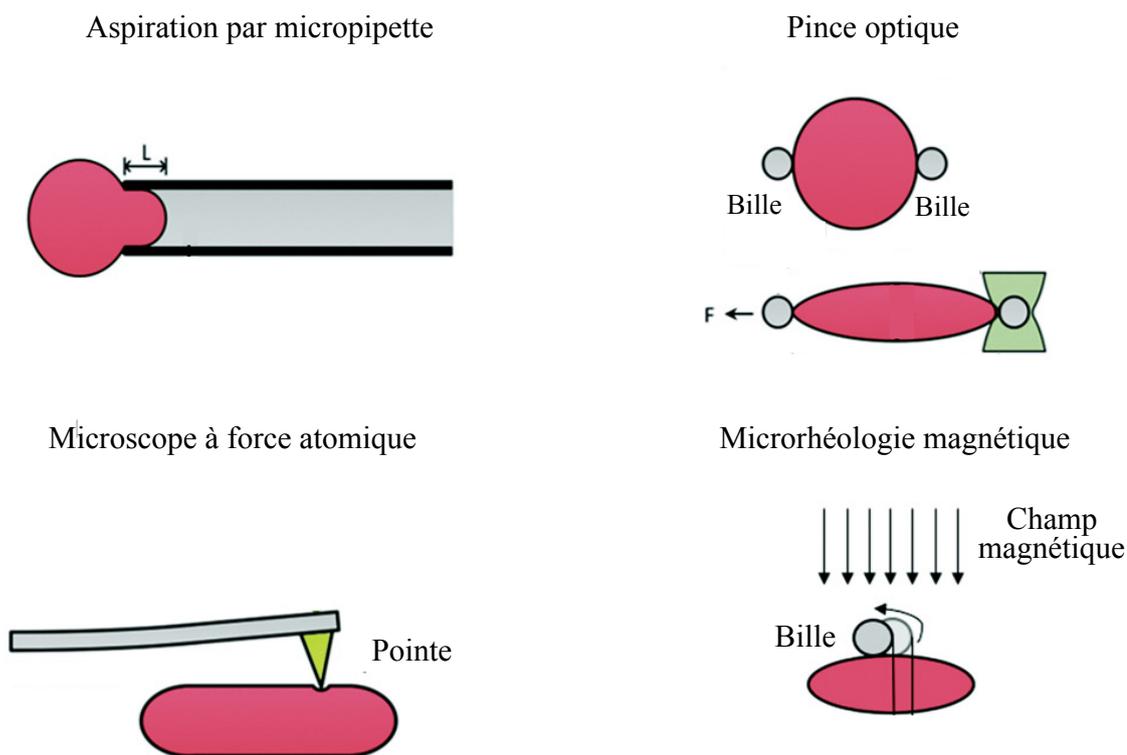


FIGURE 1.8 – **Mesure de déformabilité sur globule rouge individuel.** L'aspiration par micropipette consiste à déformer la cellule en l'aspirant dans une micropipette et quantifier la longueur de pénétration pour une pression donnée. Les pinces optiques consistent à attacher deux microbilles à un GR avec deux pièges optiques. L'une est maintenue fixe et, sur l'autre, une force est appliquée afin de déformer le globule. La microscopie à force atomique consiste à déformer la surface du GR avec une pointe de précision pour mesurer la relation contrainte - déformation. La microrhéologie magnétique consiste à déplacer une bille magnétique attachée à la surface d'un GR avec un champ magnétique pour exercer une déformation. Figure adaptée de [43].

Mesure sur échantillon total

Les méthodes de mesure de déformabilité sur échantillon sanguin total permettent d'examiner des centaines ou milliers de cellules au cours d'une seule expérience. Ces techniques évaluent la déformabilité moyenne d'un échantillon. Aujourd'hui, la méthode de référence est l'ektacytométrie : développée dans les années 1980, elle se base sur la diffraction de lumière à travers un échantillon de sang sous cisaillement. Les globules sont en suspension dans un milieu visqueux et

introduits dans un espace entre deux surfaces rotatives qui appliquent une contrainte de cisaillement à la suspension. Un faisceau laser traverse la suspension et crée un motif de diffraction qui reflète la forme moyenne de centaines ou de milliers de globules (Figure 1.9). Le motif de la figure de diffraction est ajusté par une ellipse de grand axe a et petit axe b . On définit alors un indice d'élongation noté EI qui décrit la déformabilité moyenne des globules rouges de l'échantillon :

$$EI = (a - b) / (a + b) \quad (1.9)$$

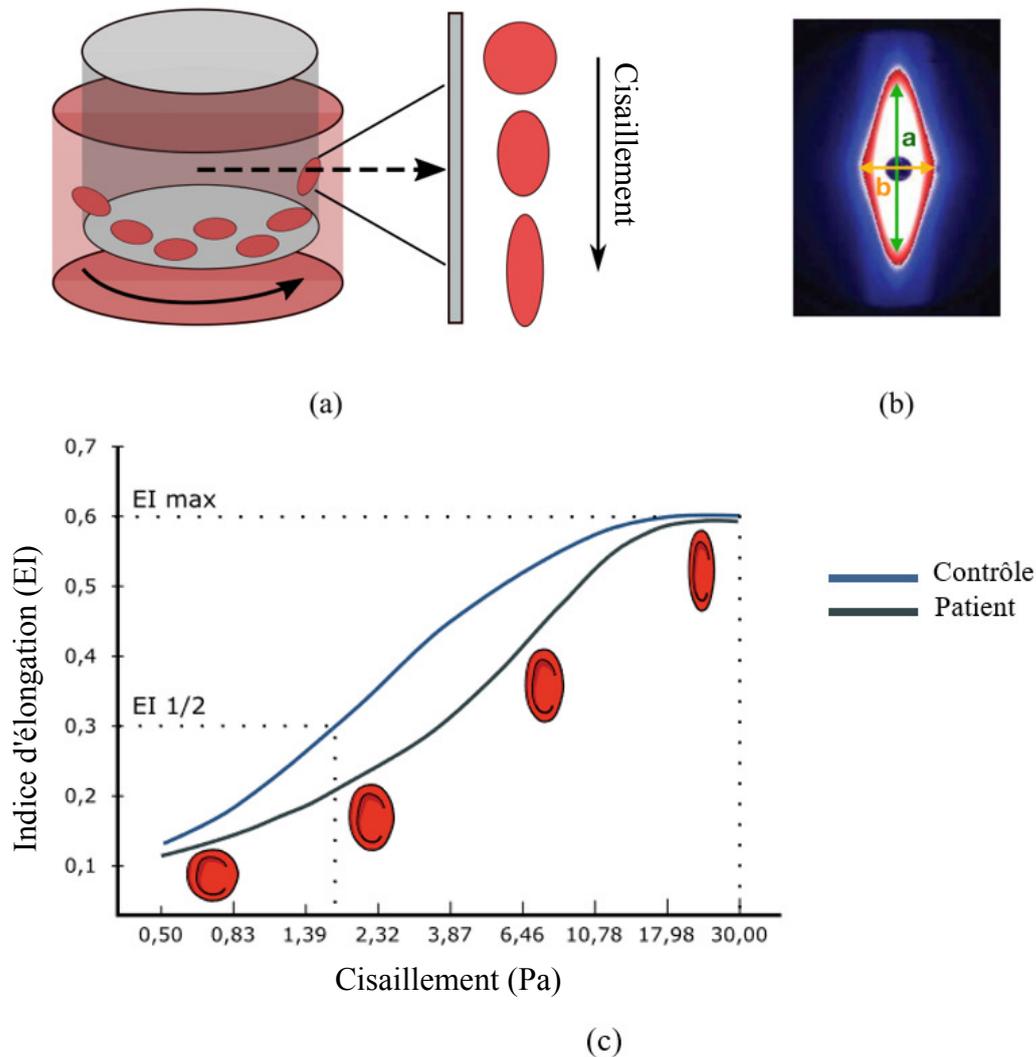


FIGURE 1.9 – **Ektacytométrie.** (a) Représentation du système expérimental. Les globules rouges sont cisailés et s'allongent sous la contrainte. Un faisceau laser traverse l'échantillon. (b) Figure de diffraction typique obtenue lorsque le faisceau laser traverse l'échantillon. Nous identifions les grands et petits axes de l'ellipse, respectivement a et b . (c) Courbe typique obtenue en ektacytométrie pour un échantillon témoin et pour un patient dont la déformabilité moyenne des globules est réduite (adaptée de https://rrmechatronics.com/wp-content/uploads/2015/05/LR_lorrca_2015.pdf).

L'ektacytométrie est devenue la méthode clinique de référence pour tester la déformabilité des GRs et peut être utilisée en conditions isotonique (pression osmotique égale de part et d'autre des membranes des GRs) ou en variant l'osmolarité du milieu suspendant. Une courbe typique d'ektacytométrie en conditions isotoniques représente l'indice d'élongation mesuré en fonction

du cisaillement (Figure 1.9-(c)). Bien qu'une telle courbe fournisse des informations sur la déformabilité des GRs sur une large gamme de cisaillement, une difficulté est de savoir à quel niveau comparer différentes courbes entre elles. Souvent, la courbe d'un patient est comparée à celle d'un témoin, et tout abaissement de cette courbe par rapport au témoin reflète une baisse de déformabilité. L'indice d'élongation maximal mesuré EI_{max} est également couramment utilisé comme indicateur de déformabilité. De récentes études cherchent à interpréter la courbe dans sa totalité en terme de propriétés rhéologiques. Renoux et al. [24] montrent qu'une diminution de l'indice d'élongation aux contraintes supérieures à 3 Pa peut être liée à une réduction du rapport surface/volume, à une perte de flexibilité de la membrane ou à une augmentation de la viscosité interne, tandis qu'une diminution de l'indice d'élongation en-dessous de 3 Pa refléterait une perte de flexibilité de la membrane uniquement.

Méthodes innovantes et besoins actuels

Ces dernières années, des techniques innovantes notamment de microfluidique [44-48] et de rhéométrie sous microscope (rhéoscopie) [49-51] ont été proposées pour quantifier la déformabilité au niveau cellulaire avec un grand débit. Ces techniques visent à caractériser un échantillon sanguin dans sa totalité en un temps limité et en s'intéressant aux questions d'hétérogénéité et de dispersion des propriétés des GRs au sein de l'échantillon. Ceci est particulièrement pertinent dans les cas où une population de GRs pathologiques et altérés coexiste avec une population de GRs sains. Ces techniques nécessitent actuellement un traitement d'image et une analyse relativement lourde mais cherchent à répondre au besoin actuel en terme d'applications cliniques. Notre étude se place dans ce contexte de nouvelle méthode de mesure de rigidité.

1.3.2 Paramètres de contrôle de rigidité

La rigidité du globule rouge est grandement impactée par l'environnement physico-chimique dans lequel il se trouve : l'osmolarité par exemple peut changer la forme des GRs par entrée ou sortie d'eau, et ainsi affecter les propriétés rhéologiques de la cellule [52]. En condition physiologiques normales, le processus de vieillissement des globules rouges tend à rendre les cellules plus rigides, avec une perte de volume d'environ 30% et une augmentation de concentration en hémoglobine de l'ordre de 15% [53, 54]. Enfin, il est connu que certaines pathologies érythrocytaires entraînent une modification de la morphologie des GRs associée à une augmentation de rigidité (sphérocytose héréditaire, drépanocytose). Nous présentons ici trois façons d'observer des GRs de rigidité variable qui seront étudiées au cours de cette thèse.

La MCHC

Comme expliqué plus haut, la concentration interne en hémoglobine contrôle la viscosité intracellulaire et donc la rigidité globale du globule rouge. Nous serons amenés à étudier des globules rouges issus de donneurs de MCHC et donc viscosité intracellulaire variable.

La température

On sait que l'abaissement de la température, typiquement entre 43°C et 2°C, augmente la rigidité des globules rouges à deux niveaux : la viscosité de l'hémoglobine, principal composant du cytosol, augmente [55, 56] et les membranes deviennent plus rigides [33, 57, 58]. Nous serons amenés à utiliser la température comme contrôle de rigidité externe des globules rouges.

D'autre part, le traitement thermique à plus de 50°C est connu pour induire une modification structurelle du cytosquelette se traduisant par une augmentation de rigidité des membranes et

un passage des GRs de la forme discocytaire à sphérocytaire [59-61]. Sur la Figure 1.10, nous observons au microscope optique un globule avant et après traitement thermique. Après traitement thermique il est plus arrondi et plus petit, en accord avec la géométrie sphérocytaire décrite. Nous utiliserons les sphérocytes comme des GRs témoins très peu déformables.

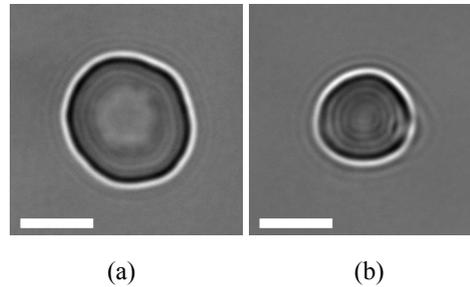


FIGURE 1.10 – **Formation de sphérocyte par traitement thermique.** Un globule rouge discocytaire (a) est chauffé à 55°C et se transforme en sphérocyte (b). Les images sont réalisées au microscope optique au grossissement X100. Échelle : 5 µm.

La drépanocytose

La drépanocytose est une maladie érythrocytaire induisant une rigidité des globules rouges plus élevée que la normale. C'est la maladie génétique la plus fréquente dans le monde avec environ 300 000 nouveau-nés par an [64]. D'après la Haute Autorité de Santé (<https://www.has-sante.fr/portail/>), c'est également la maladie génétique la plus fréquemment dépistée à la naissance en France. Elle est causée par une mutation du gène de la β -globine à l'origine de la production d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S (HbS, Sickle Hemoglobin en anglais). L'HbS possède des régions hydrophobes, qui s'associent à celles des molécules voisines sous désoxygénation, ou autre stimuli, générant des fibres rigides qui déforment et endommagent la membrane des globules rouges. Ceci conduit à la forme caractéristique de faucille du globule (Figure 1.11) et à une augmentation de la rigidité de ces derniers [65]. La polymérisation de l'HbS est réversible : les fibres disparaissent au fur et à mesure que l'oxygène est absorbé et la forme biconcave revient. Cependant, ces cycles de transformation fragilisent la membrane des globules rouges qui finissent par se déformer de manière irréversible ou qui provoquent la lyse des globules. Il en résulte plusieurs symptômes caractéristiques de la maladie dont les plus courants sont une anémie chronique (diminution de la quantité de globules rouges), des crises douloureuses vaso-occlusives (blocage des globules rouges indéformables dans les vaisseaux) et une sensibilité plus importante aux infections. Au Chapitre 9, nous testerons la pertinence de notre nouvelle technique de nanorhéologie sur des GRs drépanocytaires.

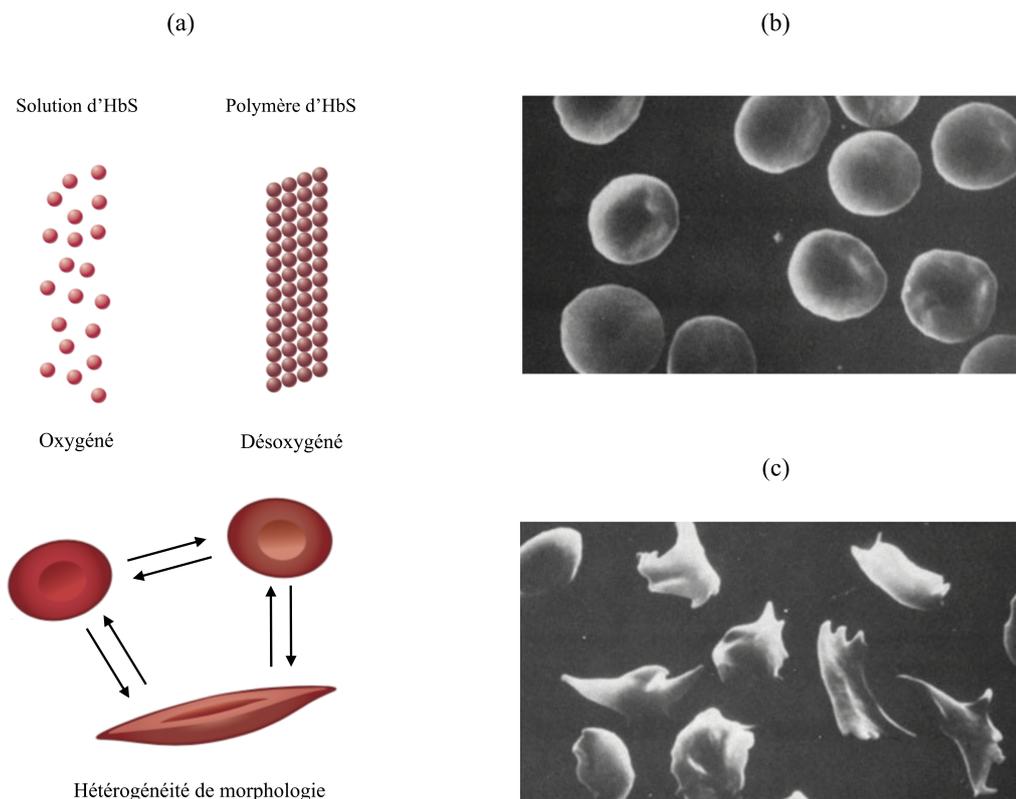


FIGURE 1.11 – **La drépanocytose.** (a) Schéma de la polymérisation de l'hémoglobine HbS sous désoxygénation, et de l'effet sur la morphologie des GRs. Adapté de [62]. (b,c) Images de globules rouges de sang drépanocytaire par microscopie électronique à balayage issues de [63]. (b) En conditions oxygénées, les globules sont biconcaves. (c) En conditions désoxygénées, certains globules prennent une forme de faucille.

1.4 Fluorescence

J'introduis ici quelques généralités sur la fluorescence. De plus amples informations peuvent être trouvées dans le livre de Bernard Valeur et Mário Nuno Berberan-Santos [66].

1.4.1 Principe physique

La fluorescence correspond au phénomène d'émission de lumière par une molécule suite à l'absorption d'une énergie lumineuse (excitation). L'absorption d'une onde électromagnétique par une molécule est soumise aux règles de la mécanique quantique. Pour qu'un photon d'énergie $h\nu$ soit absorbé, il faut que cette énergie corresponde à la différence d'énergie entre deux niveaux électroniques. Après photo-excitation, la molécule se désactive selon deux classes de processus : radiatifs ou non radiatifs.

- Les processus radiatifs correspondent à une désactivation par émission d'un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre les niveaux.
- Les processus non radiatifs correspondent aux mécanismes de relaxation qui ne sont pas associés à une émission de photon : relaxation vibrationnelle, conversion inter-système, transfert d'électron, séparation de charges, réaction chimique.

Le mécanisme de fluorescence est un processus radiatif, il correspond à une transition entre deux états de multiplicité de spin singulets, classiquement $S_1 \rightarrow S_0$, où S_0 est le niveau fondamental et S_1 le premier niveau excité. Les processus de fluorescence à partir de niveaux électroniques autres que S_1 sont extrêmement rares et donc de faible intensité. Si la molécule est excitée à un niveau électronique supérieur, elle relaxe d'abord généralement par mode vibrationnel pour atteindre le niveau S_1 . L'émission du photon de fluorescence est très rapide, de quelques picosecondes à quelques nanosecondes. Le mécanisme de phosphorescence, quant à lui, correspond au retour vers le niveau fondamental à partir d'un état triplet T_1 qui se distingue des états S par sa multiplicité de spin. Cet état T_1 est plus stable que les états S, le phénomène de désexcitation par émission d'un photon est donc plus lent, en général de l'ordre de la microseconde à la milliseconde.

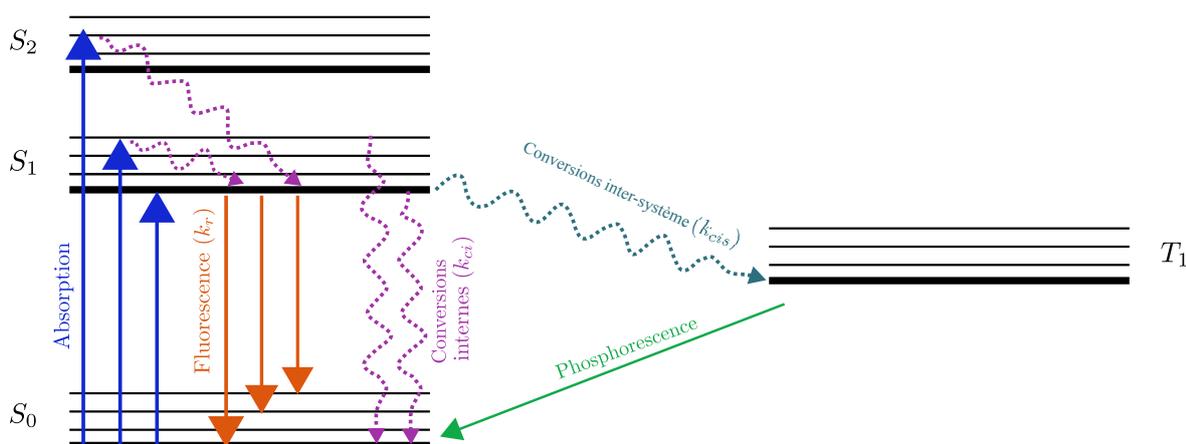


FIGURE 1.12 – **Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié.** On représente les différents niveaux énergétiques de multiplicité S et T et les processus d'excitation (absorption) et de désexcitation associés notamment à la fluorescence et la phosphorescence.

Les diagrammes de Perrin-Jablonski permettent de représenter les différents niveaux d'énergie et sauts entre ces niveaux [66, 67]. Nous en présentons un en Figure 1.12, on retrouve notamment les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence. On observe que l'énergie de l'émission de fluorescence est inférieure à celle de l'absorption car la désexcitation se fait à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité. La fluorescence se produit donc généralement à des énergies plus faibles que l'absorption. Ce phénomène, observé pour la première fois par George Gabriel Stokes en 1852, est connu sous le nom de déplacement de Stokes [68]. Il se traduit par un déplacement du spectre d'émission vers les longueurs d'onde plus élevées, ce qui facilite la détection de la lumière d'émission et sa séparation avec la lumière d'excitation.

1.4.2 Rendement quantique

Le rendement quantique de la fluorescence Φ correspond au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il peut s'écrire :

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{ci} + k_{ciis}} \quad (1.10)$$

où les différents k correspondent aux constantes de vitesse des processus de désexcitation :

- k_r : constante de vitesse pour la désactivation radiative $S_1 \rightarrow S_0$ avec émission de fluorescence;
- k_{ci} : constante de vitesse pour la conversion interne $S_1 \rightarrow S_0$;

- k_{cis} : constante de vitesse pour les conversions inter-système.

Le rendement quantique de fluorescence Φ représente donc le pourcentage de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental S_0 par un processus radiatif.

1.4.3 Sondes de fluorescence

La fluorescence est une technique très utilisée dans la recherche biologique de par la sensibilité des molécules fluorescentes à certaines propriétés physico-chimiques du milieu environnant, et la quasi-instantanéité de la mesure. Des sondes de fluorescence sont couramment synthétisées pour se lier de manière covalente à des entités choisies (surfactants, polymères, protéines, anticorps...), se localiser au niveau de certains sites spécifiques, ou bien être dissoutes en solution. Il existe une large gamme de sondes fluorescentes sensibles spécifiquement à un ou plusieurs paramètres physico-chimiques : pH, température, concentration chimique d'une espèce, potentiel de membrane cellulaire, polarité... Selon l'application désirée, le choix d'une bonne sonde de fluorescence se base sur sa spécificité de localisation, sa sensibilité aux paramètres physico-chimiques et doit prendre en compte une potentielle compétition avec la fluorescence intrinsèque du milieu.

1.5 Rotors moléculaires

1.5.1 Aspects structuraux et diagramme énergétique

Les rotors moléculaires sont une famille de molécules fluorescentes connues pour leur sensibilité à la viscosité des fluides dans lesquels ils sont introduits. D'un point de vue chimique, ils ont la particularité de former un état TICT (Twisted Intramolecular Charge Transfer) par transfert de charge lors de la photo-excitation [69]. Un rotor moléculaire est typiquement constitué de trois sous-unités :

- Une unité donneuse d'électron (D).
- Une unité acceptrice d'électron (A).
- Une unité d'espacement permettant le transfert d'électron, constituée d'un réseau de liaison simples et doubles alternées.

Ces sous-unités sont alignées à l'état fondamental et forment un état plan. Sous photo-excitation, la molécule subit un transfert de charge intramoléculaire de l'unité donneuse vers l'unité acceptrice, qui induit une torsion de la molécule pour former un état TICT (Figure 1.13).

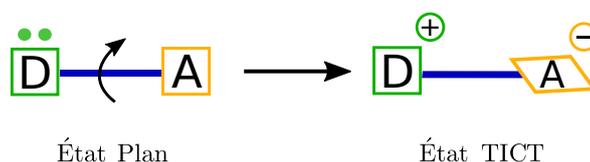


FIGURE 1.13 – **Torsion d'un rotor moléculaire sous photo-excitation.** Le transfert de charge induit une torsion de la molécule et le passage d'un état plan à un état TICT.

Les diagrammes de Perrin-Jablonski présentés en Figure 1.14 illustrent les différents états électroniques d'un rotor moléculaire. À l'état fondamental S_0 , la molécule adopte sa conformation plane, qui est la conformation de plus basse énergie. Lors de la photo-excitation à la longueur d'onde λ_{exc} , le rotor subit un transfert de charge et la molécule atteint un état plan localement excité (LE) S_1^{LE} . En raison de la séparation de charge de l'état excité, la molécule se tord autour

d'une des liaisons de l'unité d'espacement pour passer dans l'état TICT qui est l'état excité de plus basse énergie S_1^{TICT} . Pour certains rotors moléculaires, la relaxation à partir des états S_1^{LE} et S_1^{TICT} se produit par voie radiative, ce qui entraîne une double émission (Figure 1.14-(a)). D'autres rotors ont un trop petit gap énergétique $S_1^{TICT} - S_0^{TICT}$ pour que cette voie de désexcitation soit radiative, ils présentent donc une bande d'émission unique à la longueur d'onde λ_{em}^{LE} (Figure 1.14-(b)).

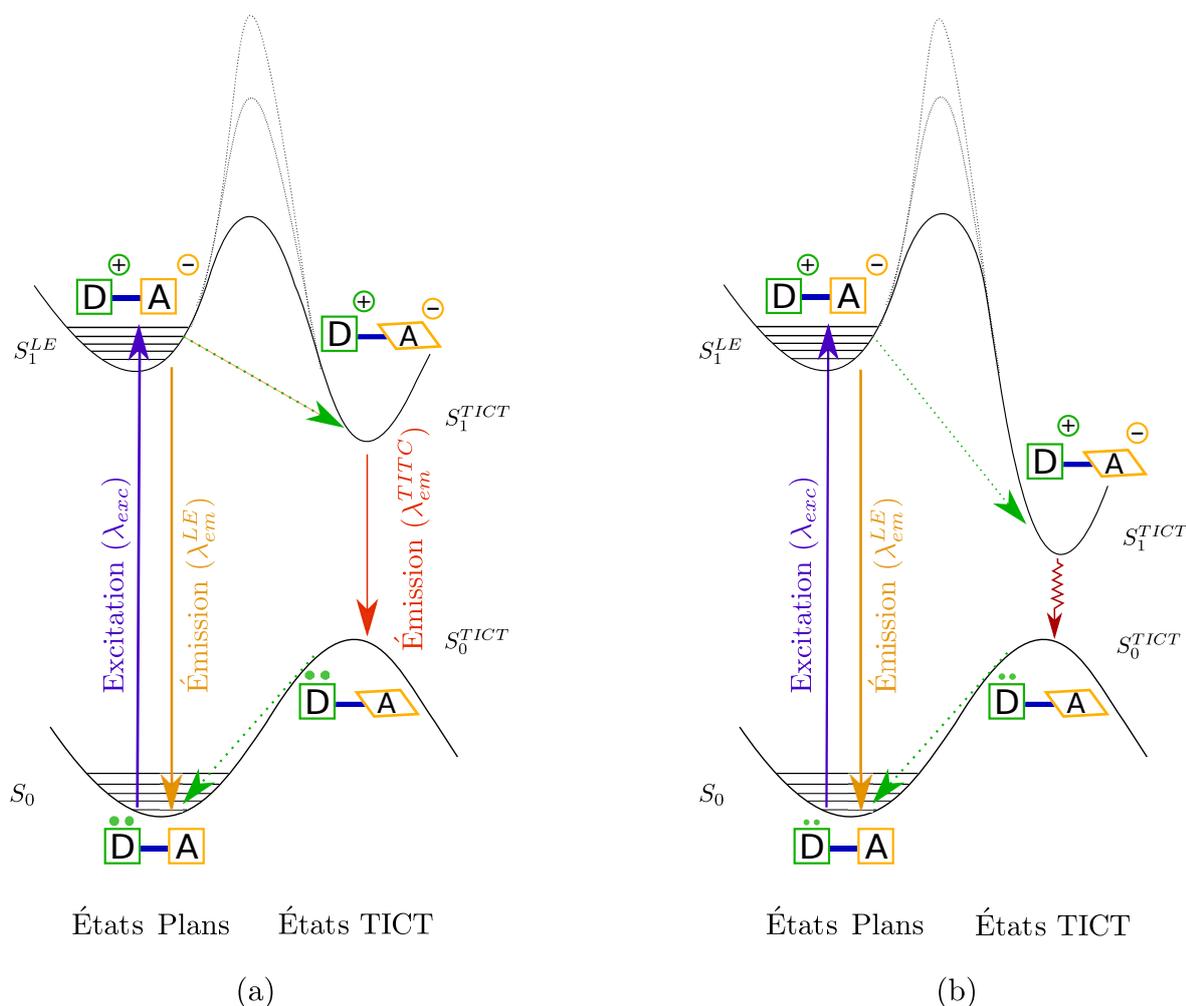


FIGURE 1.14 – Diagrammes de Perrin-Jablonski de rotors moléculaires. (a) Rotor moléculaire à double émission. (b) Rotor moléculaire à émission unique.

1.5.2 Sonde de viscosité

La sensibilité à la viscosité des rotors moléculaires s'explique comme suit : un solvant visqueux rend la rotation intramolécule difficile et augmente la barrière énergétique entre les états LE et TICT (lignes pointillées sur la Figure 1.14). En proportion, moins de molécules passent dans l'état TICT et la désexcitation via l'état LE – fluorescence – est plus importante. Ainsi, l'intensité de la fluorescence LE augmente avec la viscosité du fluide. Les rotors moléculaires avec une seule bande d'émission sont les plus utilisés comme sonde de viscosité, car l'émission de l'état LE est relativement insensible à la polarité du fluide [70-72]. Le rendement quantique Φ de l'état LE dépend de la viscosité η selon une loi de puissance, connue sous le nom de relation de Förster-Hoffmann :

$$\log(\Phi) = A + x \cdot \log(\eta) \quad (1.11)$$

A et x sont des constantes qui dépendent du couple rotor moléculaire - fluide. Förster et Hoffmann (1971) ont démontré analytiquement cette équation avec des théories de diffusion de Debye-Stokes-Einstein [73] et prédisent la valeur de l'exposant $x = 2/3$. Loufty et al. (1986) retrouvent cette équation en utilisant une théorie de diffusion de volume libre [71, 74-76], laissant x variable et dépendant du couple rotor-fluide. De nombreux groupes ont vérifié cette relation expérimentalement pour une large gamme de rotors [72, 73, 75-77].

En pratique, le rendement quantique n'est pas la grandeur mesurée, on mesure facilement l'intensité de fluorescence I_{em} émise par le rotor à l'aide d'un microscope de fluorescence ou d'un spectro-fluorimètre par exemple. L'intensité I_{em} est proportionnelle au rendement quantique Φ , on peut écrire $I_{em} = G \cdot c_{rotor} \cdot I_{exc} \cdot \Phi$ où G est une constante de gain dépendant de l'instrumentation, c_{rotor} la concentration en rotor et I_{exc} l'intensité excitatrice. La relation de Förster-Hoffmann devient alors :

$$I_{em} = C \cdot \eta^x \quad (1.12)$$

avec $C = G \cdot c_{rotor} \cdot I_{exc} \cdot 10^A$. Si l'on travaille toujours avec le même instrument, la même intensité excitatrice et la même concentration en rotor, alors C , de la même manière que A , est une constante dépendant du couple rotor moléculaire - fluide.

1.5.3 Attrait pour les rotors moléculaires et applications

En tant que sondes fluorescentes, les rotors moléculaires sont particulièrement attractifs car ils permettent en théorie de mesurer et cartographier la viscosité d'un milieu à l'échelle moléculaire. Cependant, si la littérature s'accorde pour dire que les rotors moléculaires sont sensibles à la micro-viscosité, d'autres paramètres comme la polarité [78, 79], la température [80, 81], la présence de protéines [82, 83] ou la localisation spécifique des sondes [84, 85] peuvent affecter sa réponse et son interprétation en termes de propriétés rhéologiques. C'est pourquoi la plupart des études en milieu biologique sont aujourd'hui largement qualitatives (comparaison d'un témoin au cas d'intérêt par exemple) et non quantitatives (mesure de viscosité).

Pour interpréter au mieux la réponse d'un rotor moléculaire en milieu biologique, des études préliminaires spécifiques – compatibilité avec le milieu d'intérêt, sensibilité aux différents paramètres extérieurs – sont nécessaires. Les récentes études sur les rotors moléculaires se sont concentrées sur le développement de nouveaux rotors adaptés aux milieux biologiques : faible toxicité, bonne stabilité, haute sensibilité et localisation spécifique [84-87]. Les fluorophores BO-DIPY sont particulièrement intéressants dans ce contexte, car ils présentent de bonnes propriétés photophysiques et peuvent être facilement fonctionnalisés [85]. Aujourd'hui, les rotors moléculaires ont déjà prouvé leur efficacité dans une grande variété d'applications : suivi en temps réel des processus d'agrégation et de polymérisation [88, 89], étude des bicouches phospholipidiques et des membranes cellulaires [71, 90-92], de mitochondries et lysosomes [84], d'agrégation et de changements de conformation de protéines [72, 83, 93-97], et de détection de protéines dans les cellules [98-100].

La plupart de ces études ne mesurent cependant pas directement l'intensité de fluorescence du rotor moléculaire car l'hétérogénéité d'un milieu biologique peut induire des variations de concentration en rotor et fausser l'interprétation de sa réponse en terme de propriétés rhéologiques. Deux techniques permettent de s'affranchir de ce problème. Il est possible de :

- Mesurer la durée de vie de fluorescence du rotor $\tau = 1/k$ au lieu de son intensité en régime permanent. Le temps τ est indépendant de la concentration en rotor et est directement liée au rendement quantique. Le temps τ suit donc également une relation de Förster-Hoffmann avec la viscosité. Les durées de vie de fluorescence de telles molécules sont de l'ordre de la

1

picoseconde pour les solvants de plus faible viscosité [101] et les mesurer avec précision nécessite des instruments relativement sophistiqués et coûteux comme des diodes laser pulsées et des dispositifs de comptage de photons uniques corrélés dans le temps [102].

- Synthétiser des rotors moléculaires ratiométriques en couplant de manière covalente au rotor moléculaire un fluorophore de référence qui n'est pas sensible à la viscosité. Le rapport entre l'émission du rotor et l'émission du fluorophore de référence ne dépend alors pas de la concentration, et peut directement être relié à la viscosité du milieu. Cette méthode peut relativement facilement être mise en œuvre avec des appareils classiques, mais nécessite une expertise en chimie moléculaire pour la synthèse. De plus, une limite survient si le fluide d'intérêt présente des propriétés d'absorption et de diffusion dépendantes de la longueur d'onde.

Les globules rouges étudiés au cours de cette thèse présentent un milieu intracellulaire homogène et dont les propriétés d'absorbance dépendent de la longueur d'onde. Nous choisissons donc d'exploiter les mesures d'intensité de fluorescence en régime permanent. Ce choix se justifie également par la volonté de développer une technique rapide et simple d'utilisation.

2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans ce chapitre, nous détaillons le matériel et les méthodes communs aux expériences présentées dans le manuscrit : préparation des solutions, dispositifs de microscopie et méthodes d'analyse.

2.1	Préparation des solutions	23
2.1.1	Globules rouges	24
2.1.2	Hémoglobine	25
2.1.3	BSA	26
2.1.4	DASPI et mélanges	26
2.2	Microscopie inversée : fluorescence et microrhéologie	26
2.2.1	Microscopie de fluorescence	26
2.2.2	Microrhéologie de suivi de particules	28
2.2.3	Mesure concomitante	29
2.2.4	Contrôle de température de l'échantillon	30
2.3	Microscopie confocale	31
2.3.1	Principe physique et couche optique	31
2.3.2	Pile d'images selon z	32
2.4	Analyse des GRs en microscopie de fluorescence	33
2.4.1	Détection des GRs	34
2.4.2	Représentation des données	36
2.4.3	Sélection par géométrie	36
2.5	Analyse de corrélations	39
2.5.1	Corrélation et coefficient de Pearson	39
2.5.2	Significativité statistique et p-value	39

2.1 Préparation des solutions

Une partie de ma thèse s'est concentrée sur l'étude de la réponse du rotor moléculaire DASPI dans différentes solutions (fluides simples, protéines, suspensions de globules rouges), dont je présente ici la préparation.

2.1.1 Globules rouges

Les globules rouges étudiés proviennent de donneurs sains et drépanocytaires. Nous recevons au laboratoire des échantillons de sang total. Le sang sain est prélevé et distribué par l'Établissement Français du Sang (EFS, Site Pitié Salpêtrière, Paris). Les donneurs sont volontaires et acceptent que leur sang soit utilisé à des fins non thérapeutiques, pour la recherche scientifique. Un anti-coagulant (EDTA) est systématiquement ajouté à la suspension. Les échantillons drépanocytaires sont fournis par Mariane de Montalembert, clinicienne et co-responsable du Site Necker pour les syndromes drépanocytaires majeurs et autres pathologies rares du globule rouge et de l'érythropoïèse. Ils sont prélevés chez ses patients à l'hôpital Necker, ce sont des enfants âgés entre 4 et 17 ans.

Pour étudier les globules rouges, il est nécessaire de les séparer des autres cellules sanguines (globules blancs et plaquettes) et de les resuspendre dans une solution tampon. Le tampon utilisé est le PBS 1X (10 mmol.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 137 mmol.L⁻¹ de NaCl, 2,7 mmol.L⁻¹ de KCl), il permet de conserver un pH= 7,4 et une bonne isotonicité (pression osmotique égale de part et d'autre des membranes des GRs). Le PBS 1X est obtenu en dissolvant une tablette de chez Sigma-Aldrich dans 200 mL d'eau pure. Les globules rouges étant plus denses que les autres cellules sanguines, il est assez aisé de les séparer par centrifugation : chaque échantillon est lavé 3 fois avec du PBS 1X par centrifugation douce de 10 mn (1 000 g pour les globules rouges sains, 500 g pour les globules rouges drépanocytaires plus fragiles), et le surnageant est éliminé. À la suite de ces trois lavages, le culot se compose de globules rouges à hématocrite ~100%. Nous préparons alors des suspensions de GRs à hématocrite choisie en prélevant un volume V_1 du culot que nous diluons dans un volume V_2 de PBS. Par exemple, pour préparer une solution à hématocrite 0,25%, je procède en deux étapes pour plus de précision. Je prépare une première solution S_1 à hématocrite 5% en mélangeant $V_1 = 50 \mu\text{L}$ du culot et $V_2 = 950 \mu\text{L}$ de PBS, puis je répète cette opération ($50 \mu\text{L}$ de S_1 + $950 \mu\text{L}$ de PBS) pour obtenir ma solution finale S_2 à hématocrite 0,25%.

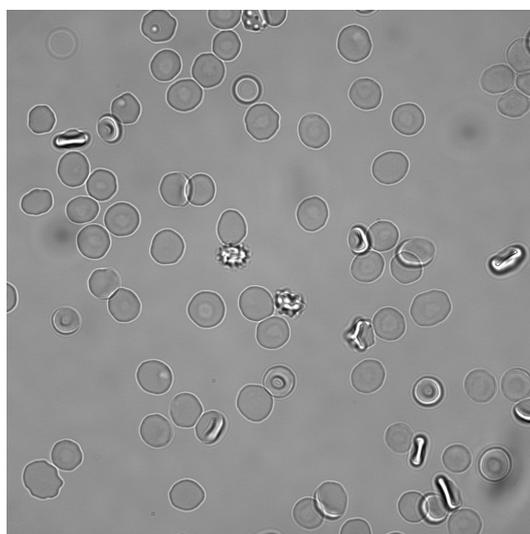


FIGURE 2.1 – **Observation de globules rouges au microscope optique.** Image en champ clair de globules rouges lavés à hématocrite 0,25% placés entre lame et lamelle espacées de 250 μm et observés au microscope optique au grossissement X100. Les globules rouges reposent, après sédimentation, sur la lamelle de verre à proximité de l'objectif.

Lorsque les globules rouges sont observés au microscope, la solution est placée entre lame et lamelle séparées par un espaceur de 250 μm d'épaisseur, et les GRs sédimentent sur la lamelle située à proximité de l'objectif. Avec ce dispositif, une solution à hématocrite 0,25% permet une

bonne visualisation des GRs comme le montre la Figure 2.1. Les lames et lamelles utilisées sont systématiquement nettoyées au plasma cleaner – gaz ionisé qui permet d'éliminer la contamination organique au niveau moléculaire – pendant 45 secondes à puissance maximale. Cette opération permet d'éviter au maximum la formation d'échinocytes par des interactions globule-verre.

2.1.2 Hémoglobine

Les solutions d'hémoglobine sont préparées à partir d'une solution mère conservée sous forme d'aliquotes de 2 mL à -20°C . L'hémoglobine mère a été extraite des globules rouges issus d'une poche de sang de 5 L distribuée par l'EFS Rhône-Alpes. Cette préparation a été réalisée au laboratoire LIPhy avec Thomas Podgorski. Les globules rouges sont lavés trois fois avec du PBS puis, pour lyser les cellules et libérer l'hémoglobine, nous effectuons trois cycles de congélation et décongélation : 15 mn à -80°C au congélateur et 15 mn à 37°C dans un bain marie. Un solvant halogéné, le tétrachlorure de carbone (CCl_4) est utilisé pour dissoudre les membranes. Le CCl_4 étant plus dense que l'hémoglobine, nous séparons les deux phases (CCl_4 + membranes dissoutes / hémoglobine) par centrifugation rapide (14000 g pendant 30 mn). L'hémoglobine est directement prélevée dans le surnageant. Les étapes de la préparation sont résumées sur la Figure 2.2.

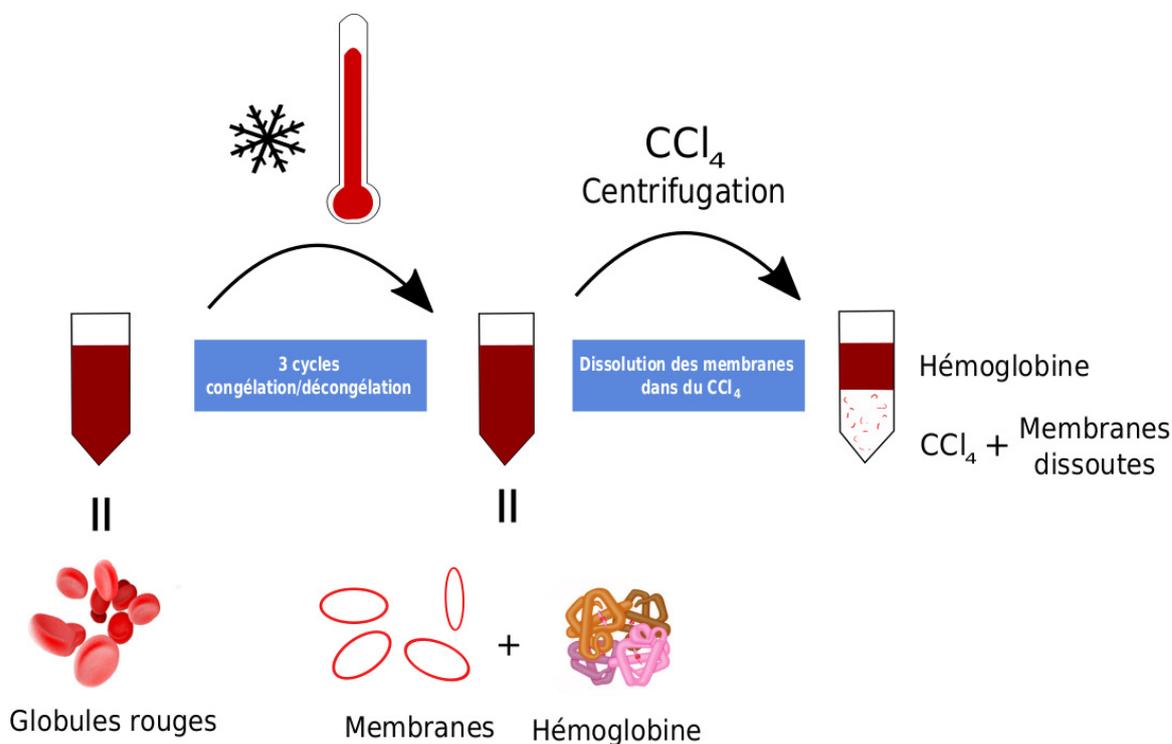


FIGURE 2.2 – **Préparation de l'hémoglobine.** Étapes de l'extraction d'hémoglobine à partir de globules rouges.

À partir de la solution mère, nous préparons des solutions plus ou moins concentrées en :

- diluant la solution mère dans du PBS;
- concentrant la solution mère à l'aide d'unités d'ultra-filtration (Vivaspin 2 PES 30kDa de Sartorius). Ces unités sont des tubes constitués de deux compartiments séparés par une membrane. Par centrifugation (4000 g, 30 mn), une partie du solvant traverse la membrane pour se retrouver dans le compartiment du dessous, et nous obtenons une solution de protéine plus concentrée dans le compartiment du dessus.

La concentration en hémoglobine de chaque solution est mesurée par colorimétrie (kit de dosage de l'hémoglobine MAK 115 de Sigma-Aldrich). Nous travaillons avec des solutions d'hémoglobine de concentration dans la gamme 2 – 43 g/dL.

2.1.3 BSA

L'Albumine Sérique Bovine (Bovine Serum Albumin en anglais ou BSA) est une protéine globulaire de taille et masse molaire proche de l'hémoglobine. Les solutions de BSA sont préparées en diluant de la BSA lyophilisée (64 kDa, Sigma-Aldrich) dans du PBS 1X. La dilution se fait sans agitation : après ajout du PBS sur la BSA, les solutions sont placées à 4°C et, pour les solutions les plus concentrées, plusieurs jours sont parfois nécessaires pour que toute la BSA soit dissoute. La concentration des solutions de BSA est mesurée par colorimétrie à l'aide du test de Bradford au bleu de comassie (Sigma-Aldrich). Nous travaillons avec des solutions de BSA de concentration dans la gamme 1-54 g/dL.

2.1.4 DASPI et mélanges

Le DASPI (trans-4-[4-(Diméthylamino)styril]-1-méthylpyridinium iodide) est le rotor moléculaire étudié au cours de cette thèse. Il se présente sous forme de poudre (Sigma-Aldrich) que nous diluons dans du DMSO pour fournir une solution mère de concentration 40 mM (14,65 mg de poudre de DASPI dans 1 mL de DMSO). Cette solution mère est diluée dans du PBS pour fournir des solutions de travail qui sont alors ajoutées aux solutions d'intérêt pour obtenir des concentrations finales en DASPI de 1 mM, 0,1 mM, ou 0,01 mM. Par exemple, pour la plupart des expériences sur les globules rouges, j'ajoute 5 mL de DASPI (20 mM) à 95 mL de globules rouges à hématocrite 0,25% pour obtenir une concentration finale en solution de 1 mM.

Lorsque le DASPI est introduit dans des fluides simples ou des solutions de protéines, aucune incubation n'est nécessaire. Lorsque le DASPI est introduit dans des suspensions de globules rouges, une étude détaillée présentée au Chapitre 5 montre qu'une incubation de 3,5 h avant analyse est optimale.

2.2 Microscopie inversée : fluorescence et microrhéologie

Le dispositif de microscopie présenté ici est celui principalement utilisé au cours de mes travaux. Il permet de faire des mesures de fluorescence et de microrhéologie, de manière simultanée ou non. Il s'agit d'un microscope inversé Leica DMI8 muni d'un éclairage en champ clair et d'une source de lumière externe pour la microscopie de fluorescence (Figure 2.3). L'échantillon d'intérêt est placé dans une chambre de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ entre lame et lamelle séparées de 250 μm par un espaceur. Ce dispositif permet d'éviter l'évaporation et la contamination. Les échantillons sont observés à grossissement X100 (objectif à immersion d'huile), X63 ou X10 (objectifs classiques). Une caméra rapide (fast sCMOS camera OrcaFlash4.0 v2+, Hamamatsu Photonics France S.A.R.L., Massy, France) de 82% d'efficacité quantique est montée sur le microscope inversé.

2.2.1 Microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est utilisée pour étudier le signal du rotor moléculaire DASPI dont les propriétés d'absorbance et d'émission sont détaillées au Chapitre 3, il absorbe autour de $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ et émet autour de $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$. La source externe de lumière est associée à un cube à filtres fabriqué sur mesure par Chroma Technology pour sélectionner les longueurs d'onde d'excitation [460 nm-530 nm] (trait bleu sur la Figure 2.3) et les longueurs d'onde d'émission [570 nm-

620 nm] (trait orange sur la Figure 2.3). L'éclairage se fait par le biais d'une fibre optique dont la sortie se trouve au niveau de l'objectif.

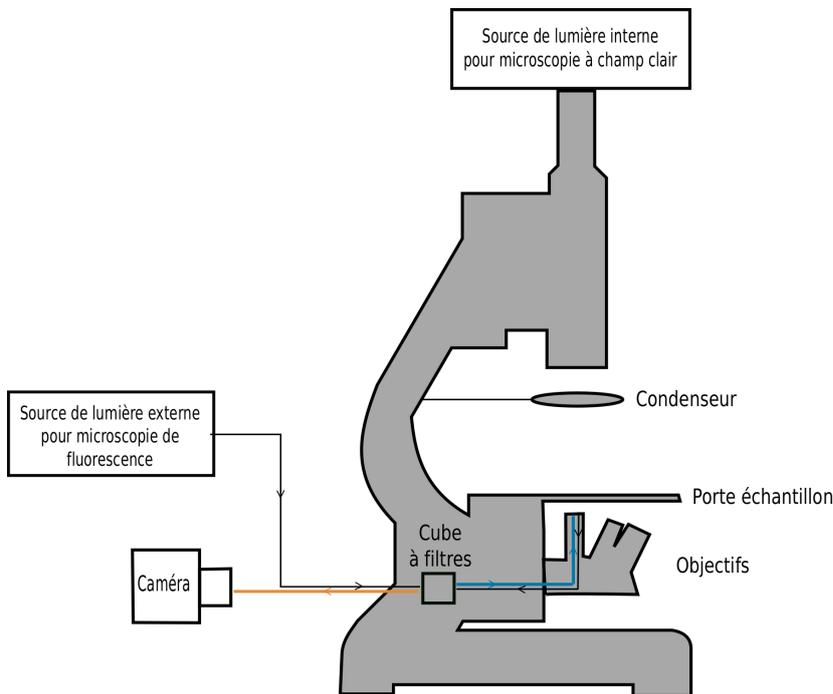


FIGURE 2.3 – Microscope Leica DMI8. Schéma du microscope et de ses composants.

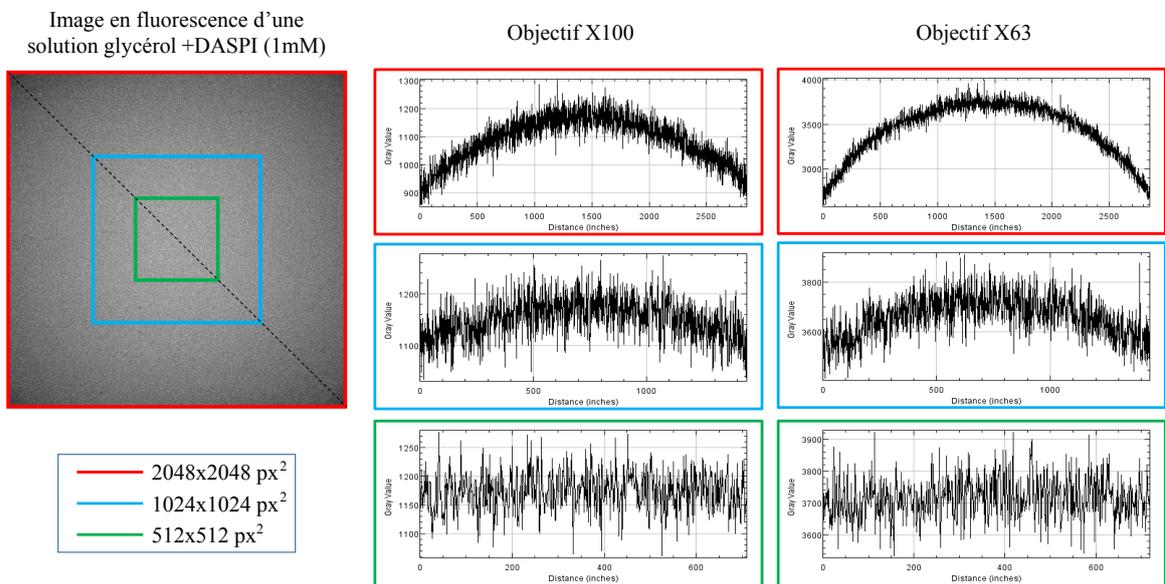


FIGURE 2.4 – **Choix du champ de fluorescence.** Image en fluorescence d'une solution de glycérol avec du DASPI (1 mM). Les profils d'intensité sont tracés sur la diagonale de l'image pour les champs $2048 \times 2048 \text{ px}^2$ (rouge), $1024 \times 1024 \text{ px}^2$ (bleu) et $512 \times 512 \text{ px}^2$ (vert) pour les objectifs X100 et X63. La fluorescence est homogène sur le champ $512 \times 512 \text{ px}^2$ aux deux grossissements.

Sur la Figure 2.4, nous présentons une image en fluorescence d'une solution de glycérol avec du DASPI (1mM), obtenue avec l'objectif X100. On remarque que le signal de fluorescence du DASPI n'est pas homogène sur le champ de l'image de $2048 \times 2048 \text{px}^2$ mais est plus intense au centre que sur les bords. Afin de définir une zone d'étude où le champ est uniforme, nous traçons le profil d'intensité selon la diagonale pour plusieurs tailles d'images ($2048 \times 2048 \text{px}^2$ traits rouges, $1024 \times 1024 \text{px}^2$ traits bleus, $512 \times 512 \text{px}^2$ traits verts). Le champ de fluorescence est homogène seulement pour le plus petit champ choisi $512 \times 512 \text{px}^2$. La même étude réalisée avec l'objectif X63 mène aux mêmes conclusions. Ainsi, dans l'étude de la réponse du DASPI en solution (Partie II), les intensités présentées sont des moyennes obtenues sur le champ homogène et central de $512 \times 512 \text{px}^2$ au grossissement X100.

2.2.2 Microrhéologie de suivi de particules

La microrhéologie de suivi de particules est la technique privilégiée de mesure de viscosité utilisée au cours de ma thèse. Les sondes micrométriques utilisées sont des billes de Latex, sphériques et calibrées de $0,994 \mu\text{m}$ de diamètre et de densité $1,05 \text{g/cm}^3$. Elles sont ajoutées dans la solution d'intérêt à fraction volumique $< 1\%$. La Figure 2.5 présente une concentration en billes satisfaisante pour réaliser le suivi. Nous utilisons l'éclairage en champ clair et enregistrons une vidéo de 20 s à

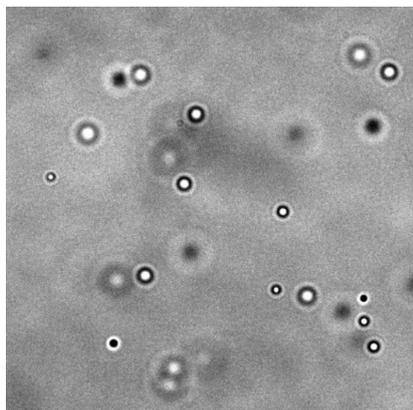


FIGURE 2.5 – **Billes de Latex observées au microscope.** Image en champ clair à l'objectif X100 d'une solution de glycérol avec des billes de Latex. On distingue les billes dans le plan focal (blanches) de celles en dehors du plan (noires).

fréquence 100Hz. Le suivi des billes est réalisé à l'aide d'une macro ImageJ écrite au laboratoire (O. Cardoso) qui permet de mesurer les positions des billes dans le plan focal et de calculer le déplacement quadratique moyen (MSD) de chaque bille. Une représentation fidèle de la trajectoire des billes est obtenue seulement si les paramètres d'acquisition sont bien choisis. Parmi eux sont importants : le nombre d'images par seconde, le temps d'exposition et la luminosité. L'impact de ces paramètres sur la mesure est expliqué ci-dessous.

- Le nombre d'images par seconde ou frame rate fr : plus il est important, mieux la trajectoire est décrite. Ce paramètre est particulièrement important si le milieu étudié est visco-élastique car les paramètres rhéologiques dépendent de la fréquence.
- Le temps d'exposition σ : c'est le temps pendant lequel le capteur reste ouvert. Ce temps ne peut être plus grand que l'intervalle de temps entre deux images, soit $\sigma \leq \frac{1}{fr}$. La position mesurée à un instant t contient l'information de l'intervalle de temps $[t - \sigma; t]$, et peut être vue comme une moyenne des positions de la bille pendant ce temps d'ouverture. Ainsi si ce temps est trop long, il peut y avoir un biais sur la trajectoire des billes mesurée, c'est ce qu'on appelle l'erreur dynamique.

- La luminosité : elle influe principalement sur le rapport signal sur bruit. Plus la luminosité est importante, plus le rapport signal sur bruit augmente. Si la luminosité est trop faible, le bruit ambiant impose une faible résolution spatiale ϵ et fausse la mesure de la position, c'est ce qu'on appelle l'erreur statique.

Les erreurs statiques et dynamiques restent généralement négligeables si les paramètres d'acquisition sont correctement choisis. Dans le cas d'un fluide purement visqueux, elles modifient la valeur théorique du déplacement quadratique moyen de la façon suivante [103] :

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = 2dD \left(\tau - \frac{\sigma}{3} \right) + 2\epsilon^2 \quad (2.1)$$

Ainsi, la courbe du déplacement quadratique moyen peut être déviée vers le haut ou le bas aux faibles temps comme représenté en Figure 2.6.

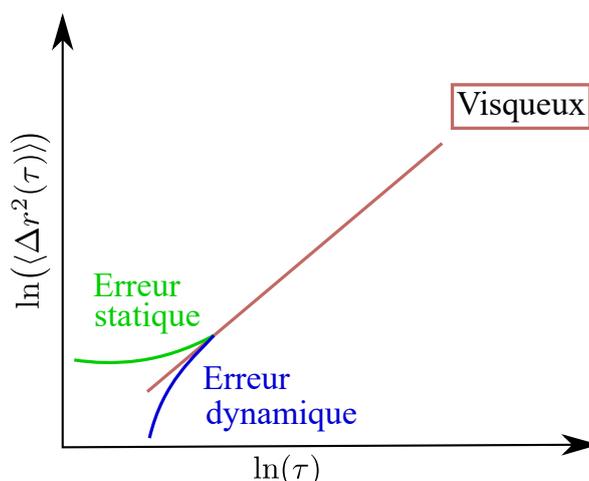


FIGURE 2.6 – **Erreurs statiques et dynamiques en microrhéologie.** Effet des deux types d'erreur sur la mesure du déplacement quadratique moyen dans le cas d'un fluide purement visqueux.

Le choix des paramètres d'acquisition dépend des appareils utilisés (microscope, caméra, source lumineuse). Une étude complète réalisée pour des solutions de glycérol avec le microscope Leica DMI8 a permis de choisir comme paramètres optimaux : $fr = 100$ images par seconde et $\sigma = 3$ ms. La luminosité est contrôlée par rapport à son niveau maximal. Cette étude menée au début de ma thèse n'est pas présentée ici.

2.2.3 Mesure concomitante

Les mesures de fluorescence et de microrhéologie peuvent être réalisées de manière concomitante lorsque les deux sondes (DASPI et billes de Latex) sont ajoutées dans l'échantillon d'intérêt. Cependant, le champ clair et la fluorescence ne sont jamais actionnés simultanément, mais l'un à la suite de l'autre. Nous procédons par exemple d'abord à l'acquisition d'un film en champ clair d'une vingtaine de secondes (temps d'exposition 3 ms, champ de 2048×2048 px²), puis la lumière blanche est coupée et nous allumons la source externe pour réaliser une image en fluorescence (temps d'exposition 100 ms, champ de 512×512 px²).

Nous nous demandons si la présence de billes dans le champ peut modifier le signal de fluorescence mesuré. La Figure 2.7 montre l'image en champ clair et son équivalent en fluorescence d'une solution de glycérol avec DASPI (1 mM) et billes de Latex. Nous comparons les intensités de fluorescence mesurées sur une zone avec billes (carré bleu) et une zone sans billes (carré vert). Nous observons que les valeurs du signal sont proches : $I_{\text{vert}} = 10050 \pm 151$ u.a. et $I_{\text{bleu}} =$

10025 ± 156 u.a. La présence de billes a donc un effet négligeable sur le signal de fluorescence mesuré, la mesure de fluorescence peut donc être réalisée en présence de billes.

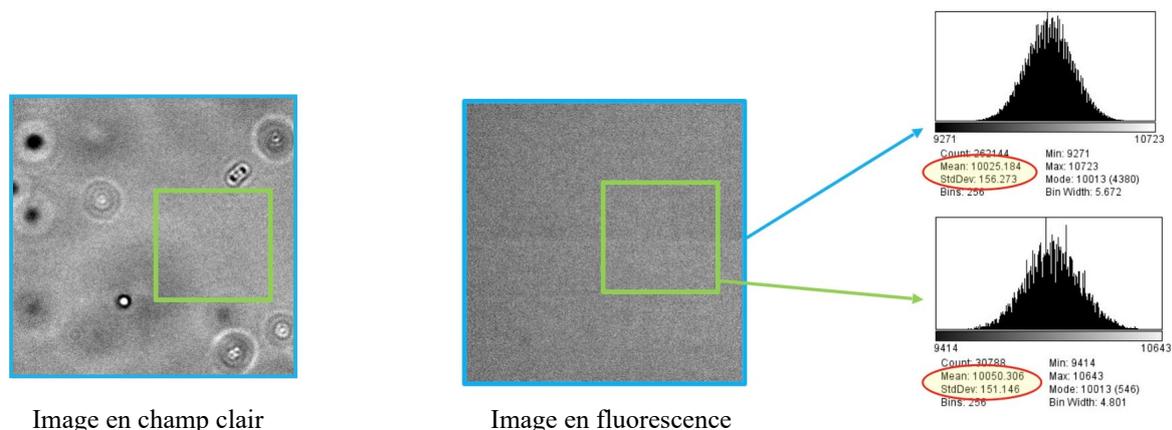


FIGURE 2.7 – **Fluorescence et billes.** L'image d'une solution de glycérol contenant du DASPI (1 mM) est présentée en champ clair avec son équivalent en fluorescence. Nous comparons les intensités mesurées respectivement sur une zone sans bille (carré vert) et une zone avec billes (carré bleu), elles sont similaires.

2.2.4 Contrôle de température de l'échantillon

La température des échantillons observés au microscope X100 peut être contrôlée à l'aide d'un réchauffeur d'objectif (Biotech objective heater). Le réchauffeur est monté sur l'objectif comme représenté en Figure 2.8-(a) et permet de chauffer et mesurer la température de ce dernier. L'ob-

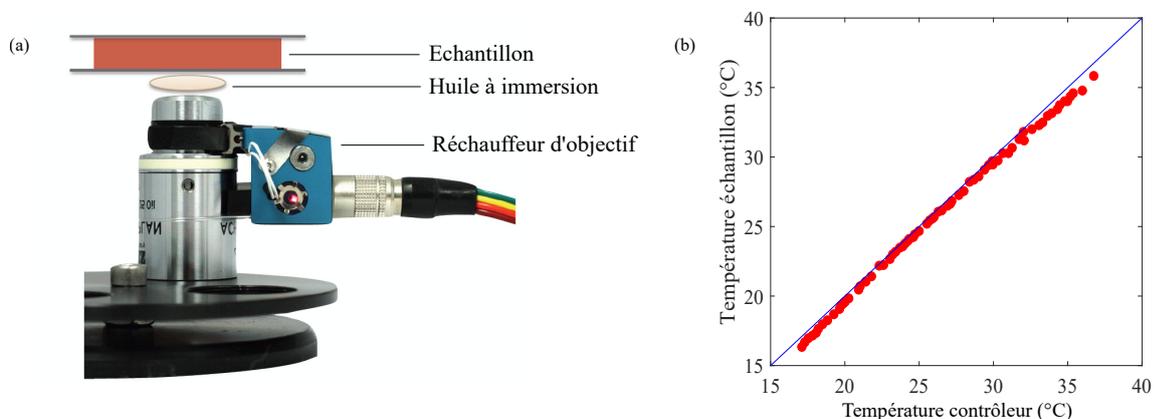


FIGURE 2.8 – **Contrôle de température.** (a) Réchauffeur d'objectif monté sur l'objectif, on représente la goutte d'huile à immersion et l'échantillon qui se trouvent au dessus. Ils forment une chaîne permettant le transfert de chaleur. (b) Calibration de la température. La température est mesurée simultanément sur le boîtier du contrôleur et dans l'échantillon à l'aide d'une sonde thermométrique. La ligne continue bleue correspond à la fonction $y = x$.

jectif étant en contact avec l'huile à immersion, elle-même en contact avec l'échantillon, il y a un transfert de chaleur de l'objectif vers l'échantillon. La température de l'objectif est contrôlée en temps réel à $\pm 0.1^\circ\text{C}$ près grâce à une sonde de température intégrée. La température de l'échantillon est estimée et affichée sur le boîtier de contrôle. Pour aller à des températures inférieures à la température ambiante et refroidir l'objectif et l'échantillon, un circuit de refroidissement à circulation d'eau contrôlé par pompe péristaltique est utilisé. Dans le cas simple d'une goutte d'eau

pour échantillon, et à l'aide d'une sonde thermométrique placée sur la goutte, nous vérifions que la température donnée par le contrôleur correspond à celle de l'échantillon dans la gamme 15-40°C (Figure 2.8-(b)).

2.3 Microscopie confocale

La microscopie confocale est utilisée dans ces travaux pour accéder au signal du DASPI issu de l'intérieur des globules rouges. De la même façon qu'en microscopie de fluorescence, l'échantillon est excité et l'intensité ré-émise récoltée, mais celle-ci provient d'une couche optique de faible épaisseur Δ_{opt} . Dans nos expériences, la longueur d'onde d'excitation est fixée à $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$ et celle d'émission à $\lambda_{\text{exc}} = 590 \text{ nm}$ en accord avec les propriétés du DASPI. Nous avons effectué des expériences avec deux microscopes confocaux équipés de deux objectifs différents :

- microscope confocal Leica TCS SP8 (Laboratoire LIPhy, Grenoble) équipé d'un objectif X40 à immersion d'huile;
- microscope confocal Zeiss LSM 780 (Laboratoire MSC, Paris) équipé d'un objectif X40 à immersion d'eau.

Nous expliquons le principe physique de la technique et estimons l'épaisseur de la couche optique imagée Δ_{opt} dans les deux situations. Enfin, nous montrons comment nous réalisons des piles d'images sur un globule.

2.3.1 Principe physique et couche optique

La microscopie confocale permet de surmonter les limites classiques du microscope optique en terme de résolution axiale. En microscopie classique, selon l'épaisseur de l'échantillon, l'information provenant du plan focal est mélangée à l'information provenant des zones de l'objet non focalisées. En microscopie confocale, un diaphragme, appelé pinhole, sélectionne le flux lumineux provenant d'une couche optique de faible épaisseur, éliminant ainsi la lumière parasite. Ceci est illustré sur la Figure 2.9.

Une des spécificités de la microscopie confocale est qu'une lumière d'excitation particulièrement intense et focalisée est nécessaire pour récupérer un signal exploitable de la couche optique imagée. L'épaisseur de la couche optique dépend de l'ouverture du pinhole choisie. On l'exprime généralement en unité d'Airy, définie par :

$$1 \text{ AU} = \frac{1,22 \cdot \lambda_{\text{em}}}{\text{NA}} \quad (2.2)$$

avec NA l'ouverture numérique de l'objectif.

Quand le pinhole est fermé à un diamètre infiniment petit, typiquement $\text{PH} < 0,25 \text{ AU}$, on considère qu'on image seulement le plan focal, alors l'épaisseur de la couche optique Δ_{opt} est égale à la résolution axiale de l'appareil, c'est à dire, la capacité de séparations de deux plans [104] :

$$\Delta_{\text{opt}_{\text{PH} \rightarrow 0}} = \frac{0,64 \cdot \bar{\lambda}}{\left(n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}\right)} \quad (2.3)$$

avec $\bar{\lambda} = \sqrt{2} \frac{\lambda_{\text{em}} \lambda_{\text{exc}}}{\sqrt{\lambda_{\text{em}}^2 + \lambda_{\text{exc}}^2}}$, longueur d'onde moyenne et n l'indice optique du liquide d'immersion de l'objectif. Dans nos expériences, $\bar{\lambda} = 532 \text{ nm}$. Généralement, on utilise des pinholes plus grands car s'il est trop fermé, la transmission de lumière est faible (Figure 2.10-(a)) et la qualité de l'image réduite. Alors, pour des ouvertures $\text{PH} \geq 0,25 \text{ AU}$, la taille de la couche optique augmente avec la

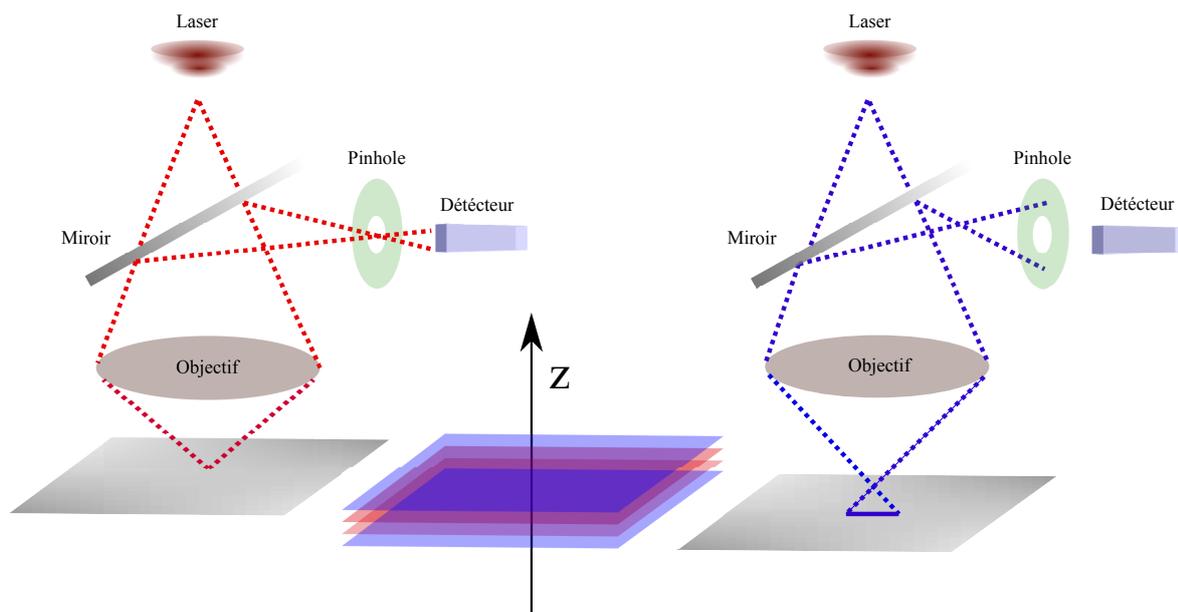


FIGURE 2.9 – **Principe physique de la microscopie confocale.** Le pinhole sélectionne les rayons provenant d'une section optique de faible épaisseur (plans rouge, cas représenté à gauche). Les plans bleus ne sont pas sélectionnés (cas représenté à droite).

taille de pinhole, comme on le voit sur la Figure 2.10-(b). En particulier, dans la gamme $0,25 \text{ AU} \leq \text{PH} \leq 1 \text{ AU}$, l'équation 2.3 est modifiée par changement du préfacteur 0,64 pour décrire avec une bonne approximation l'épaisseur de la couche optique [104].

Dans nos expériences, nous estimons les épaisseurs de couche optique :

- Avec le microscope confocal Leica TCS SP8 équipé d'un objectif X40 à immersion d'huile, les caractéristiques de l'objectif sont $n = 1,518$ et $\text{NA} = 1,3$. Le pinhole choisi est $\text{PH} = 1 \text{ AU}$. La taille de la couche optique est estimée à $\Delta_{\text{opt}} \approx 0,6 \mu\text{m}$.
- Avec le microscope confocal Zeiss LSM 780 équipé d'un objectif X40 à immersion d'eau, les caractéristiques de l'objectif sont $n = 1,3$ et $\text{NA} = 1$. Le pinhole choisi est $\text{PH} = 0,7 \text{ AU}$. La taille de la couche optique est estimée à $\Delta_{\text{opt}} \approx 0,7 \mu\text{m}$.

Ces épaisseurs sont plus faibles que la hauteur d'un globule rouge, ce qui permettra d'en imaginer l'intérieur.

2.3.2 Pile d'images selon z

Considérons un échantillon positionné dans le plan (x, y) . La microscopie confocale permet de réaliser des piles d'images, ou z -stacks, selon l'axe z de l'objectif. Il s'agit d'un ensemble d'images capturées de sorte que le champ selon x et y reste le même tandis que la distance de l'échantillon par rapport à l'objectif (axe z) change pour chaque image. La distance entre chaque image δz est contrôlée automatiquement et avec précision par une plateforme de contrôle de position de l'objectif. Pour l'étude des GRs, réaliser des z -stacks permet d'acquérir des images au sein du globule car l'épaisseur de la couche optique est plus faible que la hauteur du globule. Il sera ainsi possible d'étudier respectivement la réponse du DASPI dans le cytosol et dans les membranes. Nous choisissons d'utiliser des $\delta z \leq \Delta_{\text{opt}}$, typiquement $\delta z = 0,1 \mu\text{m}$ ou $\delta z = 0,5 \mu\text{m}$. Une illustration d'un z -stack obtenu sur un échantillon de globules est présenté en Figure 2.11.

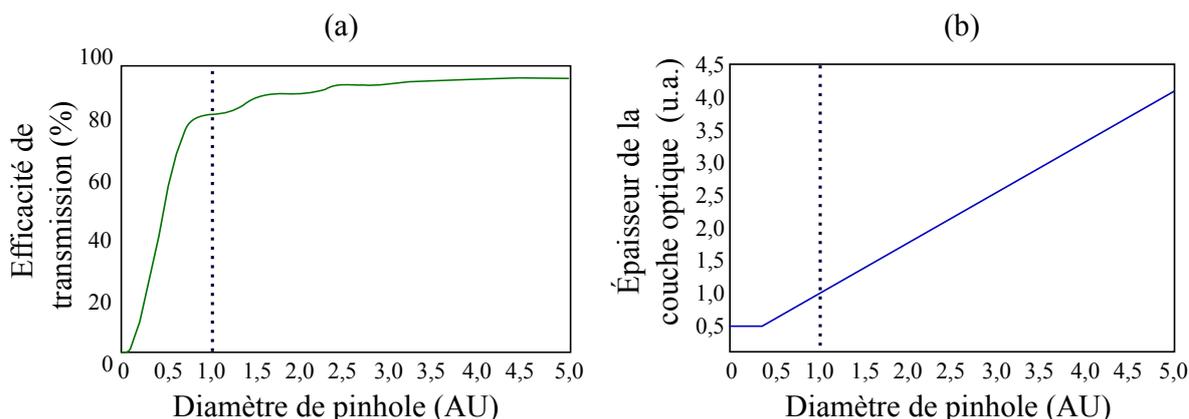


FIGURE 2.10 – **Effet du pinhole sur le signal et sur la couche optique.** (a) Efficacité de la transmission de la lumière en fonction de la taille du pinhole. (b) Épaisseur de la couche optique en fonction de la taille du pinhole. Ici l'épaisseur est en unité arbitraire et est égale à 1 quand le pinhole est de 1. Les lignes pointillées correspondent au cas PH = 1 AU. Figure adaptée de [105].

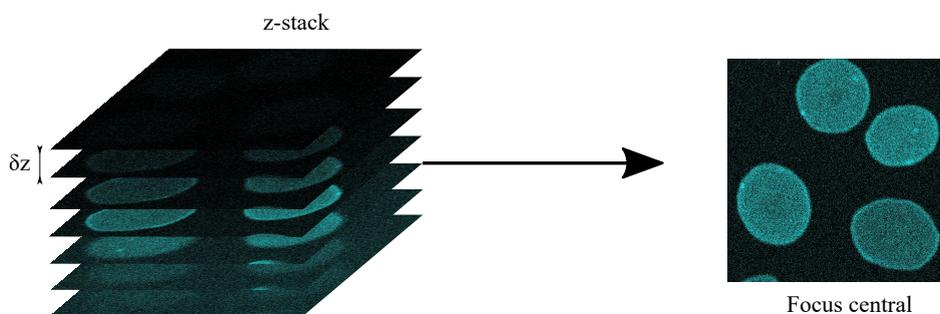


FIGURE 2.11 – **Pile d'image – ou z-stacks – d'un échantillon de globules.** Chaque image est distante de $\delta z = 0,5 \mu\text{m}$ de sa voisine. Nous sélectionnons à droite l'image pour laquelle le focus est au centre du globule.

2.4 Analyse des GRs en microscopie de fluorescence

Quand les GRs sont étudiés en microscopie de fluorescence, ils sont incubés dans du DASPI et placés entre lame et lamelle espacées de $250 \mu\text{m}$. Ils sédimentent sur la lamelle située à proximité de l'objectif et nous enregistrons systématiquement une image en fluorescence avec son équivalent en champ clair. Comme on peut le voir en Figure 2.12, les deux images n'apportent pas la même information, les orientations et morphologies des GRs notamment sont plus facilement identifiables en champ clair qu'en fluorescence (par exemple globule sur la tranche ou globule de face). Lors de l'acquisition de l'image en fluorescence, nous faisons particulièrement attention à faire le focus sur le bas du globule, proche de la lamelle sur laquelle il repose. Avec ce focus, les membranes sont nettes ce qui permettra une bonne segmentation de l'image dans le processus d'analyse.

Nous avons remarqué que l'illumination fluorescente prolongée des GRs conduisait à leur lyse. En Figure 2.13 nous présentons 3 images en champ clair de globules sous illumination fluorescentes à 0, 10 et 15 minutes d'illumination. A partir de 10 minutes d'illumination, certains globules sont détruits et se transforment en fantômes. Ce phénomène s'accroît à 15 minutes d'illumination. La quatrième image présentée est prise après 15 minutes d'illumination à un grossissement plus faible et montre que la zone illuminée a été "détruite" : un trou sur l'image est clairement visible. Une illumination forte et longue endommage donc les globules et conduit à la lyse des cellules. Ceci peut être dû à un échauffement thermique des membranes comme expliqué dans la

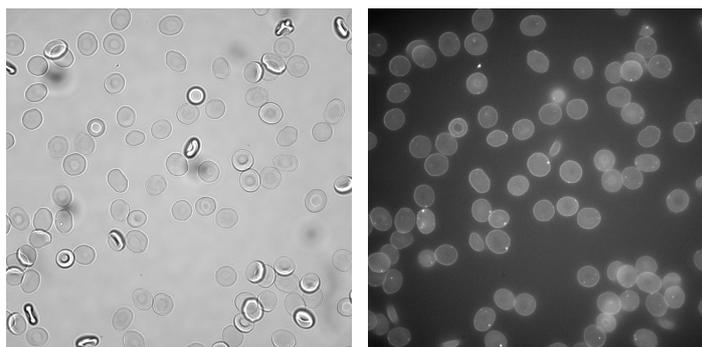


FIGURE 2.12 – **Images de GRs en champ clair et en fluorescence.** Le champ clair permet plus facilement d’identifier les morphologies des GRs. En fluorescence, le focus est choisi de manière à ce que les membranes soient bien nettes.

littérature à propos d’expériences utilisant des lasers focalisés ou des pinces optiques [106-108]. Pour éviter ce phénomène, nous faisons attention à n’allumer la fluorescence que de manière instantanée lorsque nous acquérons une image et, si plusieurs images sont prises, nous ne repassons jamais au même endroit pour ne pas endommager les cellules.

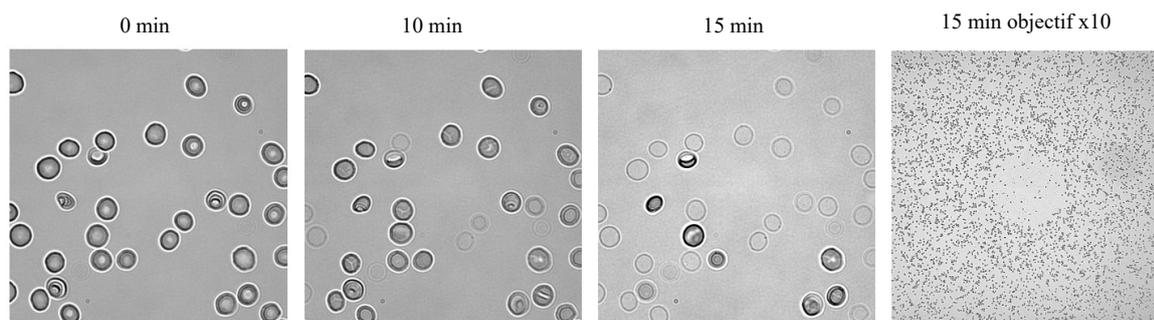


FIGURE 2.13 – **Illumination fluorescente prolongée et lyse des GRs.** Trois images en champ clair sont prises après 0, 10 et 15 minutes d’illumination fluorescente à grossissement X100. On observe la lyse progressive de certains globules. La quatrième image montre la zone imagée au grossissement X10 après 15 minutes d’illumination. On observe un trou dû aux nombreuses lyses ayant eu lieu sur la zone illuminée.

2.4.1 Détection des GRs

Pour caractériser un échantillon de globules rouges, nous réalisons une douzaine d’images sur l’échantillon. Sur chacune d’entre elles, nous mesurons le signal des cellules à l’aide d’une macro ImageJ développée pour ce projet au cours de ma thèse qui réalise les étapes suivantes illustrées en Figure 2.14 :

1. Sélection d’un cercle central de diamètre 1 600 px (cercle bleu) et soustraction de l’intensité du fond. Le profil d’intensité présenté sur la Figure 2.14 montre que l’opération de soustraction du fond mène à un nouveau fond d’intensité proche de 0 et homogène. Le rond de 1 600 px de diamètre correspond à un champ plus large que les $512 \times 512 \text{ px}^2$ choisis plus haut, ce qui permet d’analyser un plus grand nombre de globules simultanément. Nous avons vérifié que les distributions d’intensité obtenues pour un échantillon de GRs étaient identiques (même moyenne et même hétérogénéité) pour un champ carré de $512 \times 512 \text{ px}^2$ et un champ rond de 1 600 px de diamètre.

2. Détection et segmentation des GRs. La segmentation est conçue pour sélectionner une surface légèrement plus petite que la surface réelle du GR, afin d'éliminer les contributions des membranes.

3. Identification des GRs et mesure des intensités de fluorescence moyennes sur chacun. La macro fournit également des paramètres géométriques associés à la zone sélectionnée : aire, circularité, rondeur, rapport d'aspect et solidité.

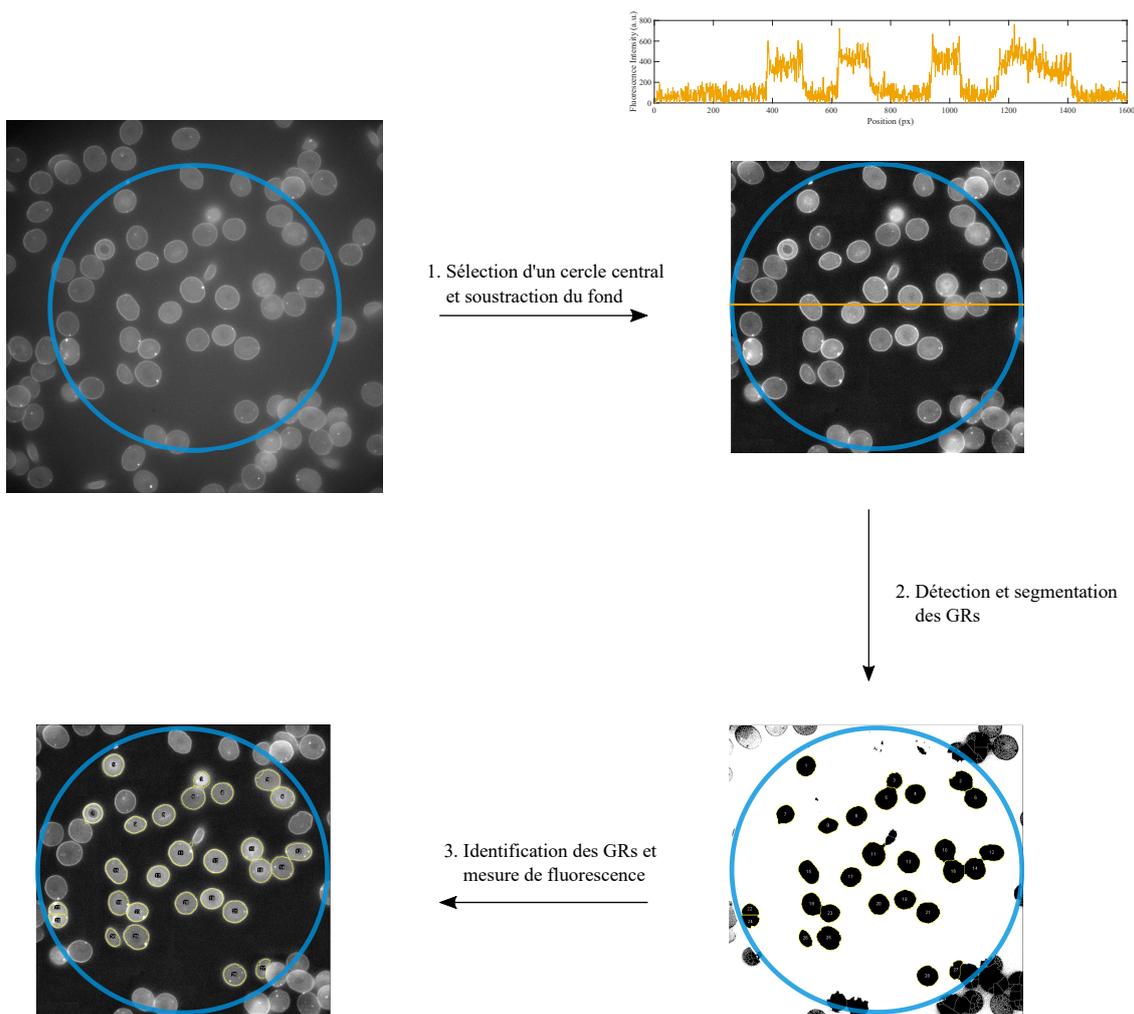


FIGURE 2.14 – **Segmentation et détection des GRs.** Étapes de la macro ImageJ permettant de segmenter et mesurer la fluorescence des globules. Nous sélectionnons un cercle central de diamètre 1600px sur lequel les globules seront analysés, et soustrayons le fond. Un profil d'intensité mesuré sur la ligne jaune une fois le fond soustrait montre que le fond se réduit à zéro et est homogène. La macro effectue une détection de contours puis identifie les globules et mesure l'intensité moyenne sur chacun.

Il arrive que la segmentation des GRs par la macro soit incorrecte : certains globules sont coupés en deux, pour d'autres la segmentation sélectionne une aire plus grande que celle réelle. Ces erreurs restent des événements rares et les globules mal détectés sont éliminés manuellement de nos données.

2.4.2 Représentation des données

Les intensités mesurées sur environ 300 globules d'un échantillon peuvent être représentées sous différentes formes illustrées en Figure 2.15 :

- En boxplot : dans cette représentation, chaque point représente un globule, et on superpose un boxplot – ou boîte à moustache – qui contient les informations suivantes :
 - La médiane : 50% des points sont inférieurs à cette valeur, 50% supérieurs;
 - Q1 et Q3 : il s'agit des valeurs du premier et troisième quartile, 25% des points sont inférieurs à Q1 et 25% supérieurs à Q3;
 - min et max : il s'agit des valeurs les plus basse et haute de l'ensemble de données (à l'exception des valeurs aberrantes).

Le boxplot est tracé à l'aide de la fonction *boxplot* de Matlab.

- Sous forme de distribution d'intensité : nous la traçons à l'aide de la fonction Matlab *kdensity* (pour kernel density) qui réalise une estimation par noyau de la densité de probabilité d'une variable aléatoire.
- Sous forme de violin plot : au nuage de points nous ajoutons la distribution d'intensité pivotée selon l'axe *y* de chaque côté. Les éléments constituant les boxplot peuvent être ajoutés aux violin plot si nécessaire. Ce ne sera généralement pas le cas ici, nous préférons cette représentation épurée pour visualiser un échantillon avec son hétérogénéité. Les violin plots sont tracés à l'aide d'une version modifiée de la fonction *violin* (<https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/45134-violin-plot>) sur Matlab.

2.4.3 Sélection par géométrie

Notre analyse nous permet de séparer les GRs selon leur géométrie et de distinguer, par exemple, les échinocytes, les sphérocytes et les discocytes. Sur une carte 2D, nous plaçons pour chaque globule les couples aire-circularité mesurés par notre macro. La circularité d'un objet se définit par $\text{circ} = \frac{4\pi \text{Aire}}{\text{périmètre}^2}$, plus elle est proche de 1 plus l'objet ressemble à un cercle. Nous montrons un exemple de carte 2D en Figure 2.16.

Sur la carte, nous délimitons quatre zones en définissant des circularité et aire limites. La définition de ces valeurs limites est faite visuellement dans le but d'englober la majorité de la distribution de circularité ou d'aire au-delà de ces valeurs (Figure 2.17-(a)). On remarque que les quatre zones correspondent alors à quatre familles de globules aux géométries distinctes :

- En haut à droite, l'aire et la circularité sont grandes, ce sont les globules discocytaires.
- En haut à gauche, l'aire est petite et la circularité est grande, ce sont des globules plus petits que la normale ou des sphérocytes.
- En bas à gauche, l'aire et la circularité sont petites : on retrouve majoritairement des échinocytes.
- En bas à droite, l'aire est grande et la circularité petite : nous y attribuons toutes les autres géométries possibles.

Sur la Figure 2.16, nous avons ajouté à la carte 2D de l'échantillon quelques images de GRs pour montrer que les géométries décrites sont bien celles observées. Ces cartes 2D seront notamment utilisées au Chapitre 7 et 9 pour caractériser les morphologies présentes dans un échantillon de sang sain ou drépanocytaire.

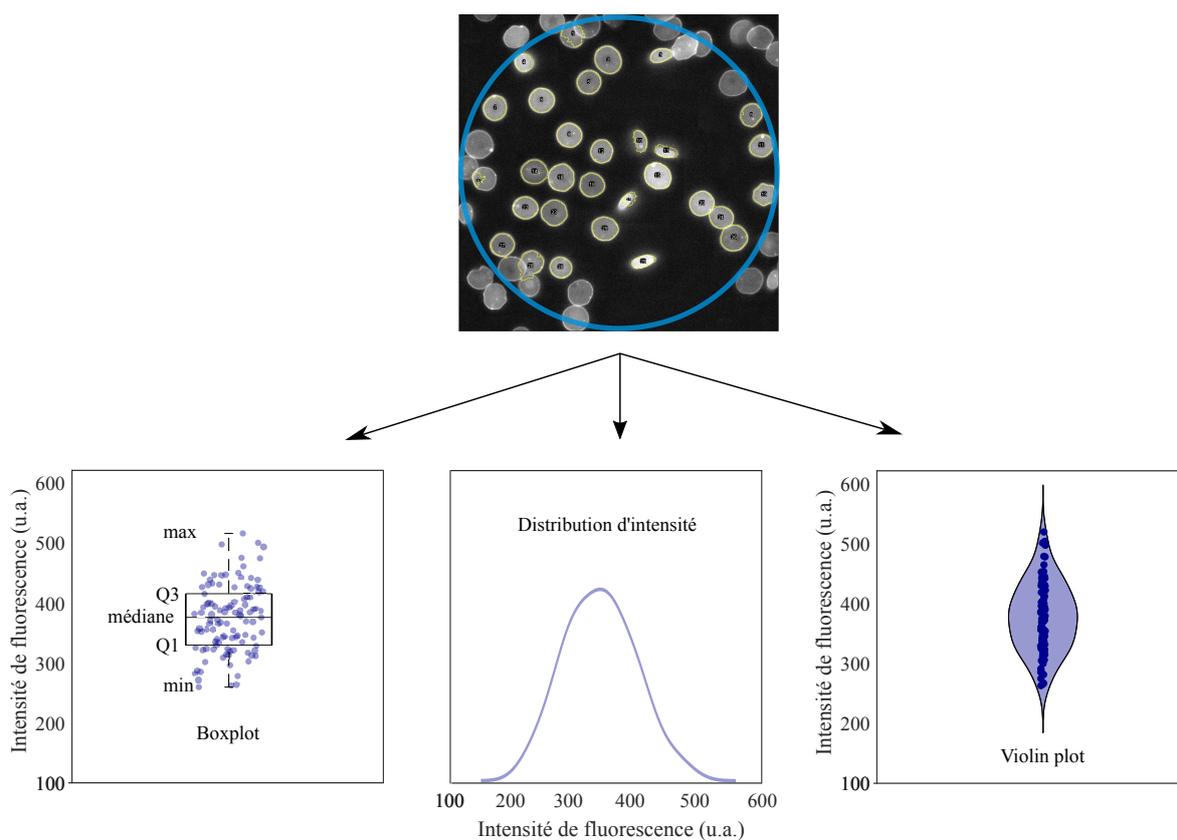


FIGURE 2.15 – **Représentation des données.** Les intensités de fluorescence mesurées sur environ 300 globules d'un échantillon sont représentées sous forme de boxplot, de distribution d'intensité ou de violin plot.

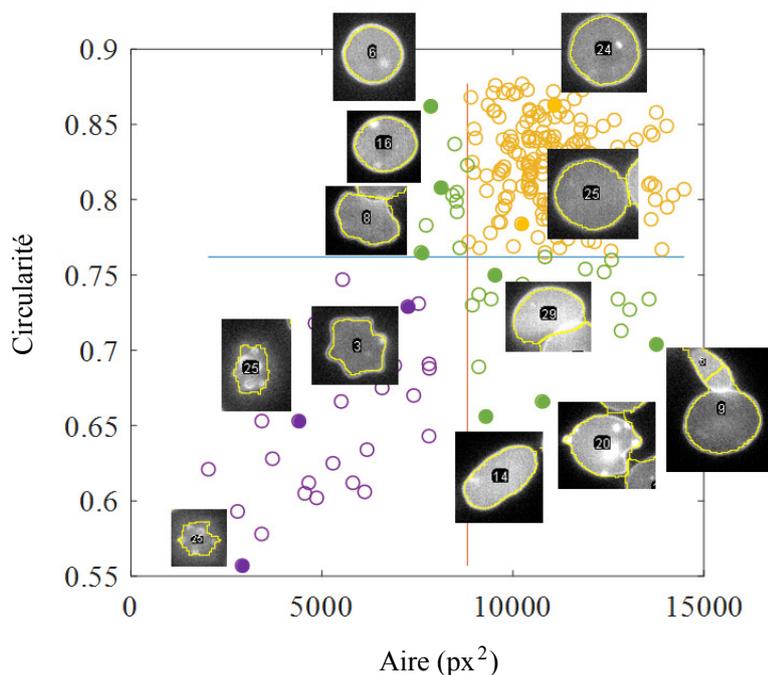


FIGURE 2.16 – Cartographie 2D aire-circularité d'un échantillon de globules rouges. On délimite quatre zones sur cette carte correspondant à quatre familles de géométries différentes. Les images de globules correspondant aux couples en rond pleins sont affichées.

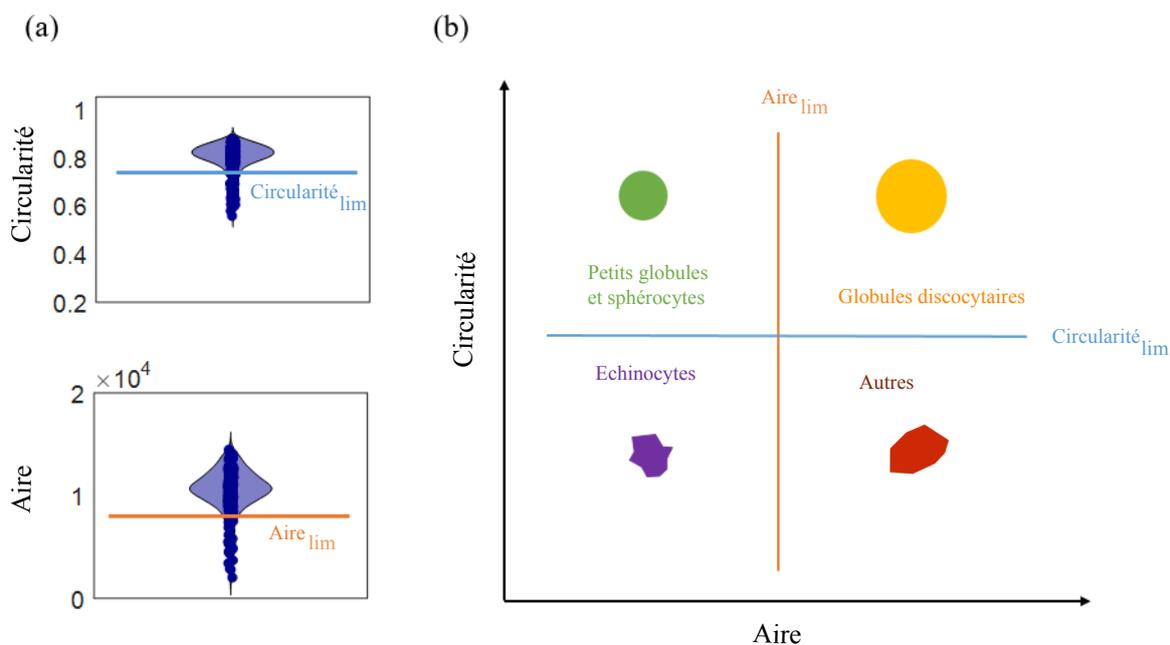


FIGURE 2.17 – Délimitation des quatre zones. Illustration d'une carte 2D aire-circularité et des quatre familles aux géométries distinctes. (a) Les paramètres d'aire et de circularité limites sont définis de manière visuelle à l'aide des distributions de chaque paramètre. (b) Géométries types trouvées dans les 4 zones.

2.5 Analyse de corrélations

Nous avons utilisé dans ce travail des outils classiques d'analyse statistique de corrélation à savoir le coefficient de corrélation de Pearson r et la valeur p (p-value en anglais). Bien que ces outils doivent être considérés avec précaution, pouvant mener à de fausses interprétations, ils sont aujourd'hui largement utilisés, notamment dans le domaine de la biophysique ou de la médecine. Il nous semble donc nécessaire de les redéfinir ici brièvement.

2.5.1 Corrélation et coefficient de Pearson

En probabilité et en statistique, étudier la corrélation entre plusieurs variables correspond à étudier l'intensité de la liaison qui existe entre elles. Le plus souvent, l'analyse de corrélation recherche l'existence d'une relation linéaire entre deux variables x et y supposées distribuées normalement. La corrélation est alors caractérisée par le coefficient de corrélation linéaire de Pearson r . Il s'agit d'une mesure normalisée de la covariance – façon dont 2 variables varient ensemble – qui varie entre -1 et +1. Plus les données représentant y en fonction de x se rapprochent d'une ligne droite, plus r se rapproche de -1 ou +1. La norme du coefficient, $|r|$, quantifie la force de la relation, et son signe son orientation. Lorsque $r > 0$, y augmente quand x augmente, lorsque $r < 0$, y diminue quand x augmente. Quand $r = 0$, il n'existe pas de relation linéaire entre les variables. Il est cependant possible que les variables soient corrélées par une autre relation. La Figure 2.18 représente quelques nuages de points simulés et associés à leurs coefficients de corrélation linéaire de Pearson.

Nous proposons de quantifier la force de la corrélation par les termes "négligeable", "faible", "modérée", "forte" et "très forte" comme proposé dans le Tableau 2.1, en s'inspirant de la littérature. Ces seuils sont purement arbitraires, et la valeur de r doit être interprétée dans le contexte de la question scientifique posée.

$ r < 0,2$	Corrélation négligeable
$0,2 \leq r < 0,4$	Corrélation faible
$0,4 \leq r < 0,7$	Corrélation modérée
$0,7 \leq r < 0,9$	Corrélation forte
$0,9 \leq r $	Corrélation très forte

TABLEAU 2.1 – Force de la corrélation.

2.5.2 Significativité statistique et p-value

Tout échantillon statistique étant de taille finie et inévitablement soumis aux erreurs de mesures, il est statistiquement possible d'observer une corrélation entre deux variables qui n'en présentent en réalité pas. La probabilité d'observer un tel phénomène est quantifiée par la p-value, p . Plus généralement, la p-value mesure la probabilité d'observer un résultat dans le cadre d'une hypothèse nulle. Par exemple, supposons que nous mesurons une corrélation avec $r = 0,6$ dans l'hypothèse nulle où $r = 0$ (il n'y a pas de corrélation). Si la p-value est faible, typiquement $p \leq 0,05$, il est très peu probable de mesurer $r = 0,6$ par hasard. Alors, l'hypothèse nulle ($r = 0$) est rejetée et la corrélation observée est considérée comme statistiquement significative. Il s'agit d'une sorte de raisonnement par l'absurde.

Traditionnellement, il existe trois seuils de significativité pour un résultat :

- $0,01 < p \leq 0,05$: corrélation significative (souvent représenté par * en biologie).

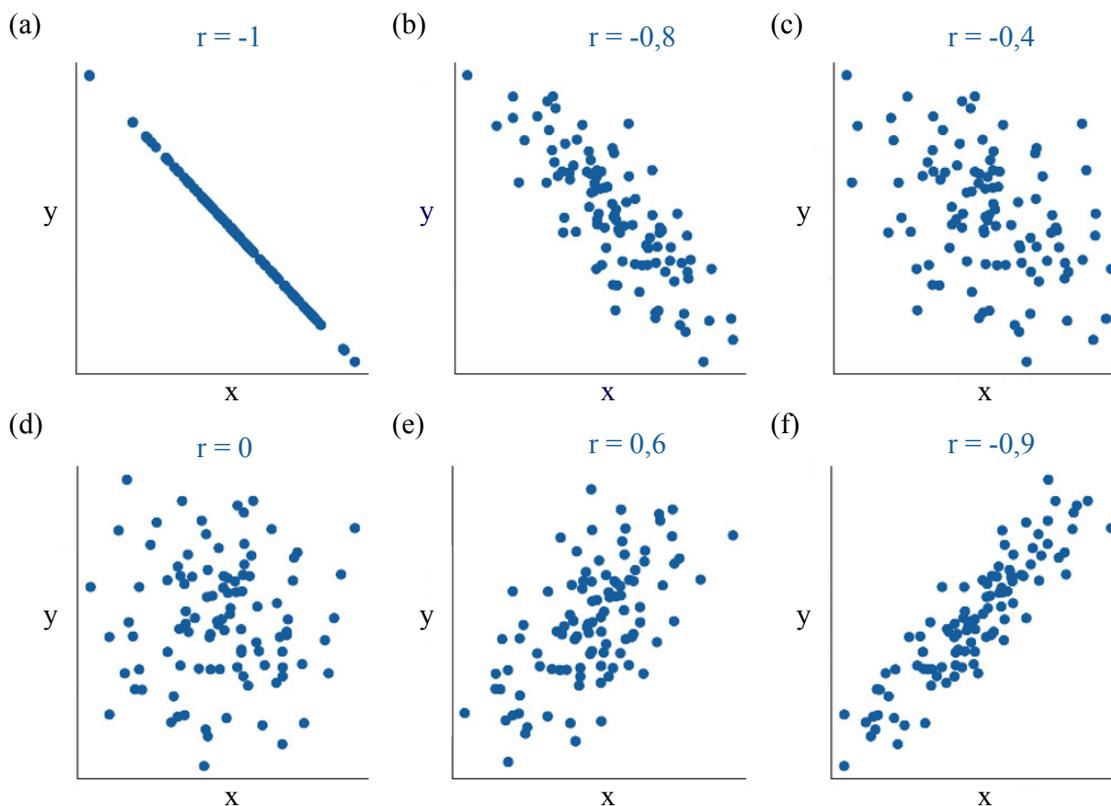
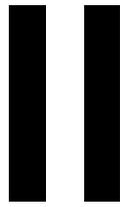


FIGURE 2.18 – **Corrélation de Pearson.** Exemple de nuages de points (x, y) dont les coefficients de corrélation linéaire de Pearson associés varient entre -1 et 1. Plus on se rapproche d'une ligne droite, plus r se rapproche de -1 ou +1. Quand $r = 0$, il n'existe pas de corrélation linéaire, entre les deux variables. Figure adaptée de [109].

- $0,001 < p \leq 0,01$: corrélation très significative (souvent représenté par ** en biologie).
- $0,001 < p \leq 0,01$: corrélation très hautement significative (souvent représenté par *** en biologie).

Dans cette thèse, nous différencierons simplement les cas $p > 0,05$ (corrélation non significative) et $p \leq 0,05$ (corrélation significative). Contrairement au coefficient de Pearson r , la p -value ne fournit pas d'information sur le degré de corrélation entre les deux variables. Par exemple, si l'échantillon statistique est grand, il est possible d'avoir de faibles coefficients de corrélation "statistiquement significatifs". Dans nos travaux, nous utilisons la fonction *fitlm* de Matlab pour étudier l'existence d'une corrélation linéaire entre deux variables et calculer les valeurs de r et de p associées à l'hypothèse nulle $r = 0$.



ROTORS MOLÉCULAIRES EN SOLUTION

3

LE DASPI, SONDE DE VISCOSITÉ DANS LES FLUIDES SIMPLES

Nous nous intéressons ici au rotor moléculaire DASPI. Nous montrons que ses propriétés spectrales n'interfèrent pas avec celles de l'hémoglobine, ce qui en fait un rotor adapté aux globules rouges. Nous étudions sa sensibilité à la viscosité dans des fluides simples.

3.1	Propriétés du rotor moléculaire DASPI	43
3.2	Relation de Förster-Hoffmann dans les fluides simples	45

3.1 Propriétés du rotor moléculaire DASPI

Le rotor moléculaire DASPI (trans-4-[4-(Diméthylamino)styril]-1-méthylpyridinium iodide) appartient à la famille des stilbènes [78]. Sa structure chimique est représentée en Figure 3.1. Lors de la formation de l'état TICT sous photo-excitation, le transfert d'électron se fait à partir du groupement amine de gauche encadré en rouge vers le groupement amine de droite encadré en bleu.

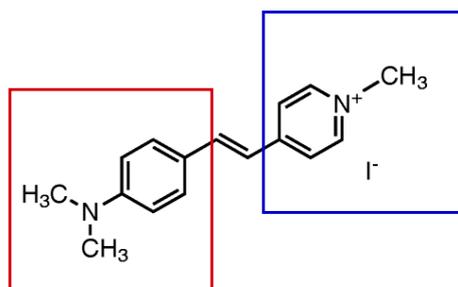


FIGURE 3.1 – **Molécule de DASPI.** Les groupements donneurs et accepteurs d'électrons, caractéristiques des rotors moléculaires, sont encadrés respectivement en rouge et bleu.

Nous étudions la réponse du DASPI dans plusieurs fluides simples (fluides moléculaires purement visqueux) : le DMSO, l'éthylène glycol et le glycérol ainsi que dans une solution d'hémoglobine. Nous caractérisons les propriétés spectrales du DASPI – longueurs d'onde d'absorption et d'émission – et sa réponse à la viscosité. Pour chaque solution, le DASPI est introduit à concentration 3,3 μM , et les matrices excitation-émission mesurées au spectrophotomètre Cary Ellipse (excitation 350 nm-650 nm, émission 450 nm-750 nm, balayage à 5 nm à vitesse 600 nm/min, tension du détecteur PMT 600 V). La solution d'hémoglobine est issue de la solution mère de concentration 33 g/dL et est fortement diluée dans le PBS (1000x) afin de réduire son absorbance. Les matrices excitation-émission sont présentées en Figure 3.2. Les spectres (a, b, c et e) du DASPI,

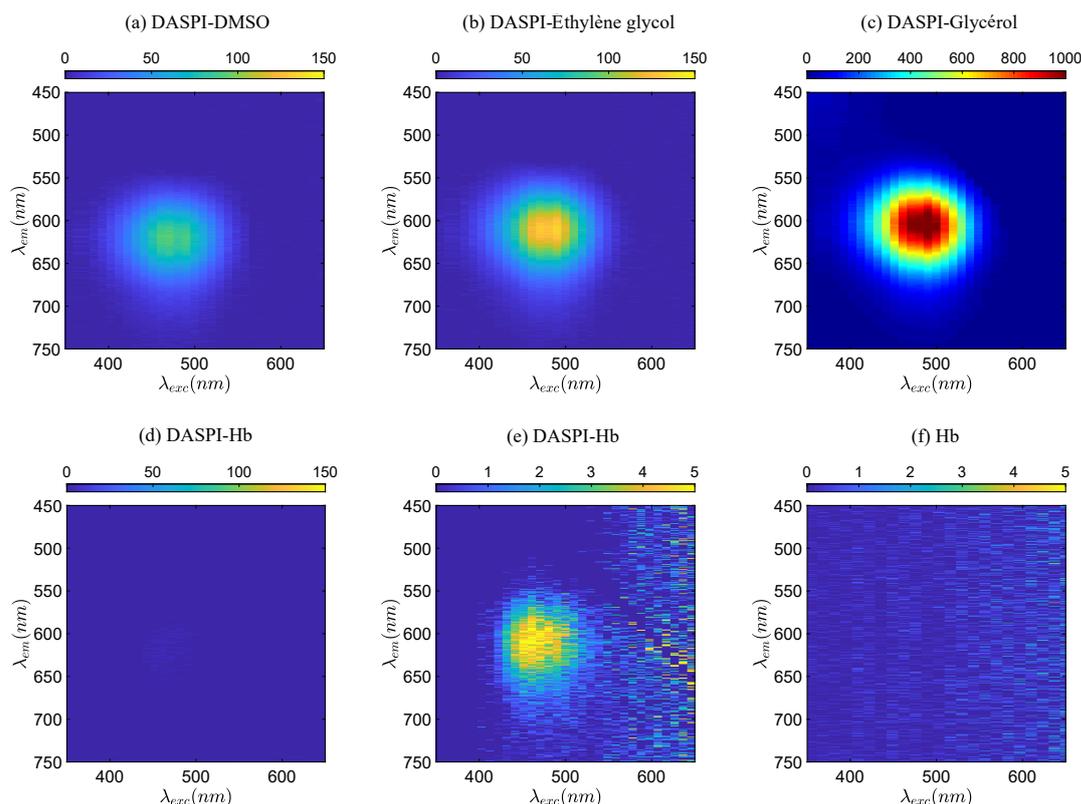


FIGURE 3.2 – **Matrices excitation-émission.** Le rotor moléculaire DASPI est introduit à une concentration de $3,3 \mu\text{M}$ dans (a) le DMSO, (b) l'éthylène glycol, (c) le glycérol et (d, e) une solution d'hémoglobine (dilution 1000x, concentration $\sim 33 \text{ mg/dL}$). La matrice de l'hémoglobine seule (f) est également mesurée pour prouver qu'il n'y a pas de fluorescence intrinsèque de l'hémoglobine dans la gamme du DASPI. Résultats publiés dans [110].

d'un fluide à l'autre, sont similaires avec une émission à bande unique autour de 600 nm pour une excitation autour de 480 nm. Dans les fluides simples (a, b et c), la fluorescence augmente avec la viscosité de la solution, $\eta_{\text{DMSO}} < \eta_{\text{éthylène-glycol}} < \eta_{\text{glycérol}}$.

Dans l'hémoglobine (d,e), l'émission du rotor est plus faible, comme le montre le spectre (d) à la même échelle que les spectres (a) et (b), alors que sa viscosité après dilution est proche de celle du DMSO (spectre (a)). Cette faible intensité s'explique par l'absorbance de l'hémoglobine aux longueurs d'onde du DASPI. Nous verrons également au Chapitre 4, que le DASPI présente une réponse particulière quand il est en présence de protéines.

Nous présentons en Figure 3.3 les spectres d'absorption de l'hémoglobine et du DASPI, seul ou dans une solution d'hémoglobine. Sur le spectre de l'hémoglobine seule, un intense pic d'absorption autour de 400 nm est mesuré, appelé bande de Soret [111]. La gamme d'excitation-émission du DASPI, entre 450 nm et 600 nm, se trouve en dehors de ce pic, dans un minimum local d'absorbance de l'hémoglobine. Cependant, même dans ce minimum, l'absorbance de l'hémoglobine est non-négligeable, et sera d'autant plus importante que la solution d'hémoglobine sera concentrée. Le Chapitre 4 s'intéresse à l'effet de l'absorbance de l'hémoglobine sur le signal du DASPI mesuré et à sa correction. Enfin, le spectre du mélange Hb-DASPI montre que les pics caractéristiques des deux molécules (Hb, DASPI) sont présents, ce qui atteste de leur présence en solution malgré la forte dilution appliquée et confirme que le DASPI est actif dans une telle solution.

La matrice de la solution d'Hb diluée x1000 sans DASPI est présentée en Figure 3.2-(f). Elle est mesurée pour rechercher une potentielle fluorescence intrinsèque de l'hémoglobine dans la gamme spectrale du DASPI. Nous n'en observons aucune, ce que la littérature confirme : la fluo-

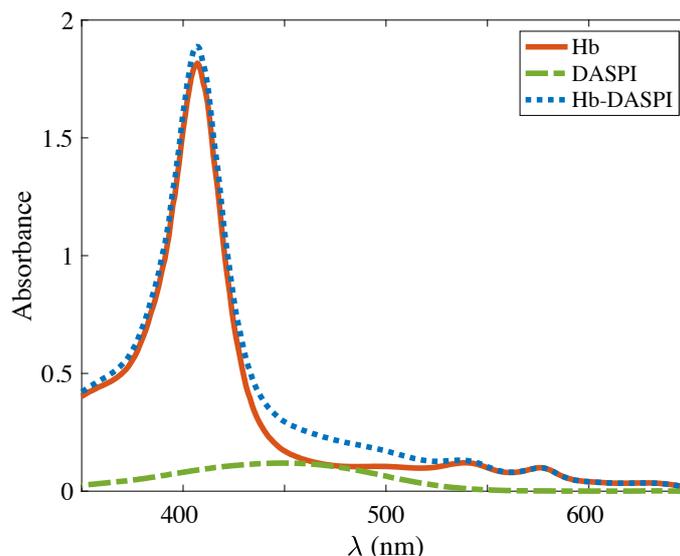


FIGURE 3.3 – **Spectres d'absorption.** Nous présentons les spectres des solutions d'hémoglobine (x1 000), de DASPI (dans du DMSO), et de mélange hémoglobine-DASPI. Résultats publiés dans [110].

rescence de l'hémoglobine est connue pour être dans l'ultraviolet avec des maxima d'excitation en dessous de 400 nm et d'émission en dessous de 460 nm [112]. Le DASPI n'interfère donc pas avec la fluorescence intrinsèque de l'hémoglobine, ce qui en fait un rotor adapté à l'utilisation dans les globules rouges.

Conclusion De cette analyse, nous retiendrons que l'intensité de fluorescence du DAPSI augmente dans des fluides simples de viscosité croissantes. Le DASPI se situe dans un minimum local d'absorption de l'hémoglobine mais celle-ci reste non négligeable, et nécessitera que l'on s'y attarde afin de corriger son effet. Enfin, les propriétés d'absorbance et de fluorescence du DASPI sont découplées de celles de l'hémoglobine ce qui en fait un rotor adapté aux globules rouges.

3.2 Relation de Förster-Hoffmann dans les fluides simples

Nous étudions la relation entre l'intensité de fluorescence du DASPI et la viscosité des fluides simples. La relation de Förster-Hoffmann $I = C \cdot \eta^x$ est-elle vérifiée? De manière générale, la réponse d'un rotor moléculaire dépend de son interaction avec le milieu [72, 78, 113]. Nous étudions ici l'effet de la viscosité, la polarité, la température et la concentration en rotor sur l'obtention d'une relation de Förster-Hoffmann et sur les paramètres x et C .

La réponse du DASPI est étudiée dans des mélanges d'éthylène glycol/glycérol et des mélanges d'eau/glycérol par microscopie de fluorescence (Figure 3.4). La viscosité des solutions est mesurée de manière concomitante par microrhéologie. Pour chaque solution, le pourcentage relatif des deux composants du mélange est contrôlé et permet d'obtenir une large gamme de viscosité, typiquement 2-200 mPa.s. Les solutions d'éthylène glycol/glycérol sont choisies comme système d'étude car la polarité reste approximativement constante lorsque le pourcentage relatif des composants et donc la viscosité varie. En effet, les permittivités diélectriques du glycérol et de l'éthylène-glycol sont proches, respectivement 42,2 Fm et 37,7 Fm [72]. Dans les solutions aqueuses de glycérol au contraire, la constante diélectrique de l'eau est de 80,1 Fm⁻¹ [72], bien plus élevée que celle du glycérol. Ainsi, la polarité du solvant diminue avec l'augmentation de concentration en glycérol, et donc avec la viscosité du mélange. Les mesures sont faites à diffé-

rentes températures, entre 16°C et 30°C, et à différentes concentrations en DASPI : 0,01, 0,1 et 1 mM. Nous analysons brièvement l'influence des paramètres viscosité, solvant, polarité, température et concentration en rotor sur l'obtention d'une relation de Förster-Hoffmann avec le DASPI.

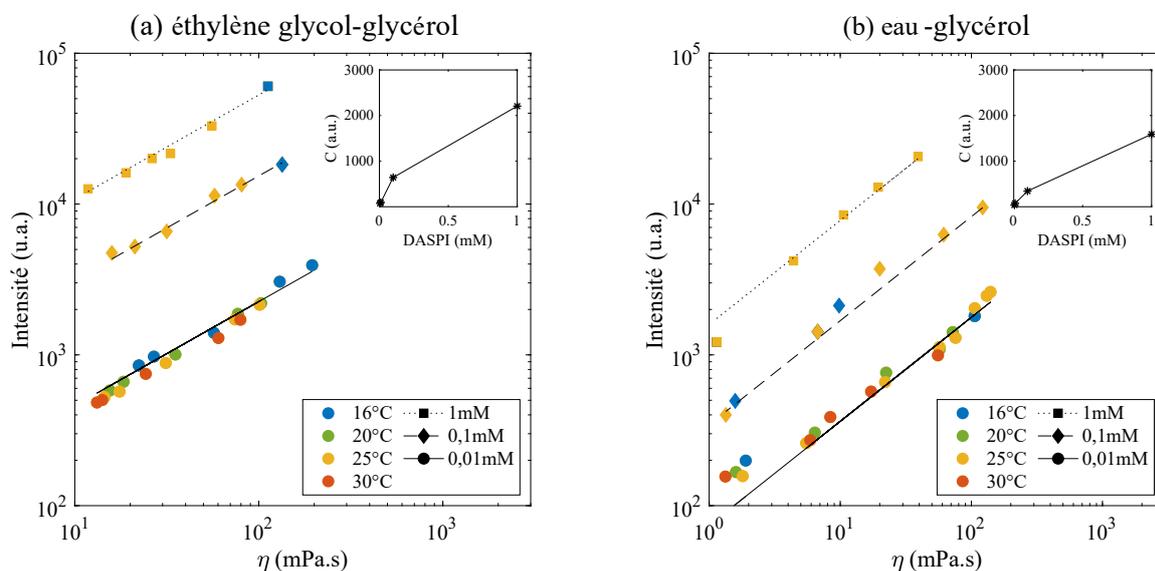


FIGURE 3.4 – **Relations de Förster-Hoffmann.** Intensité de fluorescence du rotor moléculaire DASPI à des concentrations de 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM en fonction de la viscosité pour (a) des solutions d'éthylène glycol/glycérol et (b) des solutions aqueuses de glycérol. La température des solutions est variée entre 16°C et 30°C. Les lignes continues et pointillées représentent les ajustements des données par une relation de Förster-Hoffmann. Les valeurs du paramètre C en résultant sont présentées en insert en fonction de la concentration en DASPI. Résultats publiés dans [110].

Effet de la viscosité Dans les deux mélanges, et quelle que soit la concentration en DASPI, l'intensité de fluorescence augmente avec la viscosité selon une relation de Förster-Hoffmann. Les paramètres C et x sont respectivement $C = 74, 344, 1590$ et $x = 0,70 \pm 0,01$ dans les mélanges d'eau/glycérol et $C = 94, 642, 2206$ et $x = 0,69 \pm 0,01$ dans les mélanges d'éthylène glycol/glycérol. La sensibilité à la viscosité, représentée par le paramètre x , est similaire et proche de 0,7 dans les deux solutions. Aux faibles viscosités, typiquement 1-2 mPa.s, nous observons une déviation à la relation de Förster-Hoffmann dans les solutions aqueuses de glycérol en cohérence avec la littérature [72, 78].

Effet du solvant Dans les deux mélanges, des relations de Förster-Hoffmann sont obtenues avec des paramètres x proches mais des C différents. Ainsi, le niveau moyen de fluorescence varie avec le milieu, ce qui suggère que C est contrôlé par les interactions entre le rotor et les molécules de solvant.

Effet de la polarité Dans les solutions aqueuses de glycérol, la polarité varie avec le pourcentage relatif de chaque composant du mélange. Malgré cela, une relation de Förster-Hoffmann est obtenue avec la viscosité, suggérant que la polarité a peu d'effet sur l'obtention d'une telle relation. Ce résultat est en accord avec des études précédentes qui affirment que les rotors moléculaires avec une seule bande d'émission montrent une intensité d'émission fortement dépendante de la viscosité mais peu de la polarité du solvant [70-72].

Effet de la température Nous observons dans les deux mélanges que les couples intensité-viscosité obtenus aux différentes températures (points colorés sur les courbes à 0,01 mM de DASPI) s'alignent sur la même courbe maîtresse. Ceci signifie que x et C de la relation de Förster-Hoffmann ne dépendent pas de la température. Ce résultat est cohérent avec une étude précédente menée par Howell et al. [113].

Effet de la concentration en DASPI Dans les deux mélanges, des relations de Förster-Hoffmann sont obtenues avec la même sensibilité x pour les trois concentrations en DASPI étudiées. Le paramètre C augmente significativement et de façon non linéaire avec la concentration en DASPI (voir inserts de la Figure 3.4). Cette non linéarité à haute concentration a déjà été observée [114]. Ainsi, la concentration en DASPI aura un effet sur l'intensité de fluorescence émise et pourra être ajustée selon le dispositif expérimental de détection.

Conclusion Dans les solutions d'éthylène glycol/glycérol et de glycérol/eau, l'intensité de fluorescence du DASPI montre une sensibilité à la viscosité locale η , et suit la relation de Förster-Hoffmann sur deux décades. L'exposant x , qui mesure la sensibilité du rotor moléculaire dans le solvant, est égal à 0,7 dans les deux solutions, ce qui est proche des valeurs théoriques prédites de $2/3$ [78] ou de 0,6 [75]. La polarité n'influe pas sur l'obtention d'une relation de Förster-Hoffmann. Nos données montrent que la température a peu d'influence sur les paramètres x et C . Enfin, le paramètre C augmente de façon non-linéaire lorsque la concentration de DASPI augmente, ce qui permet d'ajuster la concentration de rotor à la sensibilité du dispositif de lecture d'intensité.

4

LE DASPI DANS LES PROTÉINES

Dans ce chapitre, nous étudions deux protéines : l'hémoglobine et la BSA. Nous validons l'utilisation de la microrhéologie dans les protéines, et proposons un modèle pour la correction de l'absorbance de l'hémoglobine. Enfin, nous caractérisons la réponse du DASPI dans ces solutions.

4.1	Problématique	49
4.2	Microrhéologie dans les protéines	50
4.3	Absorbance et correction dans l'hémoglobine	51
4.3.1	Généralités sur l'absorbance	51
4.3.2	Modèle de correction d'absorbance	52
4.3.3	Effet de l'absorbance à l'échelle d'un globule	55
4.4	Réponse du DASPI	56
4.4.1	Contrôle de viscosité par concentration	56
4.4.2	Contrôle de viscosité par température	59
4.4.3	Conclusion	61

4.1 Problématique

Nous désirons, de la même façon que dans les fluides simples, caractériser la réponse du rotor moléculaire DASPI dans des solutions de protéines avec une attention particulière pour l'hémoglobine, composant principal du cytosol des globules rouges. Comme précédemment, la réponse du DASPI sera étudiée en microscopie de fluorescence et la viscosité des solutions mesurée de manière concomitante par microrhéologie, en ajoutant des sondes en solution. Cependant, ces deux mesures peuvent être affectées par la présence de protéines :

- la microrhéologie par une interaction sonde-protéine qui peut fausser la mesure de viscosité;
- la mesure de fluorescence par l'absorbance de l'hémoglobine aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission du DASPI.

Nous nous intéressons à deux protéines : l'hémoglobine et la BSA. La BSA ressemble à l'hémoglobine en terme de structure (globulaire), poids moléculaire (~ 65 kDa), et taille (rayon ~ 35 Å), mais n'est pas absorbante. Nous validons l'utilisation de la microrhéologie en solutions de protéines et analysons la réponse des billes sondes dans de telles solutions (section 4.2). Après de brèves généralités sur l'absorbance, nous proposons un modèle de correction de son effet dans les solutions d'hémoglobine étudiées (section 4.3). Enfin, nous étudions la réponse du DASPI dans ces solutions de protéines (section 4.4).

4.2 Microrhéologie dans les protéines

En microrhéologie, la mesure de viscosité dans les solutions de protéines peut être faussée si des protéines s'adsorbent à la surface des sondes, engendrant une baisse de concentration de protéines en solution, une augmentation de la taille des sondes ou une agrégation entre sondes. Certaines équipes choisissent de nettoyer et revêtir leurs sondes microrhéologiques, de PEG ou de BSA par exemple, pour éviter l'adsorption de protéines à leurs surfaces [115-119].

Dans nos expériences, nous utilisons des billes de Latex brutes de $0,994\ \mu\text{m}$ de diamètre. Dans la BSA ou dans l'Hb, nous n'observons pas d'agrégation sonde-sonde. Pour les solutions de BSA les plus concentrées (40-52 g/dL), nous comparons les viscosités mesurées en microrhéologie à des mesures complémentaires réalisées au viscosimètre capillaire. Le principe du viscosimètre capillaire est le suivant : sous l'effet de la force gravitationnelle, le liquide s'écoule dans un mince tube capillaire selon une loi de Poiseuille. La viscosité du liquide η est alors déterminée selon la relation $\eta = K\rho\Delta t$, où ρ est la densité du fluide, Δt est le temps nécessaire au fluide pour parcourir une distance de contrôle et K un facteur qui dépend de la géométrie du tube. Pour le tube utilisé dans ces expériences, $K = 5,13 \cdot 10^{-4}\ \text{m}^2\text{s}^{-2}$.

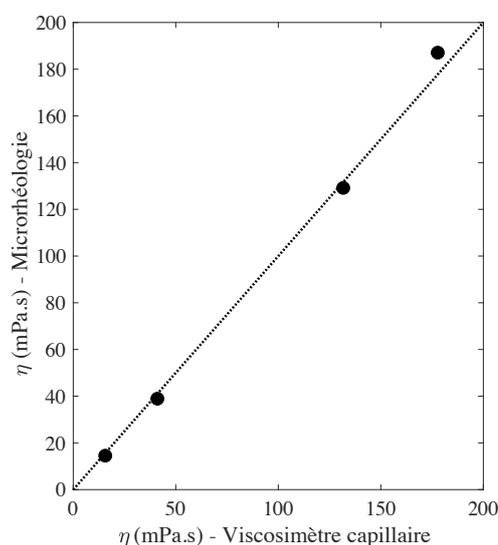


FIGURE 4.1 – **Microrhéologie et viscosimétrie capillaire dans les protéines.** La viscosité de solutions de BSA est mesurée par microrhéologie et au viscosimètre capillaire à $T = 25^\circ\text{C}$ dans la gamme 40-52 g/dL. La ligne pointillée représente la fonction $y = x$.

La Figure 4.1 montre une bonne corrélation entre les viscosités mesurées par microrhéologie et au viscosimètre capillaire, ce qui valide l'utilisation de billes de Latex brutes dans cette étude, et est cohérent avec les résultats d'une étude précédemment menée par Tu et al. [119]. La même étude n'a pas pu être faite dans l'hémoglobine car plusieurs dizaines de millilitres de solution sont nécessaires pour la passer au viscosimètre capillaire. N'ayant pas observé d'agrégation entre les sondes, nous supposons que s'il y a un effet d'adsorption de l'Hb sur les sondes, celui-ci reste faible, car les valeurs de viscosité mesurées dans l'hémoglobine aux concentrations physiologiques sont cohérentes avec celles trouvées dans la littérature [18].

Nous analysons maintenant les déplacements quadratiques moyens (MSDs) des microsondes qui nous informent sur les propriétés rhéologiques des solutions de protéines. La Figure 4.2 présente les MSDs issus du déplacement de 4 à 10 billes dans quatre solutions d'hémoglobine et quatre solutions de BSA couvrant les gammes de concentrations étudiées. Nous observons que les MSDs sont tous linéaires dans le temps, signature d'un fluide purement visqueux. Pour chaque

concentration, les différentes billes ont le même MSD, les solutions de protéine étudiées sont donc spatialement homogènes, même aux concentrations les plus élevées.

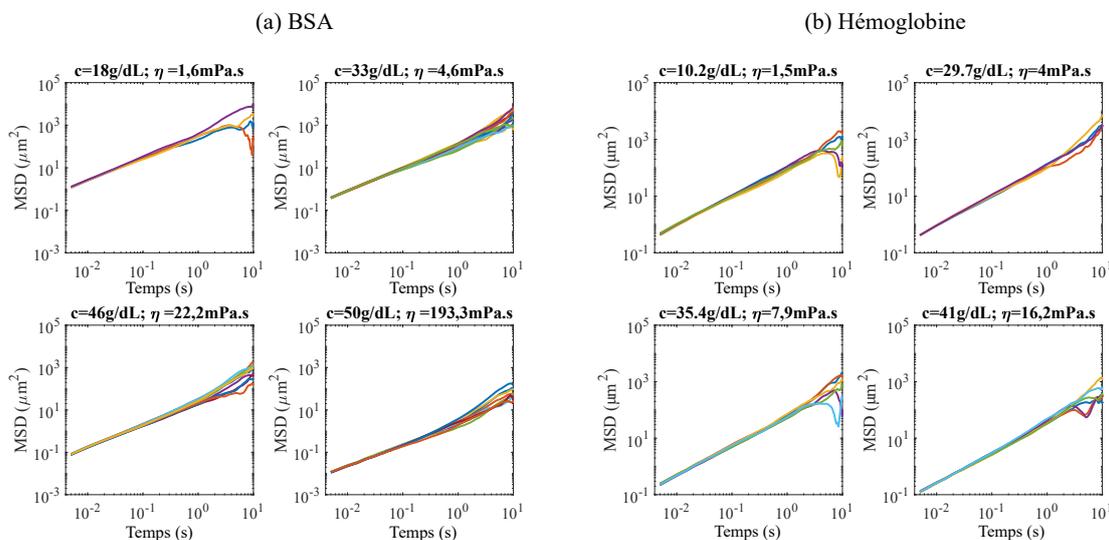


FIGURE 4.2 – MSDs de billes de Latex dans des solutions de BSA et d’hémoglobine. Les mesures sont faites à T = 25°C et pour différentes concentrations en protéines. Pour chaque figure, entre 4 et 10 billes sont analysées. Toutes les solutions apparaissent homogènes (MSDs identiques pour les différentes billes) et purement visqueuses (MSDs linéaires dans le temps).

Conclusion Les billes de Latex brutes peuvent être utilisées comme sonde de microrhéologie dans les protéines et, à l’échelle de la sonde, les solutions de protéines se comportent comme des fluides purement visqueux et sont spatialement homogènes.

4.3 Absorbance et correction dans l’hémoglobine

Comme expliqué au Chapitre 3, le DASPI se situe dans un minimum local d’absorbance de l’hémoglobine mais celle-ci reste non négligeable. Il est donc nécessaire, pour ne pas affecter l’interprétation du signal du DASPI en terme de propriétés rhéologiques, que son effet soit corrigé dans nos expériences. Après quelques généralités sur l’absorbance, nous proposons un modèle permettant la correction de son effet dans l’hémoglobine. Ce modèle est validé dans un système d’étude à géométrie triangulaire permettant de sonder des niveaux d’absorbance croissants.

4.3.1 Généralités sur l’absorbance

L’absorbance d’un milieu $A(\lambda)$ caractérise son efficacité d’absorption de la lumière à la longueur d’onde λ . Elle est définie par :

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} \tag{4.1}$$

où I_{λ}^0 et I_{λ} sont les intensités des faisceaux respectivement entrant et sortant du milieu absorbant. Dans la plupart des cas, l’absorbance d’un échantillon suit la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \epsilon \ell c \tag{4.2}$$

avec $\epsilon(\lambda)$ le coefficient d’extinction molaire en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, c la concentration en espèce absorbante en $mol.L^{-1}$ et ℓ la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu en cm.

La loi de Beer-Lambert repose sur le principe suivant : schématiquement si chaque molécule possède une surface de capture de photons $\sigma(\lambda)$ (cross-section en anglais), alors la surface de capture d'un volume d'épaisseur $d\ell$ illuminé par un faisceau de section S est la somme des surfaces des molécules présentes dans le volume à savoir σdN avec $dN = \mathcal{N}_a c S d\ell$ le nombre de molécules dans le volume et \mathcal{N}_a le nombre d'Avogadro. La probabilité qu'un photon soit capturé est le rapport des surfaces $\sigma dN/S$ et correspond également à la fraction de lumière absorbée par cette couche $-dI/I$. Ainsi,

$$-\frac{dI}{I} = \frac{\sigma dN}{S}$$

ce qui donne par intégration

$$-\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \mathcal{N}_a \sigma \ell c$$

ou encore

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \frac{\mathcal{N}_a \sigma}{\ln(10)} \cdot \ell c \quad (4.3)$$

On peut alors identifier le coefficient d'extinction molaire

$$\epsilon = \frac{\sigma \cdot \mathcal{N}_a}{\ln(10)}$$

ϵ dépend de la longueur d'onde λ via le paramètre σ .

La loi de Beer-Lambert stipule donc que l'absorbance d'une solution dépend du nombre d'entités absorbantes présentes sur le trajet de la lumière. Ainsi, deux solutions de concentration c_1 et c_2 auront la même absorbance si les longueurs parcourues dans chaque solution ℓ_1 et ℓ_2 vérifient $c_1 \ell_1 = c_2 \ell_2$. C'est ce que nous appellerons l'équivalence longueur-concentration, schématisée en Figure 4.3.

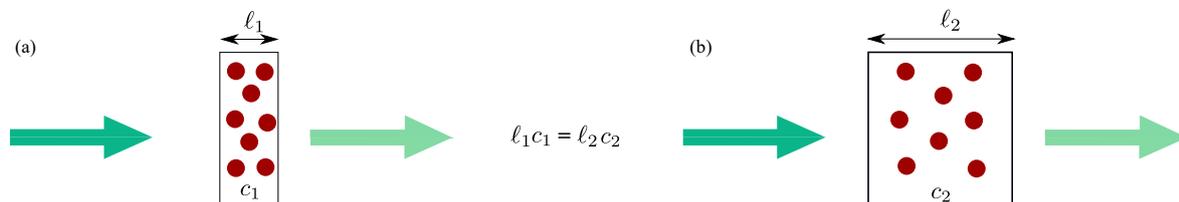


FIGURE 4.3 – **Équivalence longueur-concentration.** Les échantillons (a) et (b) ont la même absorbance car contiennent le même nombre de molécules absorbantes, représentées par les ronds rouges. Elles vérifient $\ell_1 c_1 = \ell_2 c_2$.

Notons qu'une perte de linéarité de la relation de Beer-Lambert avec la concentration peut être observée à haute concentration avec la formation d'agrégats par exemple. Dans l'hémoglobine, Friebel et al. [120] ont montré expérimentalement que Beer-Lambert restait valable aux concentrations physiologiques (31-36 g/dL), ainsi nous pourrions l'utiliser pour construire notre modèle de correction d'absorbance dans la suite.

4.3.2 Modèle de correction d'absorbance

En microscopie de fluorescence, le signal issu du DASPI dans une solution d'hémoglobine n'est pas représentatif de la réponse de la sonde à son environnement en raison de l'absorbance subie sur les trajets aller (excitation) et retour (émission) de la lumière.

Nous proposons une expression théorique de ce signal prenant en compte les effets d'absorbance de l'hémoglobine et testons sa validité expérimentalement à l'aide d'un dispositif à géométrie triangulaire. Cette géométrie permet de sonder la réponse du rotor pour plusieurs épaisseurs

de solution d'hémoglobine et donc plusieurs degrés d'absorbance. Enfin, nous proposons une expression d'intensité corrigée, proportionnelle au rendement quantique des molécules de DASPI dans la solution d'hémoglobine. L'intensité corrigée dans l'hémoglobine sera comparée à celle dans la BSA – non absorbante – en section 4.4.

Intensité mesurée en géométrie standard Considérons une solution d'hémoglobine, contenant du DASPI, placée sous microscope inversé dans la géométrie que l'on nommera standard, c'est à dire entre lame et lamelle séparées par un espaceur de hauteur L (Figure 4.4-(a)). Le rotor moléculaire est excité à la longueur d'onde λ_{exc} et réémet à la longueur d'onde λ_{em} . Dans ce paragraphe, nous proposons une expression pour l'intensité mesurée à la caméra, I_{mes} .

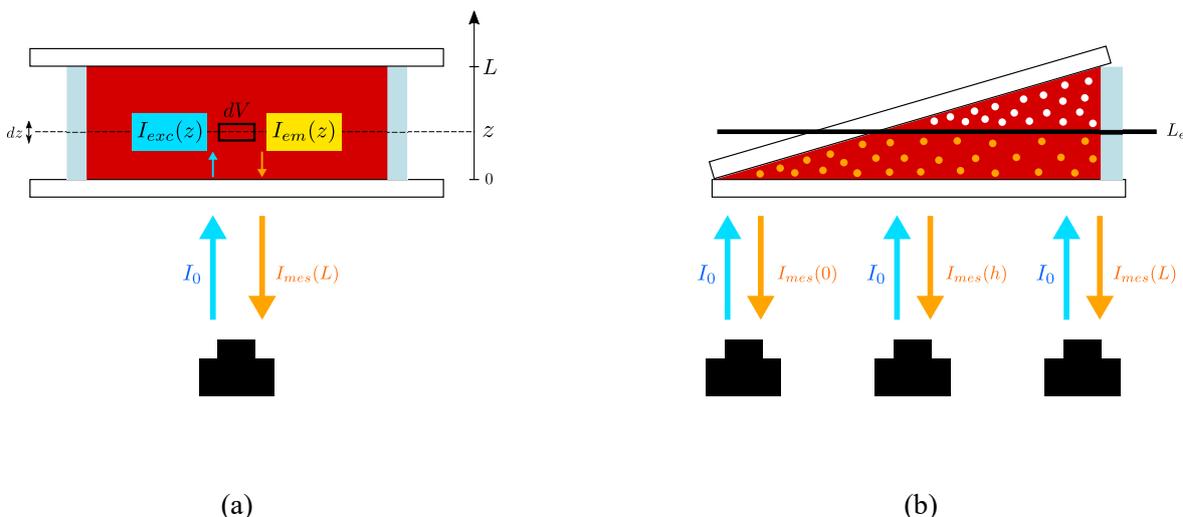


FIGURE 4.4 – **Géométries d'étude.** (a) Géométrie standard : la solution d'hémoglobine est piégée entre lame et lamelle séparées par un espaceur de hauteur L . Dans notre expérience $L = 250 \mu\text{m}$. L'intensité du faisceau incident est noté I_0 et $I_{exc}(z)$, $I_{em}(z)$, $I_{mes}(L)$ sont décrits dans le texte. (b) Géométrie triangulaire : la solution d'hémoglobine est piégée entre deux lamelles séparées par un espaceur de hauteur L positionné d'un seul côté, créant une géométrie triangulaire. Au-delà d'une longueur d'écrantage L_e , on verra que les molécules de DASPI ne reçoivent plus de signal d'excitation en raison de l'absorbance de la couche d'hémoglobine située en dessous. Les molécules de DASPI en solution sont représentées par des points jaunes et blancs. Les jaunes sont celles qui reçoivent un signal d'excitation, et les blancs celles qui n'en reçoivent pas. Résultats publiés dans [121].

Le faisceau de lumière excitatrice de longueur d'onde λ_{exc} et d'intensité I_0 est issu de l'objectif du microscope inversé. Nous supposons que ce faisceau est cylindrique de section S . Selon la loi de Beer-Lambert, l'élément de volume $dV = S \cdot dz$ situé à la hauteur z reçoit une intensité d'excitation $I_{exc}(z)$ inférieure à I_0 en raison de l'absorbance de la solution sur la hauteur z :

$$I_{exc}(z) = I_0 \cdot 10^{-\epsilon_{exc} \cdot z \cdot c_{Hb}}$$

avec c_{Hb} la concentration de la solution d'hémoglobine et $\epsilon_{exc} = \epsilon_{exc}(\lambda_{exc})$ le coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine à la longueur d'onde d'excitation. Cet élément de volume contient $dN = \mathcal{N}_a \cdot c_{DASPI} \cdot dV$ molécules de DASPI dont l'émission de fluorescence est proportionnelle à l'intensité d'excitation $I_{exc}(z)$ et au rendement quantique des molécules Φ . L'intensité émise par cet élément de volume, à la longueur d'onde λ_{em} , s'écrit :

$$I_{em}(z) = I_{exc}(z) \cdot \Phi \cdot dN$$

La lumière émise doit encore une fois traverser la hauteur z d'hémoglobine (trajet retour), avant d'être reçue sur la caméra. Un nouveau facteur d'atténuation du signal, issu de Beer-Lambert, s'ap-

plique : $10^{-\epsilon_{em} \cdot z \cdot c_{Hb}}$, avec $\epsilon_{em} = \epsilon_{em}(\lambda_{em})$ le coefficient d'extinction molaire de l'hémoglobine, cette fois à la longueur d'onde d'émission du rotor. Comme la caméra collecte l'intensité provenant de tous les éléments de volume compris entre $z = 0$ et $z = L$, l'intensité mesurée I_{mes} s'écrit :

$$I_{mes}(L) = \int_0^L I_{em}(z) \cdot 10^{-\epsilon_{em} \cdot z \cdot c_{Hb}} dz = \int_0^L I_0 \cdot \Phi \cdot \mathcal{N}_a \cdot c_{DASPI} \cdot S \cdot 10^{-(\epsilon_{exc} + \epsilon_{em}) \cdot z \cdot c_{Hb}} \cdot dz$$

ou encore :

$$I_{mes}(L) = P \cdot (1 - 10^{-L/L_e}) \quad (4.4)$$

avec

$$L_e = \frac{1}{c_{Hb} \cdot (\epsilon_{exc} + \epsilon_{em})}; \quad P = \frac{I_0 \cdot \mathcal{N}_a \cdot c_{DASPI} \cdot S \cdot \Phi}{\ln(10)} \cdot L_e \quad (4.5)$$

Nous interprétons L_e comme une longueur d'écrantage au-dessus de laquelle les molécules de DASPI ne reçoivent aucun signal en raison de la forte absorbance du fluide situé en dessous (points blancs sur la Figure 4.4-(b)), et P comme la valeur de plateau que le signal de fluorescence atteint pour une épaisseur de fluide L_e ou plus. Dans la limite où L_e tend vers l'infini ($L/L_e \rightarrow 0$), correspondant à une situation d'absence d'écrantage par les molécules absorbantes, l'intensité mesurée dans l'équation 4.4 s'écrit au premier ordre :

$$\lim_{L/L_e \rightarrow 0} I_{mes}(L) = P/L_e \cdot L \cdot \ln(10) = I_0 \cdot \mathcal{N}_a \cdot c_{DASPI} \cdot S \cdot L \cdot \Phi \quad (4.6)$$

Elle est proportionnelle au rendement quantique Φ et correspond à l'intensité mesurée dans la limite de non-absorption.

Validation du modèle dans la géométrie triangulaire Notre expression 4.4 est testée dans la géométrie triangulaire illustrée sur la Figure 4.4-(b). Elle nous permet de sonder la réponse du rotor pour des épaisseurs croissantes d'hémoglobine. Dans cette géométrie, l'hémoglobine est piégée entre deux lamelles séparées d'un côté seulement par un espaceur de hauteur $L = 250 \mu\text{m}$. En se déplaçant le long de l'axe latéral, l'intensité $I_{mes}(h)$ est alors mesurée pour des couches de solution d'hémoglobine de hauteur h dans la gamme $0 \leq h \leq L$.

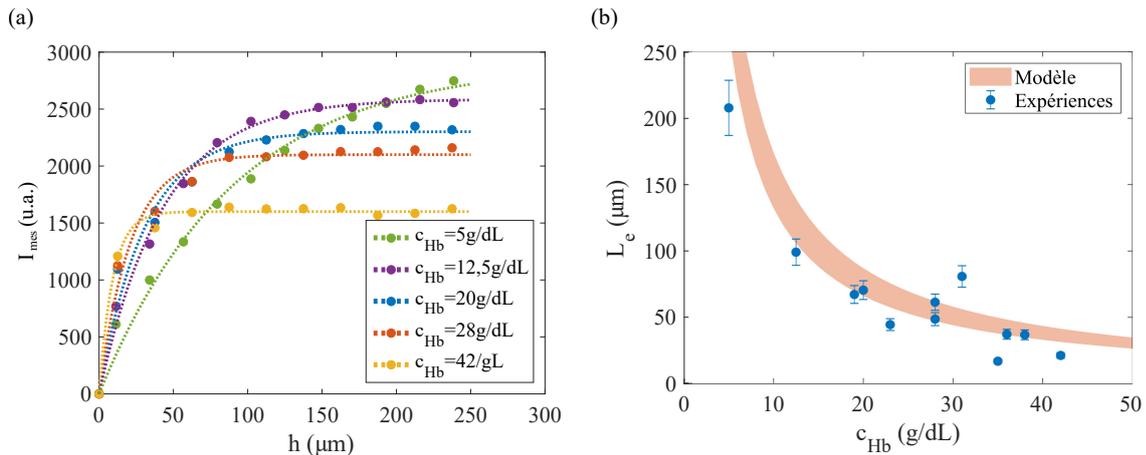


FIGURE 4.5 – **Validation du modèle de correction d'absorbance.** (a) Intensité de fluorescence $I_{mes}(h)$ du DASPI mesurée dans la géométrie triangulaire pour des solutions d'hémoglobine de concentration 5 – 42 g/dL. La concentration en DASPI est fixée à $c_{DASPI} = 1 \text{ mM}$. Les données sont ajustées avec l'équation 4.4 (lignes pointillées colorées). (b) Longueur d'écrantage L_e théorique et expérimentale en fonction de la concentration en hémoglobine de la solution. Les valeurs expérimentales de L_e sont obtenues en ajustant $I_{mes}(h)$ avec l'équation du modèle 4.4. Résultats publiés dans [121].

La Figure 4.5-(a) montre l'intensité de fluorescence mesurée à différentes hauteurs h , dans des solutions d'hémoglobine de concentration $c_{\text{Hb}} = 5, 12, 20, 28, 42 \text{ g/dL}$ couvrant la gamme d'intérêt. Pour toutes les concentrations, les courbes d'intensité de fluorescence avec la hauteur du fluide traversée sont ajustées par l'équation 4.4, avec un excellent accord. Ceci démontre expérimentalement l'existence d'une longueur d'écrantage L_e au-dessus de laquelle l'intensité émise par le rotor atteint une valeur plateau P .

La figure 4.5-(b) montre les longueurs d'écrantage L_e extraites des ajustements de I_{mes} avec l'équation 4.4, en fonction de la concentration d'hémoglobine c_{Hb} . Nous ajoutons sur la figure la plage théorique attendue pour L_e avec ce modèle (équation 4.5) en choisissant ϵ_{exc} entre $2,67 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et $3,03 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et ϵ_{em} entre $1,03 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ et $1,85 \cdot 10^6 \text{ m}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Les valeurs de ϵ ont été mesurées à partir du spectre d'absorption de l'hémoglobine diluée et les incertitudes sont dues à la largeur de la plage de longueurs d'onde sélectionnée par le dispositif de fluorescence : excitation 460-500 nm, détection 565-625 nm. Les prédictions théoriques pour $L_e(c_{\text{Hb}})$ (bande rouge) montrent un excellent accord avec les données expérimentales.

Nous choisissons alors la quantité P/L_e comme intensité corrigée car elle est directement proportionnelle au rendement quantique Φ des rotors moléculaires, comme c'est le cas en limite non-absorbante (équation 4.6) :

$$I_{\text{corr}}(L, c_{\text{Hb}}) = \frac{P}{L_e} = \frac{I_0 \cdot \mathcal{N}_a \cdot c_{\text{DASPI}} \cdot S}{\ln(10)} \cdot \Phi \quad (4.7)$$

En réécrivant l'expression ci-dessus avec les équations 4.4 et 4.5, l'intensité corrigée et l'intensité mesurée $I_{\text{mes}}(L)$ sont reliées par un terme correctif :

$$I_{\text{corr}}(L, c_{\text{Hb}}) = \frac{1}{L_e(c_{\text{Hb}}) \cdot (1 - 10^{-L/L_e(c_{\text{Hb}})})} \cdot I_{\text{mes}}(L) \quad (4.8)$$

Le terme correctif fait intervenir deux paramètres : la longueur d'écrantage L_e qui dépend de la concentration en hémoglobine c_{Hb} (équation 4.5), et la hauteur de l'espaceur L c'est à dire la hauteur du milieu absorbant sondé. Cette correction sera utilisée en section 4.4 pour comparer la réponse du rotor dans l'hémoglobine absorbante et la BSA non absorbante.

4.3.3 Effet de l'absorbance à l'échelle d'un globule

Dans la Partie III, nous étudierons le signal du DASPI dans les GRs. Nous nous interrogeons donc sur la pertinence d'une correction de l'absorbance de l'hémoglobine pour un globule.

Pour une concentration physiologique d'hémoglobine dans les globules, $c_{\text{Hb}} \sim 33 \text{ g/dL}$, la longueur d'écrantage caractéristique des effets d'absorbance est de l'ordre de $50 \mu\text{m}$ (Figure 4.5-(b)). Pour une telle solution étudiée dans un espaceur ($L = 250 \mu\text{m}$, Figure 4.6-(a)), $L > L_e$ alors les effets d'absorbance sont notables et doivent être corrigés. Lorsque l'on étudie des globules rouges, ceux-ci sédimentent à la surface de la lamelle de verre située à proximité de la caméra. La hauteur d'hémoglobine sondée correspond à la hauteur du globule soit $L \sim 1 - 3 \mu\text{m}$ (Figure 4.6-(b)). Pour les globules rouges, $L/L_e \ll 1$, nous nous situons donc dans la limite de non-absorption (équation 4.6) et à ces échelles les effets d'absorbance de l'hémoglobine sont négligeables. Ainsi, aucune correction ne sera nécessaire pour l'étude du signal du DASPI dans les globules.

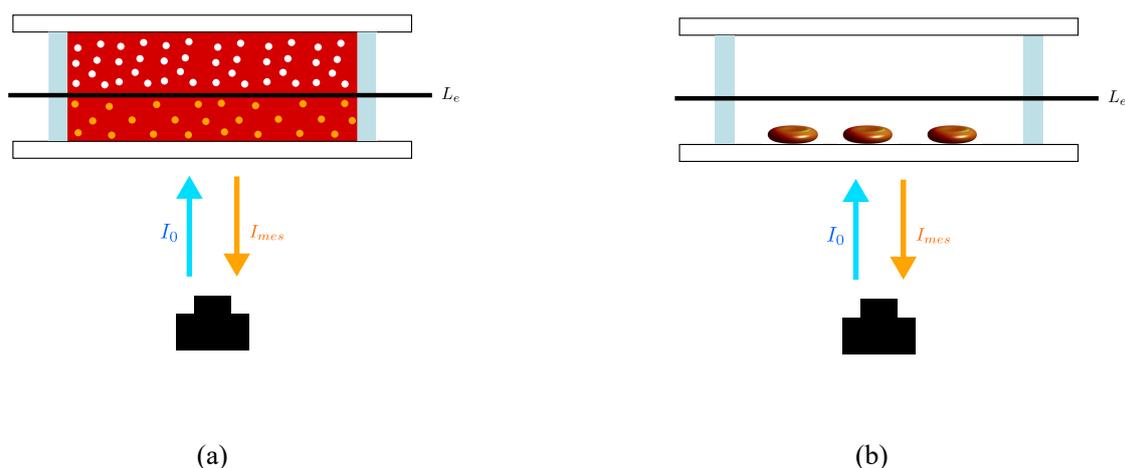


FIGURE 4.6 – **Absorbance à l'échelle d'un globule?** (a) Étude d'une solution d'hémoglobine en géométrie standard. Dans nos expériences la hauteur de l'espaceur est $L = 250 \mu\text{m}$. Pour une solution d'hémoglobine aux concentrations physiologiques (33 g/dL), L_e est proche de $50 \mu\text{m}$. Comme $L > L_e$, les effets d'absorbance ne sont pas négligeables et les molécules de DASPI représentées en blanc ne reçoivent pas de signal d'excitation en raison de l'absorbance de la solution. (b) Étude de globules rouges en géométrie standard. Les globules rouges sédimentent sur la lamelle du dessous. La solution d'hémoglobine dans le cytosol s'étend sur la hauteur caractéristique du globule, 1-3 μm , qui est inférieure à L_e , les effets d'absorbance sont donc négligeables.

4.4 Réponse du DASPI

Nous analysons la réponse du DASPI dans les deux protéines (Hb et BSA) lorsque la viscosité des solutions est variée par concentration (section 4.4.1) ou par température (section 4.4.2). Les solutions de BSA présentent des concentrations dans la gamme 1-54 g/dL. Les solutions d'Hb présentent des concentrations dans la gamme 2-42 g/dL.

4.4.1 Contrôle de viscosité par concentration

Ici, la viscosité des solutions est variée avec la concentration en protéines.

Courbe maîtresse intensité-viscosité

La Figure 4.7-(a) montre l'intensité de fluorescence du DASPI mesurée à la caméra en fonction de la viscosité des solutions mesurée en microrhéologie pour des solutions de BSA et d'hémoglobine.

Dans la BSA, les courbes intensité-viscosité sont présentées pour trois concentrations en DASPI : 0,01 mM, 0,1 mM et 1 mM. Dans l'hémoglobine, l'étude est réalisée à concentration fixée de 1 mM en DASPI. L'intensité augmente avec la viscosité dans les solutions de BSA et diminue dans les solutions d'Hb avant correction du signal, en raison de l'augmentation de l'absorbance. Le signal corrigé, lui, augmente avec la viscosité (Figure 4.7-(b)), et, comme c'est le cas dans la BSA, deux régimes de réponse du rotor - faible et forte viscosité - sont détectables.

Les intensités présentées étant exprimées en unités arbitraires, nous plaçons les courbes de la BSA et de l'Hb corrigée au même niveau, faisant alors apparaître une courbe maîtresse caractéristique de la réponse du rotor dans ces solutions de protéines (Figure 4.8). À faible viscosité, l'intensité augmente fortement et peut être ajustée par une loi de puissance avec un exposant $x = 3,4$. Ceci suggère une grande sensibilité du rotor à l'environnement protéique dans ce régime comparativement à une loi de Förster-Hoffmann pour laquelle $x = 0,7$. À plus haute viscosité, la

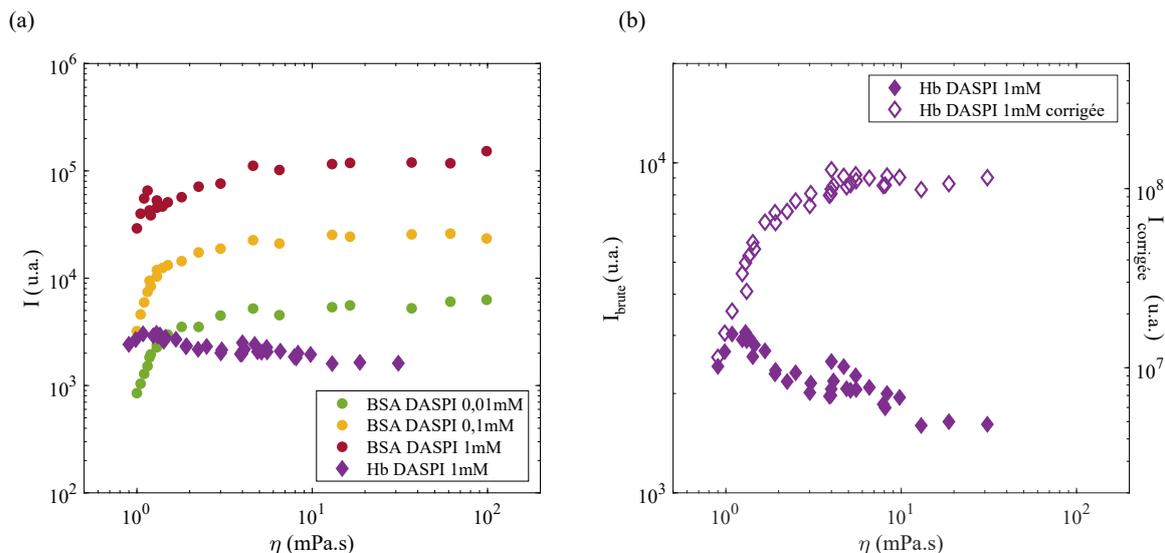


FIGURE 4.7 – **Variation de viscosité par concentration.** (a) Courbe intensité - viscosité du rotor moléculaire DASPI dans la BSA et l'Hb, en géométrie standard, à la température $T = 25^\circ\text{C}$. (b) Courbe intensité - viscosité du rotor moléculaire DASPI à concentration de 1 mM dans des solutions d'Hb. Les données brutes sont représentées par les symboles pleins et les données corrigées de l'effet d'absorbance par les symboles vides. Les marges d'erreur sont de l'ordre de grandeur de la taille des symboles : 5% pour les mesures de viscosité et 7% pour les mesures d'intensité. Résultats publiés dans [121].

réponse du rotor présente un plateau, ce qui suggère un manque de sensibilité à la viscosité dans ce second régime.

Il est clair que dans ces solutions de protéines, le DASPI ne suit pas la relation de Förster-Hoffmann comme classiquement observé dans les fluides simples. Nous nous demandons si cette réponse particulière peut être la conséquence d'interactions spécifiques entre le DASPI et la protéine, des liaisons rotor-protéines ou localisation ciblée par exemple. Sur les trois courbes obtenues dans la BSA en Figure 4.7, nous notons que, quel que soit la concentration en DASPI en solution, le seuil entre les deux régimes observés est le même, il se situe autour de $\eta = 1,7\text{ mPa.s}$. Dans l'hypothèse d'une liaison rotor-protéine, un déplacement du seuil vers des concentrations et donc viscosités plus faibles serait attendu pour des concentrations en rotor plus importantes. Cette hypothèse est alors rejetée, et la réponse du rotor reste à être interprétée au regard de son environnement.

Réponses des deux sondes avec la concentration

Dans le paragraphe précédent, l'intensité de fluorescence (réponse du DASPI) est représentée en fonction de la viscosité (réponse des sondes de microrhéologie). Ici, nous séparons les réponses des deux sondes et les présentons en Figure 4.9 en fonction du paramètre de contrôle caractérisant la solution étudiée : la concentration en protéines. Chaque sonde interagit avec le milieu environnant à son échelle : nanométrique pour le rotor et micrométrique pour la bille.

Réponse des billes Nous décrivons tout d'abord la réponse des billes c'est à dire les courbes viscosité-concentration (courbes bleues en Figure 4.9). La viscosité des solutions de BSA et d'hémoglobine augmente lentement à faible concentration, puis de manière drastique à haute concentration, ce qui rappelle la signature caractéristique des suspensions de colloïdes de sphères dures [122-124]. Le modèle de sphère dures a été largement utilisé pour décrire la rhéologie des protéines globulaires [115, 118, 119, 125-128]. La comparaison entre protéines et sphères dures est

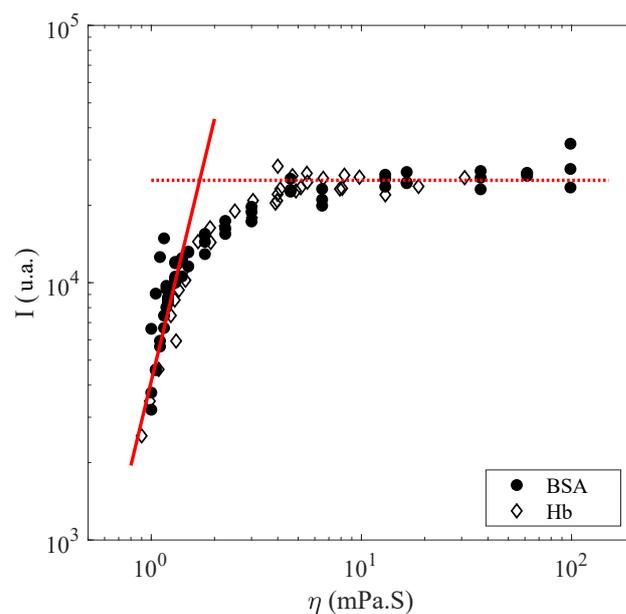


FIGURE 4.8 – **Courbe maîtresse dans des solutions de BSA et d'Hb.** Le signal du rotor dans les solutions d'Hb est celui corrigé de l'absorbance. Les données de la BSA sont celles issues des trois courbes présentées en Figure 4.7. Deux régimes sont visibles : à faible viscosité, le signal du rotor augmente fortement avec la viscosité, tandis qu'à haute viscosité, le signal du rotor sature et atteint un plateau. Le premier régime est ajusté par une loi de puissance $\log(I) = C + x \cdot \log(\eta)$ avec $C = 4,1 \cdot 10^3$ et $x = 3,4$ (ligne continue rouge) et le second par une valeur constante $I = 2,5 \cdot 10^4$ u.a. (ligne pointillée rouge). Les mesures sont faites à température $T = 25^\circ\text{C}$. Résultats publiés dans [121].

discutable à haute concentration de par la structure 3D des protéines, leur polydispersité, et leurs interactions [129, 130]. À faible concentration cependant, où seules les interactions entre deux particules peuvent être prises en compte, le rayon de la protéine globulaire peut être estimé avec le modèle d'Einstein-Batchelor [131] (détails au Chapitre 10). Ainsi, aux faibles concentrations, que l'on choisira inférieure à 12g/dL, les rayons des protéines BSA et Hb sont estimés à $3,3 \pm 0,2\text{nm}$ et $3,6 \pm 0,2\text{nm}$ respectivement, en accord avec la littérature [119, 132-135]. Nous vérifions a posteriori (en assimilant la protéine à une sphère de rayon trouvé expérimentalement) que la concentration limite choisie 12g/dL, correspond à des fractions volumiques, $\Phi \sim 16\%$ dans la BSA et $\Phi \sim 22\%$ dans l'Hb, cohérentes avec la frontière entre les régimes semi-dilué et concentré des sphères dures. Avec la réponse des billes, nous pouvons donc estimer le rayon de chaque protéine globulaire et l'étendue du régime semi-dilué.

Réponse du DASPI Nous analysons maintenant la réponse du rotor avec la concentration en protéines (courbes rouges en Figure 4.9). L'intensité de fluorescence augmente avec la concentration en protéines et deux régimes peuvent être distingués. Nous ajustons une loi de puissance à chacun et obtenons un exposant plus élevé à faible concentration (1,1 dans la BSA et 0,8 dans l'Hb) qu'à haute concentration (0,6 dans la BSA et l'Hb). L'intersection entre les deux régimes est observée pour $c_{\text{BSA}} = 10,4\text{g/dL}$ ($\Phi \sim 14\%$) dans la BSA et $c_{\text{Hb}} = 11\text{g/dL}$ ($\Phi \sim 20\%$) dans l'Hb. Ces concentrations qui délimitent les deux régimes sont proches de celles fixant la limite du régime semi-dilué en microrhéologie (12g/dL). Ceci met en évidence une diminution de la sensibilité du rotor au-delà du régime semi-dilué et montre que le rotor est impacté par son environnement en protéines, via la concentration, avec une baisse de sensibilité à haute concentration.

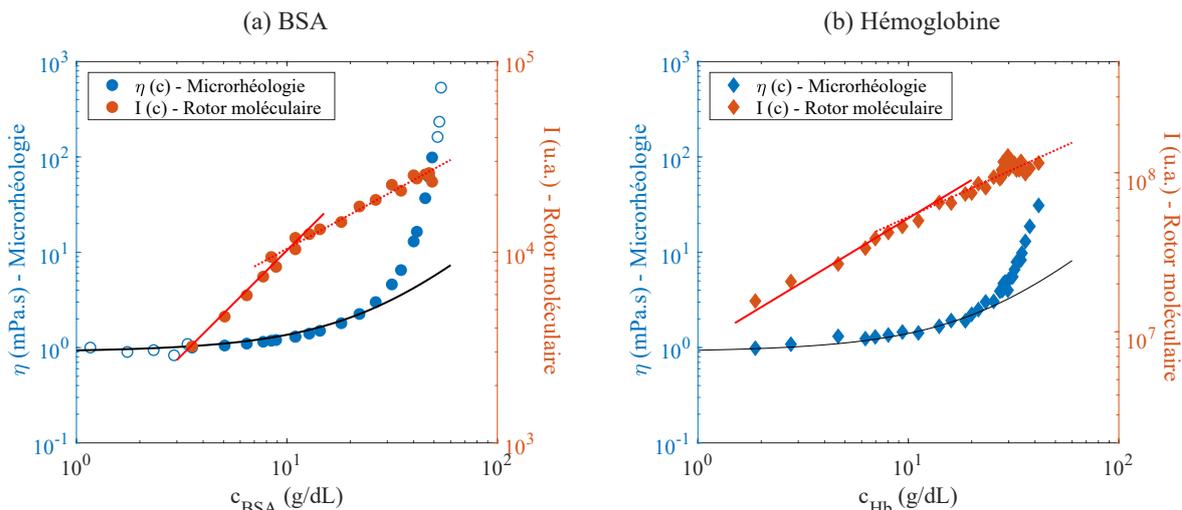


FIGURE 4.9 – Réponse des deux sondes en fonction de la concentration protéinaire. Viscosité mesurée par microrhéologie et intensité de fluorescence du DASPI dans des solutions de concentration croissante de (a) BSA et (b) d’Hb. La température est fixée à $T = 25^{\circ}\text{C}$. Dans les solutions d’Hb, l’intensité émise par le rotor est celle corrigée de l’absorbance. Des marqueurs vides sont utilisés pour les solutions de BSA où seule la viscosité a été mesurée. La concentration de DASPI est fixée à 0,1 mM dans la BSA et à 1 mM dans l’Hb. Les courbes noires sur les courbes de viscosité correspondent au modèle d’Einstein-Batchelor décrivant le régime semi-dilué de suspensions de sphères dures. Les lignes rouges correspondent à l’ajustement de la réponse du rotor par une loi de puissance dans les deux régimes identifiables : à faible concentration (exposant 1,1 dans BSA et 0,8 dans Hb) et à concentration élevée (exposant 0,6 dans BSA et Hb). Résultats publiés dans [121].

Conclusion Après analyse des réponses des deux sondes, il est raisonnable de supposer que chaque sonde détecte la limite entre les régimes semi-dilué et concentré à son échelle, nanométrique pour le rotor et micrométrique pour les billes, ce qui justifie que cette limite ne soit pas exactement détectée à la même concentration par les deux sondes. Le DASPI se montre sensible à l’environnement protéinaire, via la concentration, et montre une baisse de sensibilité dans le régime concentré par rapport au régime semi-dilué.

4.4.2 Contrôle de viscosité par température

Précédemment, nous avons fait varier la viscosité des solutions de protéines avec la concentration. Ici, nous faisons varier la température - 18°C , 25°C , 30°C , 37°C et 43°C - à concentration fixée, ce qui induit une variation de la viscosité allant jusqu’à 30%. Nous étudions alors la réponse du rotor.

La Figure 4.10-(a, b) présente les courbes intensité-viscosité obtenues par variation de température, pour plusieurs solutions dont la concentration a été fixée. Sur une courbe à concentration fixée, nous observons que le signal de fluorescence du rotor augmente avec la viscosité, qui est contrôlée par la température. Ces courbes redessinent, par leur agencement, la dépendance en concentration observée en Figure 4.8. De plus, on remarque que ces courbes présentent une pente similaire et ne forment pas une unique courbe maîtresse.

Nous ramenons donc à la même origine les courbes intensité-viscosité mesurées (Figure 4.10-(c, d)) et ajustons toutes les données par une loi de puissance de Förster-Hoffmann, $I/I_{43^{\circ}\text{C}} = C (\eta/\eta_{43^{\circ}\text{C}})^x$. Les exposants trouvés sont $x = 0,7 \pm 0,2$ dans la BSA et $x = 0,9 \pm 0,2$ dans l’Hb. Ils sont proches de ceux prédits pour les fluides simples, $x = 0,7$. Avec les valeurs déterminées et fixées de x , nous trouvons que le paramètre C est dépendant de la concentration en protéines et diminue fortement à haute concentration (voir les inserts). Ces résultats montrent également que pour une valeur de viscosité fixée, il peut y avoir différentes intensités de rotor, ce qui indique que la

viscosité n'est pas le paramètre pertinent pour décrire la réponse du rotor dans les solutions de protéines. La concentration de la solution détermine ainsi la réponse du rotor via le paramètre C d'une relation de Förster-Hoffmann.

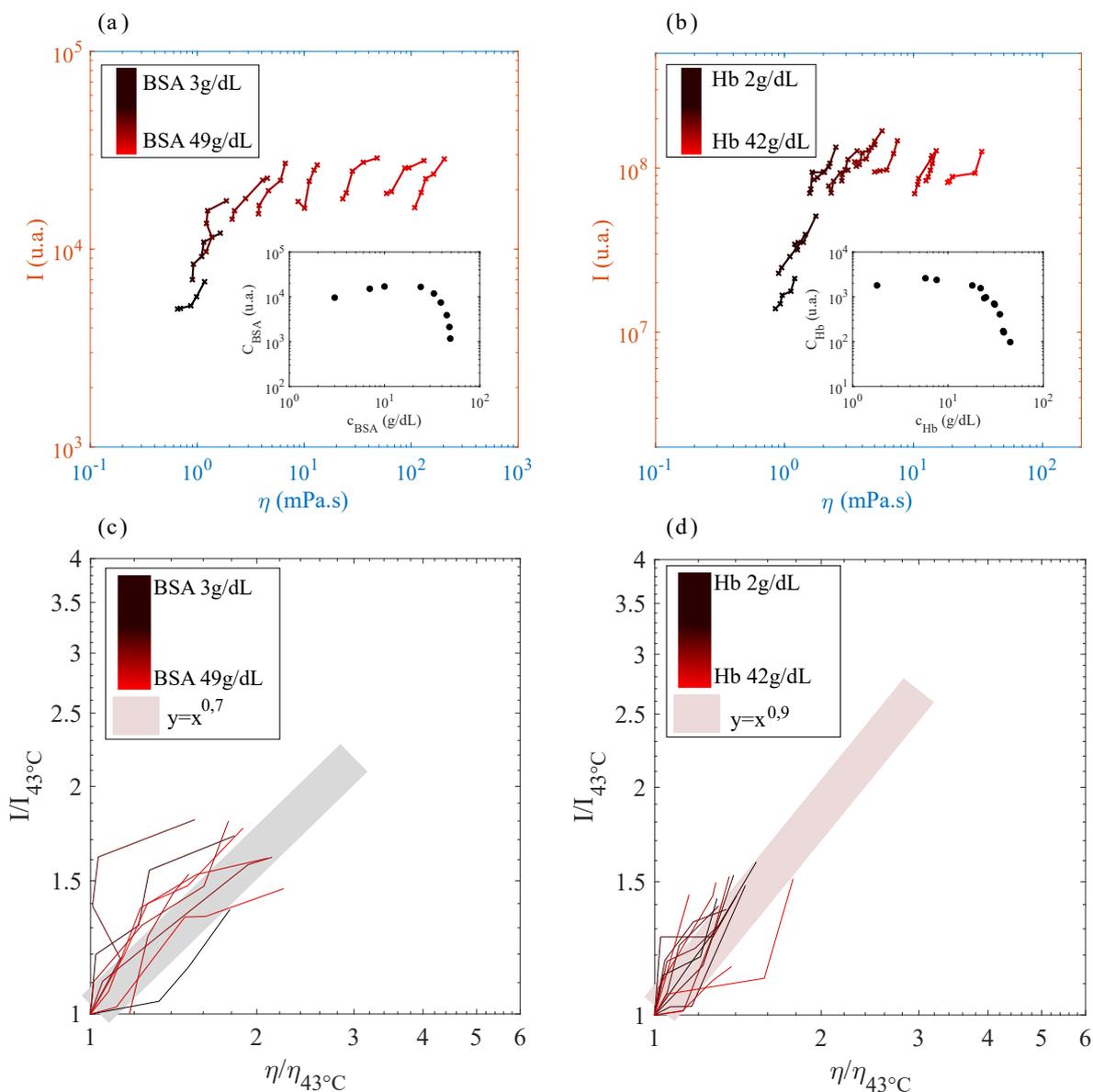
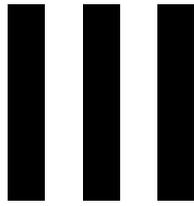


FIGURE 4.10 – **Variation de viscosité par température.** Courbes intensité - viscosité obtenues par variation de température dans la BSA (a) et l'Hb (b). Le signal de fluorescence du rotor est mesuré à différentes concentrations de protéines. Pour chaque concentration, la variation de température induit une variation de viscosité. Les intensités dans l'Hb sont celles corrigées de l'effet d'absorbance. Les courbes intensité-viscosité sont tracées à la même origine et ajustées avec des lois de puissance de Förster-Hoffmann d'exposant $0,7 \pm 0,2$ dans la BSA (c) et $0,9 \pm 0,2$ dans l'Hb (d). Les marges d'erreur sont de 5% pour les mesures de viscosité et de 7% pour les mesures d'intensité mais ne sont pas indiquées ici pour faciliter la lecture. Résultats publiés dans [121].

4.4.3 Conclusion

Le DASPI ne répond pas de la même façon dans les fluides simples et dans les solutions de protéines. Dans les fluides simples, varier la viscosité par concentration ou température mène à la même réponse : une relation intensité-viscosité de Förster-Hoffmann avec un paramètre C indépendant de la température et de la concentration. Dans les solutions de protéines, quand la viscosité est variée par concentration, la relation de Förster-Hoffmann n'est pas retrouvée. Quand la viscosité est variée par température, une relation de Förster-Hoffmann est retrouvée avec un paramètre C dépendant de la concentration en protéines. Plus important encore, la même intensité peut être mesurée pour des solutions de viscosités différentes, ce qui démontre que la viscosité n'est pas le paramètre pertinent pour décrire la réponse du rotor dans les solutions de protéines.

Le rotor moléculaire répond à son environnement via la concentration en protéines, comme le montre la Figure 4.9, avec une sensibilité plus importante dans le régime semi-dilué que dans le régime concentré. Ceci doit être pris en compte lors de l'utilisation de rotors dans les milieux biologiques, et on comprend aujourd'hui pourquoi la plupart des études utilisant des rotors moléculaires en milieu biologique sont largement qualitatives et non quantitatives. Notre travail fournit une première étude quantitative de la réponse d'un rotor moléculaire en milieu biologique, et si la littérature s'accorde pour dire que le rotor est sensible à la micro-viscosité, nous suggérons qu'il s'agit d'une sensibilité à son micro-environnement. Des recherches supplémentaires seraient bienvenues pour comprendre le mécanisme d'interaction rotor-protéine.



ROTORS MOLÉCULAIRES DANS LES
GLOBULES ROUGES

5

INCUBATION DES GLOBULES ET SIGNAL DU DASPI

Nous nous intéressons ici au système globule rouge - rotor moléculaire. Nous étudions le processus de pénétration du DASPI dans les globules rouges et apportons une description générale du signal cellulaire mesuré en microscopie de fluorescence.

5.1	Le DASPI dans les globules rouges	65
5.1.1	Pénétration du DASPI	65
5.1.2	Incubation des GRs	66
5.1.3	Concentration intracellulaire en DASPI	69
5.2	Comprendre et interpréter le signal du DASPI	71
5.2.1	Contributions des membranes et du cytosol	72
5.2.2	Paramètres géométriques de la détection : quel effet sur le signal?	78

5.1 Le DASPI dans les globules rouges

Dans cette partie, nous montrons que le DASPI pénètre spontanément dans les globules rouges sains (section 5.1.1) et étudions sa dynamique de pénétration dans les GRs (section 5.1.2). Nous analysons plusieurs hypothèses liées au processus de pénétration du DASPI pour conclure quant à sa concentration intracellulaire dans les globules (section 5.1.3).

5.1.1 Pénétration du DASPI

Nous incubons des globules rouges sains (hématocrite 0,5%) dans une solution de DASPI à 1mM pendant 2h. Nous plaçons la solution dans un microcanal et l'observons au microscope confocal. L'utilisation d'un microcanal permet d'assurer la lente sédimentation des globules et de les imager dans différentes orientations. Cette expérience a été réalisée au Laboratoire LIPhy sur un microscope Leica TCS SP8 avec Thomas Podgorski.

Trois globules présentant des orientations différentes sont sélectionnés et des z -stacks enregistrés. La couche optique est $\Delta_{\text{opt}} = 0,6 \mu\text{m}$ et la distance entre deux images $\delta z = 0,5 \mu\text{m}$. Des images issues de différents plans focaux sont présentées en Figure 5.1 pour les trois globules. Sur chaque image, les globules sont fluorescents et le signal des membranes est légèrement plus intense que celui de l'intérieur. La réponse du DASPI respectivement avec les membranes et le cytosol sera étudiée en section 5.2.1. La solution suspendante de PBS contient également du DASPI mais sa fluorescence est plus faible que celle des GRs, d'où le rendu à l'image.

L'observation des différentes couches optiques permet d'affirmer que le DASPI a pénétré à l'intérieur du globule. En effet, les couches situées au milieu du z -stack, par exemple $z = 6 \mu\text{m}$

sur la Figure 5.1, sont issues du milieu du globule et le signal, excepté les contours de la cellule, provient exclusivement du cytosol. La fluorescence du cytosol est spatialement homogène à l'exception de quelques spots lumineux observés (voir Chapitre 9), ce qui suggère que le DASPI est uniformément distribué dans le volume des GRs. Pour les trois globules, nous mesurons l'intensité moyenne sur les surfaces représentées sur les images en champ clair, et pour toutes les images du z -stack. Nous obtenons ainsi des profils d'intensité selon z . Sur ces profils, nous retrouvons les paramètres géométriques typiques d'un globule rouge : diamètre 8 μm , épaisseur au bord 3 μm et épaisseur de la zone biconcave 1 μm .

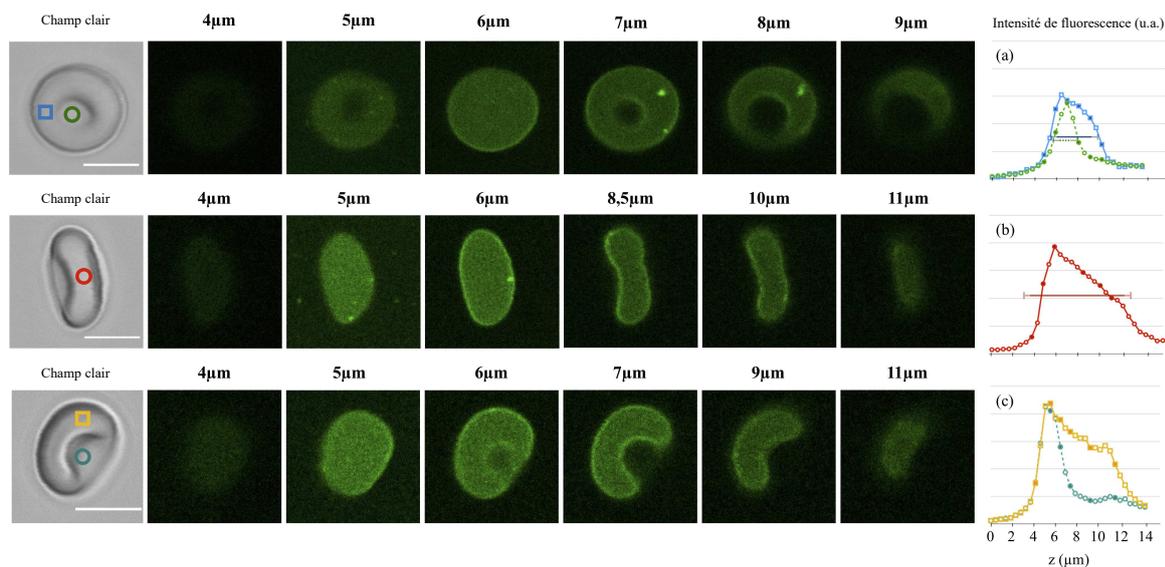


FIGURE 5.1 – **Pénétration du DASPI dans les GRs.** Trois globules dans une solution de DASPI sont imaged en microscopie confocale. Nous présentons des images en champ clair et des images en fluorescence issue d'un z -stack. Échelle : 5 μm . À droite, les profils d'intensité de fluorescence selon z sont obtenus en moyennant l'intensité de fluorescence pour chaque position z sur les surfaces aux contours colorés. Les lignes horizontales sur les profils correspondent aux tailles typiques d'un globule. Une incertitude de 0,6 μm (épaisseur de la couche optique) est ajoutée de chaque côté. Résultats publiés dans [110].

Conclusion Cette expérience montre que le DASPI pénètre spontanément et de manière homogène dans les globules rouges lorsque ces derniers sont incubés en solution. Dans la suite, nous étudions l'effet du temps d'incubation sur la pénétration du DASPI.

5.1.2 Incubation des GRs

Nous étudions en microscopie confocale (Microscope Zeiss LSM 780) la dynamique de pénétration du DASPI dans les globules. Un échantillon de globules rouges (hématocrite 0,25%) est placé dans une solution de DASPI à 1mM au temps $t_0 = 0\text{h}$. À partir de ce moment, nous imageons en microscopie confocale l'échantillon toutes les demi-heures jusqu'au temps final $t_f = 4,5\text{h}$. Nous utilisons des lames et lamelles de verre différentes toutes les trente minutes pour éviter le vieillissement des GRs dû aux interactions cellule-verre. Pour chaque intervalle de temps, environ 20 globules sont sélectionnés et des z -stacks enregistrés avec les paramètres $\Delta_{\text{opt}} = 0,7\text{ }\mu\text{m}$ et $\delta z = 0,1\text{ }\mu\text{m}$.

Étude des z -stacks Pour chaque globule et chaque position z , nous mesurons l'intensité moyenne sur un disque qui exclue les contours du globule et obtenons des profils selon z , comme illustré

sur la Figure 5.2. Le profil type présente un maximum correspondant à une couche optique positionnée au centre du GR, en $z = z_0$. En dehors de ce maximum, la couche optique comprend une partie correspondant au globule (cytosol et membrane de faible épaisseur) et une autre au milieu suspendant, conduisant à une intensité moins élevée. Tous les profils étudiés sont présentés en Figure 5.2 en fonction du temps d'incubation. En s'intéressant à un seul intervalle de temps, on constate que les profils d'intensité des différents globules sont comparables. La pénétration du DASPI est ainsi homogène dans l'échantillon. L'intensité maximale des profils augmente jusqu'à $t = 3$ h suggérant une augmentation de la concentration en DASPI à l'intérieur des globules, puis se stabilise.

Cette analyse fournit une première estimation du temps d'incubation nécessaire à la pénétration du DASPI dans les GRs, qui est de 3 h. Cependant est-il possible que le DASPI présente un processus de pénétration en deux étapes où les membranes capteraient d'abord le DASPI en h_1 heures avant qu'il ne pénètre dans le cytosol en $h_2 > h_1$ heures? Pour répondre à cette question, nous nous intéressons à des profils d'intensité selon x et étudions le signal issu du cytosol et des membranes.

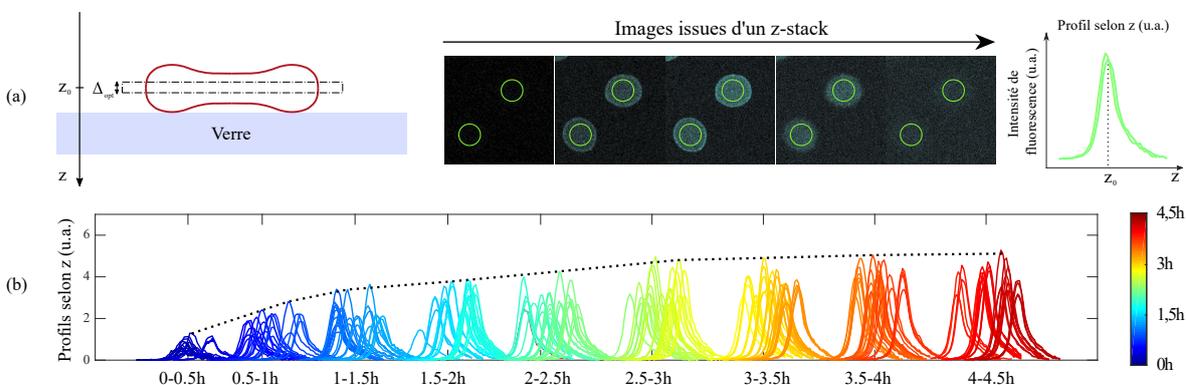


FIGURE 5.2 – **Dynamique d'incubation, étude des z-stack.** (a) De gauche à droite : Schéma d'un globule rouge sur une lame de verre et d'une couche optique d'épaisseur Δ_{opt} positionnée en z_0 . Images issues d'un z-stack et contours des surfaces sur lesquels l'intensité des GRs est moyennée. Profil d'intensité selon z obtenu avec les intensités moyennes mesurées à chaque position z . (b) Profils d'intensité selon z en fonction du temps d'incubation. Chaque demi-heure, environ 20 globules sont imagés et les profils d'intensité sont représentés. La ligne pointillée montre l'augmentation puis la stabilisation des intensités maximales des profils avec le temps.

Étude des profils selon x Pour chaque GR étudié au cours du processus d'incubation, nous sélectionnons sur le z-stack l'image située au centre du globule ($z = z_0$) et traçons un profil selon x comme illustré en Figure 5.3-(a). L'intensité est moyennée sur un rectangle traversant la cellule. Nous choisissons de mesurer l'intensité sur un rectangle plutôt que sur une ligne pour obtenir un signal moins bruité. Sur un profil selon x , nous observons un plateau qui correspond à la contribution du cytosol, et des pics sur les côtés qui comprennent en plus du cytosol une contribution des membranes. L'intensité des pics M_c est plus importante que celle du plateau P_c , ce qui suggère une réponse membrane-DASPI plus forte que celle cytosol-DASPI (détails en section 5.2.1). Sur ces profils, nous mesurons M_c et P_c et les traçons en fonction du temps d'incubation en Figure 5.3-(b,c).

A l'aide du modèle géométrique qui sera présenté en section 5.2.1, nous estimons les intensités volumiques du cytosol Φ_i et de la membrane Φ_m et les traçons en fonction du temps d'incubation en Figure 5.3-(d,e). On voit que M_c , P_c , Φ_i et Φ_m augmentent fortement pendant les deux premières heures puis se stabilisent simultanément. Il n'y a donc pas d'argument en faveur d'un processus d'incubation en deux étapes où le DASPI se localiserait d'abord sur les membranes avant

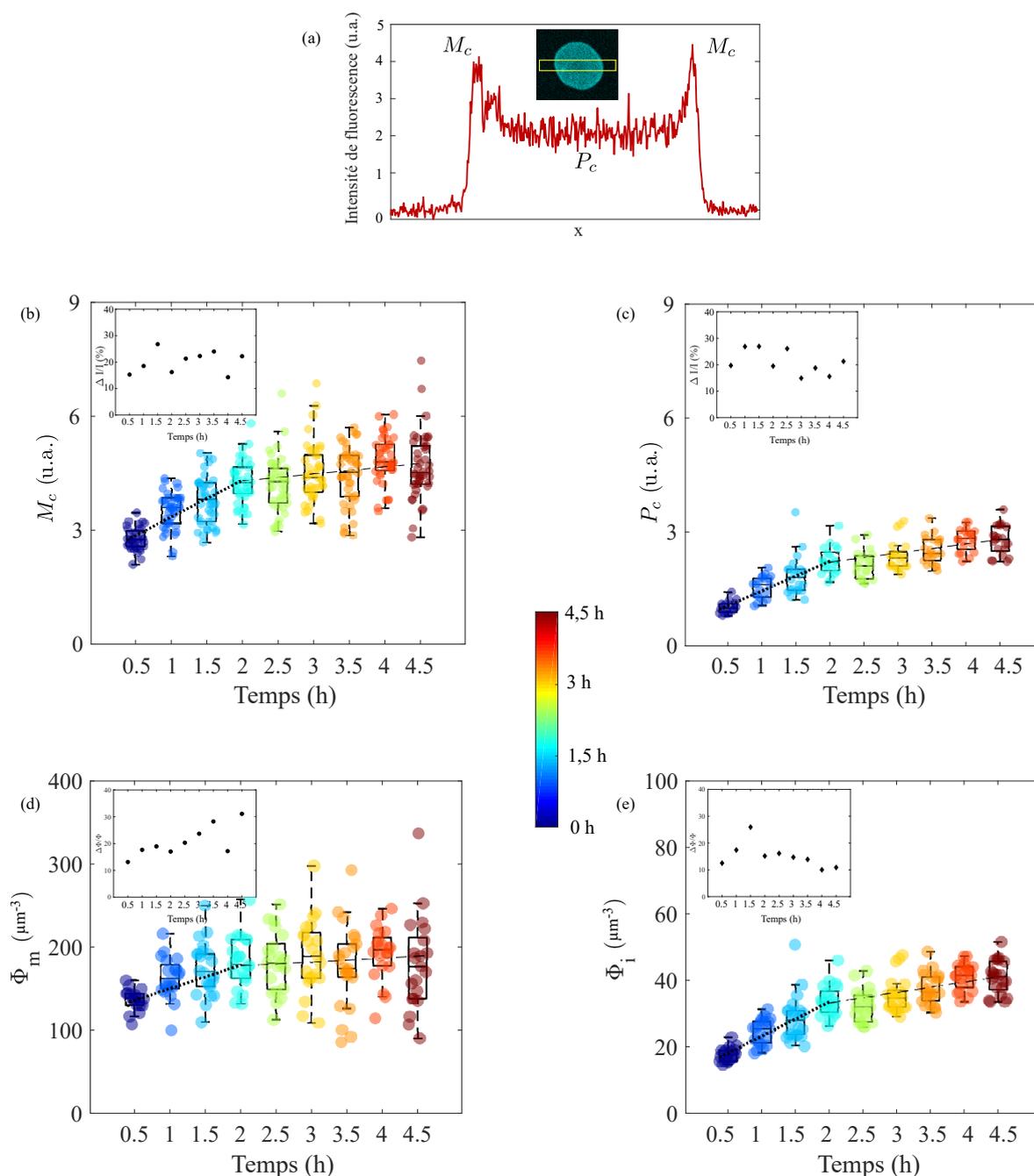


FIGURE 5.3 – **Dynamique d'incubation, étude des profils selon x .** (a) Profil d'intensité selon x et définitions de M_c et P_c . (b,c) Valeurs de M_c et P_c avec le temps d'incubation pour ~ 20 globules par intervalle de temps. Les hétérogénéités $\Delta I/I$ des distributions d'intensités sont présentées en insert. (d,f) Fluorescences volumiques de membrane Φ_m et du cytosol Φ_i avec le temps d'incubation pour ~ 20 globules par intervalle de temps. Les hétérogénéités $\Delta\Phi/\Phi$ sont présentées en insert.

de pénétrer dans le globule. L'augmentation de l'intensité volumique Φ_i du cytosol avec le temps d'incubation suggère de nouveau une augmentation de la concentration intracellulaire en DASPI au cours du temps.

Pour chaque nuage de points, nous ajustons aux données un fit gaussien et définissons l'hétérogénéité $\Delta I/I$ ou $\Delta\Phi/\Phi$ comme le rapport entre la déviation standard et la moyenne de la distribution. Ces données sont présentées en insert de chaque sous-figure. On voit que quel que soit le

paramètre considéré, M_c , P_c , Φ_i , ou Φ_m , l'hétérogénéité reste stable dans le temps. Nous montrons au Chapitre 7 que pour un échantillon donné, $\Delta I/I$ reflète l'hétérogénéité des propriétés des GRs intrinsèque à l'échantillon. Ici, au cours du processus d'incubation, il est donc logique que les hétérogénéités restent constantes dans le temps : la concentration intracellulaire en DASPI augmente mais les propriétés des GRs restent les mêmes.

Conclusion Cette section nous apprend que le processus de pénétration du DASPI dans les GRs est homogène dans l'échantillon et se déroule principalement pendant les deux premières heures après l'introduction du DASPI dans la solution. Pour des considérations de répétabilité, nous décidons d'incuber tous les échantillons de globules que nous étudions pendant 3,5 heures.

5.1.3 Concentration intracellulaire en DASPI

Nous souhaitons maintenant estimer la concentration intracellulaire en DASPI dans les globules après 3,5h d'incubation. Celle-ci dépend du processus de pénétration du rotor et deux hypothèses sont envisageables :

- Hypothèse 1 : le DASPI pénètre dans les globules en raison d'une plus grande affinité pour les protéines cellulaires que pour le milieu suspendant.
- Hypothèse 2 : le DASPI pénètre dans les globules sans affinité particulière pour les protéines cellulaires mais par un processus semblable à de la diffusion ou de l'osmose, qui équilibre les concentrations dans la cellule et à l'extérieur.

Deux expériences spécifiques permettent d'apporter des éléments de réponse. La première consiste à étudier la fluorescence d'échantillons de globules à différentes hématocrites (différents nombres de cellules) dans une solution de DASPI de concentration fixée. La deuxième consiste à laver les globules – préalablement incubés pendant 3,5h – pour retirer le DASPI de la solution suspendante et étudier la fluorescence de l'échantillon au cours du temps après le lavage. Nous nous attendons aux comportements suivants selon l'hypothèse choisie :

- Hypothèse 1 : le DASPI pénètre dans les GRs par plus grande affinité avec les protéines cellulaires qu'avec le milieu suspendant. Alors pour n moles de DASPI dans un volume V de solution (concentration c), le nombre de moles de DASPI dans un globule n_{intra} diminue selon $\frac{n}{N_{\text{RBC}}}$, avec N_{RBC} le nombre de globules en solution. Alors, l'intensité de fluorescence d'une cellule I_{GR} , qui est proportionnelle à la concentration intracellulaire de DASPI, $c_{\text{intra}} = \frac{n_{\text{intra}}}{V_{\text{GR}}}$, diminue avec l'hématocrite Ht :

$$I_{\text{GR}} \propto \frac{n_{\text{intra}}}{V_{\text{GR}}} \propto \frac{n}{N_{\text{GR}}V_{\text{GR}}}; \quad \frac{n}{N_{\text{GR}}V_{\text{GR}}} = \frac{n}{V} \cdot \frac{V}{N_{\text{GR}}V_{\text{GR}}} = \frac{c}{Ht} \quad (5.1)$$

$$I_{\text{GR}} \propto \frac{c}{Ht} \quad (5.2)$$

Dans cette hypothèse, après le lavage des GRs, le DASPI reste dans les GRs en raison de son affinité avec les protéines cellulaires, et la fluorescence reste stable dans le temps.

- Hypothèse 2 : le DASPI pénètre dans les cellules sans affinité particulière avec les protéines cellulaires, par un processus de type diffusion ou osmose. Il existe alors un équilibre de concentration entre l'intérieur des globules et le milieu suspendant extérieur. Pour une concentration fixée de DASPI en solution, l'hématocrite n'influe donc pas sur la concentration intracellulaire dans les globules c_{intra} ni sur l'intensité de fluorescence des GRs. Après lavage des GRs dans cette hypothèse, le DASPI ressort en partie des globules afin d'atteindre un nouvel équilibre de concentration interne et externe.

Nous présentons maintenant les résultats obtenus dans les deux expériences spécifiques.

Expérience 1 : varier l'hématocrite

Dans cette expérience, la concentration en DASPI est fixée à $c = 1\text{mM}$ et l'hématocrite de référence à 0,25%. Des échantillons à hématocrite variant jusqu'à $\pm 40\%$ par rapport à la valeur de référence sont imagés après 3,5 heures d'incubation dans le DASPI, en microscopie de fluorescence. On voit sur la Figure 5.4 que la densité de GRs à l'image varie beaucoup dans cette gamme. La figure montre également les distributions d'intensité de fluorescence obtenues et la tendance attendue dans l'hypothèse d'une plus grande affinité pour les protéines cellulaires (Hypothèse 1, équation 5.2).

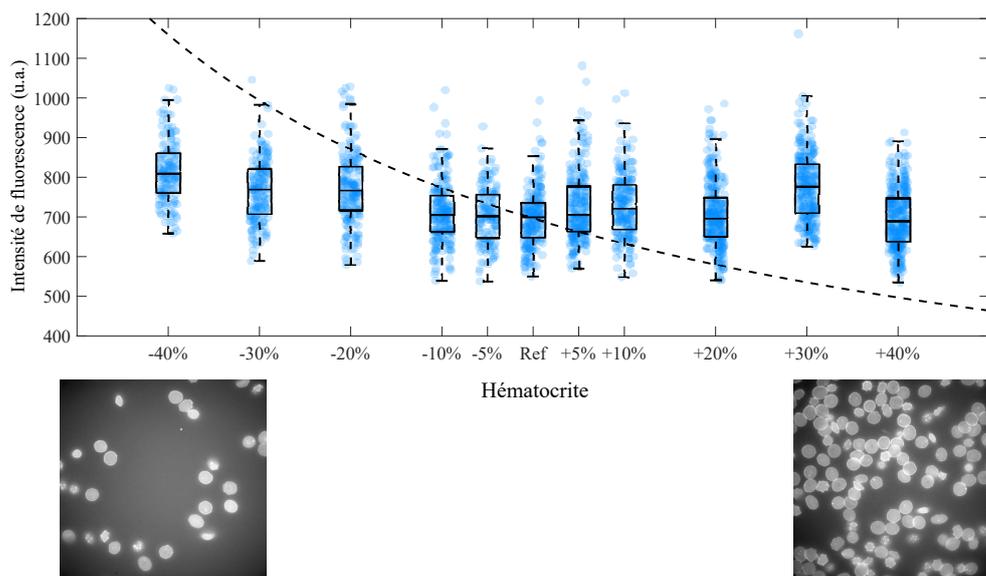


FIGURE 5.4 – **Expérience 1 : varier l'hématocrite.** Distributions d'intensité de fluorescence d'un échantillon de GRs incubé dans du DASPI, avec des hématocrites variables. L'hématocrite de référence est fixée à 0,25% et est variée jusqu'à $\pm 40\%$ par rapport à cette valeur. Les distributions sont issues des mesures sur 150 à 350 GRs. Des images des solutions aux plus basses et hautes hématocrites montrent la différence de densité de GRs dans l'échantillon. La ligne pointillée représente l'allure attendue pour l'intensité en fonction de l'hématocrite dans l'hypothèse d'une affinité plus importante du DASPI pour les protéines cellulaires que pour le milieu suspendant (équation 5.2).

Nous n'observons pas de variation significative de l'intensité de fluorescence avec l'hématocrite, surtout dans l'intervalle $\pm 10\%$, et aucune tendance telle que l'équation 5.2. Ces résultats sont donc en faveur de l'hypothèse 2 où un manque d'affinité spécifique entre le DASPI et les protéines cellulaires n'entraîne pas de variation d'intensité avec l'hématocrite.

Expérience 2 : laver les globules

Dans cette expérience, des GRs à hématocrite 0,25% sont incubés dans une solution de DASPI à 1mM pendant 3,5h. Suite à cette incubation, les globules sont lavés 3 fois avec du PBS et observés en microscopie de fluorescence pendant 4,5h, puis après 24h. Le temps $t = 0\text{h}$ correspond ici au moment qui suit le lavage. Les distributions d'intensité de l'échantillon obtenues chaque demi-heure jusqu'à $t = 4,5\text{h}$ sont présentées en Figure 5.5, ainsi que celle obtenue après 24h. Comme en section 5.1.2, nous utilisons des lames et lamelles de verre différentes chaque demi-heure pour éviter le vieillissement des GRs dû aux interactions cellule-verre.

L'intensité de fluorescence des globules diminue pendant les 4,5 premières heures. Après 24h, les globules sont indiscernables du fond. Ces observations suggèrent que le DASPI est sorti des

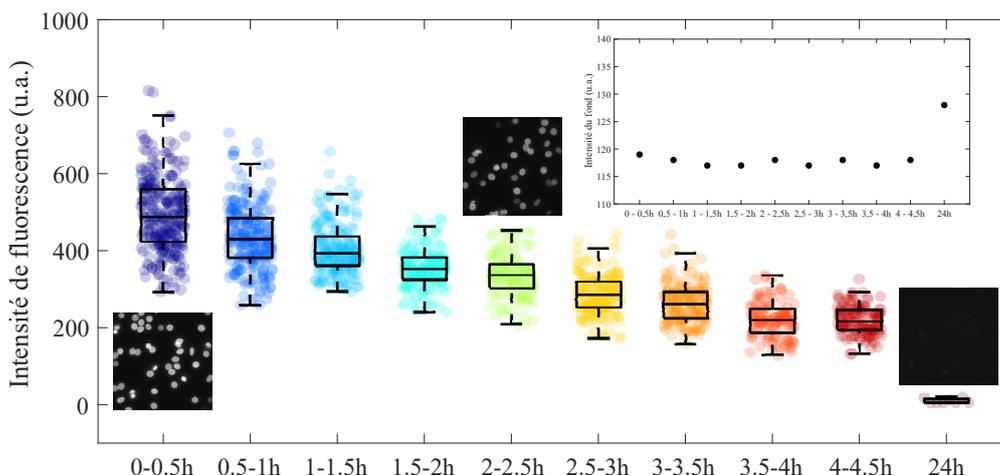


FIGURE 5.5 – **Expérience 2 : laver les globules.** Distributions d’intensité de fluorescence d’un échantillon de GRs lavés après 3,5 h d’incubation dans du DASPI. Les distributions sont mesurées toutes les demi-heures et sont issues des mesures sur 150 à 350 GRs. Des images fluorescentes à $t = 0$ h, 2 h, et 24 h sont présentées. En insert, on trace le signal de fluorescence du fond en fonction du temps.

GRs et est en faveur de l’hypothèse 2 d’équilibre de concentration interne et externe. Dans cette hypothèse, on s’attend à ce que l’intensité du fond augmente avec le temps. C’est en effet ce qui est observé après 24 h avec une augmentation de 10% (voir insert). Pendant les 4,5 premières heures cependant, l’intensité du fond reste stable, de l’ordre de 100 u.a., valeur qui correspond à la limite de détection de la caméra. Nous proposons une interprétation pour cette observation. À $t = 0$ h, dans l’hypothèse d’équilibre de concentration interne-externe, la concentration en DASPI dans le solvant est nulle et celle dans les globules est de $c_{\text{intra}} = c = 1$ mM. Après 24 h, le nouvel équilibre est atteint et la concentration en DASPI dans le solvant et dans les globules est de $c_{\text{eq}} = c \cdot Ht = 0,0025$ mM. Dans cette hypothèse, la concentration dans le solvant varie donc peu (0 mM \rightarrow $0,0025$ mM), ce qui ne permettrait pas d’augmenter suffisamment le signal et de dépasser le seuil de détection de la caméra sur les 4,5 premières heures. Pour les globules au contraire, la concentration intracellulaire varie beaucoup (1 mM \rightarrow $0,0025$ mM), ce qui expliquerait les variations d’intensités observées sur les 4,5 premières heures et au-delà.

Dans l’hypothèse 1, le signal des GRs devrait rester stable dans le temps malgré le lavage. Les résultats obtenus dans cette expérience sont donc encore une fois en accord avec l’hypothèse 2, d’équilibre des concentrations interne-externe.

Conclusion Cette section s’intéresse au processus de pénétration du rotor dans les globules. Avec deux expériences spécifiques, nous suggérons que la concentration interne en DASPI est équilibrée, après 3h30 d’incubation, avec celle du milieu suspendant. Même si l’hématocrite ne semble pas jouer sur le signal des GRs, nous la choisissons constante dans toutes nos expériences, et égale à 0,25%.

5.2 Comprendre et interpréter le signal du DASPI

Dans la partie précédente, nous avons utilisé deux techniques d’imagerie de GRs : la microscopie confocale et la microscopie de fluorescence. Pour analyser un échantillon rapidement la microscopie de fluorescence est plus pertinente : il faut environ 20 mn pour imager 400 globules et avec notre macro ImageJ, l’analyse est rapide. La microscopie confocale elle, permet une analyse plus

précise mais est plus longue : il faut environ 1mn par z -stack pour chaque globule, soit 6 h30 pour 400 globules.

La Figure 5.6 présente pour trois donneurs sains, les distributions d'intensité et d'aire des GRs imagés en microscopie de fluorescence dans les conditions d'observation définies précédemment (DASPI 1 mM, incubation 3 h30, hémocrite 0,25%). Seuls les GRs discocytaires sont analysés et il est intéressant de noter que les trois distributions d'aires sont semblables, en accord avec la géométrie connue et stable du GR. En revanche, les trois distributions d'intensité, et en particulier leurs intensités moyennes, sont distinctes. Nous nous interrogeons sur l'origine de cette variabilité et sur les paramètres contrôlant ce signal. Peut-on attribuer ces variations à la réponse du rotor moléculaire à son environnement, notamment à la rigidité des cellules? Nous nous attarderons à répondre à cette question dans le Chapitre 6. Ici, nous proposons dans un premier temps d'apporter une compréhension générale du signal mesuré sur un GR en microscopie de fluorescence en quantifiant les contributions du cytosol et des membranes (section 5.2.1) et en étudiant l'effet des paramètres géométriques du globule sur le signal (section 5.2.2).

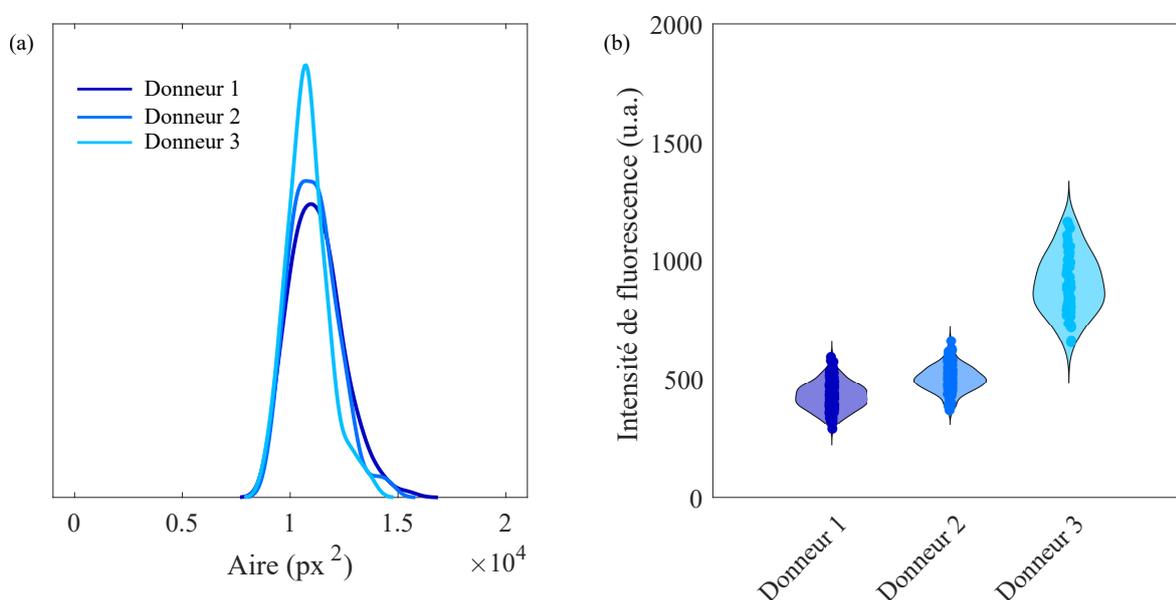


FIGURE 5.6 – **Comparaison entre trois donneurs sains en microscopie de fluorescence.** (a) Distributions d'aire des globules. (b) Distributions d'intensité de fluorescence des globules. Environ 200 globules sont imagés pour chaque donneur.

5.2.1 Contributions des membranes et du cytosol

Cette section s'intéresse à la quantification des contributions de la membrane et du cytosol au signal cellulaire : à l'aide d'un modèle géométrique de globule et d'analyses de profils d'intensité, nous estimons expérimentalement les fluorescences volumiques Φ des deux éléments et reconstituons le signal attendu en microscopie de fluorescence.

Modèle géométrique du globule rouge

Nous nous intéressons uniquement aux globules discocytaires. Après sédimentation sur la lamelle de verre, ils adoptent une forme de galette, comme observé sur la reconstitution 3D confocale en Figure 5.7. Dans notre modèle, nous supposons donc que les globules ont une hauteur constante en leur centre et des bords incurvés, comme représenté sur la Figure 5.8. Soit (x, y, z) un repère

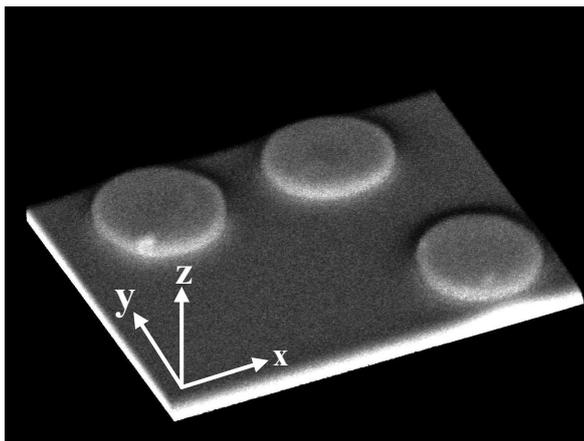


FIGURE 5.7 – **Représentation 3D d'un échantillon de GRs observé en microscopie confocale.** Le logiciel ZEN blue edition permet de réaliser cette reconstitution 3D à partir des images d'un z-stack d'un échantillon de GRs incubés dans une solution de DASPI. On distingue trois globules qui reposent sur une lame de verre. Les globules ont une forme de galette.

dans l'espace. Les globules reposent sur le plan (x, y) et la caméra est le long de l'axe z (Figure 5.8-(a)). Les images de fluorescence mesurées sont des projections dans le plan (x, y) . On considère ce plan constitué d'une matrice d'unités carrées de surface h_p^2 où h_p est la résolution optique du microscope, c'est-à-dire le rayon du disque d'Airy : $h_p = 1,22 \cdot \lambda / (2 \cdot \text{NA})$. Pour nos microscopes, confocal et de fluorescence, h_p est de l'ordre de 300 nm. Utiliser h_p permet de prendre en compte les effets de diffraction. Les paramètres pertinents pour décrire le globule et sa fluorescence dans notre modèle sont les suivants :

- Paramètres géométriques :
 - H_i : épaisseur du cytosol selon l'axe z dans la partie centrale. Pour un globule rouge biconcave, la hauteur maximale sur les bords est de 2 à 3 μm et la hauteur minimale au centre est de 0,8 à 1 μm [136]. Dans notre modèle où l'épaisseur du globule est constante, nous choisissons H_i comme une moyenne entre ces hauteurs maximales et minimales soit $1,3 \mu\text{m} \leq H_i \leq 1,9 \mu\text{m}$.
 - R : rayon moyen de courbure aux bords du globule rouge, on l'estime à la moitié de la hauteur maximale sur les bords, soit $1 \mu\text{m} \leq R \leq 1,5 \mu\text{m}$.
 - h_m : épaisseur de la membrane, nous la choisissons en accord avec la littérature : $40 \text{ nm} \leq h_m \leq 100 \text{ nm}$ [137-139].
- Intensités de fluorescences :
 - $\Phi_m \text{ (m}^{-3}\text{)}$: intensité de fluorescence par unité de volume de la membrane.
 - $\Phi_i \text{ (m}^{-3}\text{)}$: intensité de fluorescence par unité de volume du cytosol.

Description des profils d'intensité selon x

Un exemple de profil selon x a été montré en Figure 5.3, on y trouvait des pics sur les bords et un plateau au centre. À l'aide de ce modèle géométrique de globule, nous donnons une expression théorique des intensités mesurées sur un tel profil. Relier théoriquement les intensités attendues pour les pics et plateaux (qui sont des éléments mesurables) aux intensités volumiques de membrane Φ_m et de cytosol Φ_i (qui sont des éléments inconnus) permettra de les estimer.

Pour simplifier, on considère qu'un profil d'intensité est systématiquement obtenu en moyennant l'intensité mesurée sur un GR sur un rectangle central de largeur h_p (Figure 5.8-(b)). Étant donné que l'absorbance de l'hémoglobine a peu d'effet aux longueurs caractéristiques d'un globule (Chapitre 4, section 4.3.3), l'intensité mesurée sur un carré de section h_p^2 dans le plan (x, y) est une intégrale selon z des intensités volumiques sur la hauteur de la couche optique. On distingue alors la microscopie confocale où la couche optique Δ_{opt} est de plus faible épaisseur que le GR (Figure 5.8-(c)) et la microscopie de fluorescence où la couche optique englobe tout le GR (Figure 5.8-(d)). Un profil en microscopie confocale est donc d'intensité plus faible qu'un profil en microscopie de fluorescence de par la différence de taille des couches optiques. Sur la Figure 5.8-(c,d), on définit les intensités de pics M_f et M_c issus des bords du globule, où la membrane contribue à l'élévation du signal mesuré, et les intensités des plateaux P_f et P_c correspondants à la partie centrale de la cellule. On représente également en jaune sur la Figure 5.8-(d) le signal correspondant au cytosol seul et entier, on le suppose proportionnel à l'épaisseur locale de la cellule. Le plateau P_f correspond à l'intensité moyenne mesurée avec la macro ImageJ sur un globule en microscopie de fluorescence.

Nous donnons maintenant des expressions théoriques des pics et plateaux dans les deux types de microscopie.

Microscopie confocale En microscopie confocale, pour une image au centre du GR, le plateau correspond à une couche de cytosol d'épaisseur Δ_{opt} , soit :

$$P_c = h_p^2 \Delta_{\text{opt}} \Phi_i. \quad (5.3)$$

Pour les pics, la courbure des membranes sur les côtés peut être négligée car $\Delta_{\text{opt}}/2R \ll 1$. De plus, comme $h_m < h_p$, l'intensité sur la hauteur Δ_{opt} s'écrit :

$$M_c = h_p \Delta_{\text{opt}} (h_m \Phi_m + (h_p - h_m) \Phi_i) \quad (5.4)$$

De ces équations nous extrayons Φ_i et Φ_m , les fluorescences volumiques du cytosol et de la membrane :

$$\Phi_i = \frac{P_c}{\Delta_{\text{opt}} h_p^2} \quad (5.5)$$

$$\Phi_m = \frac{M_c - \frac{h_p - h_m}{h_p} \cdot P_c}{\Delta_{\text{opt}} h_m h_p} \quad (5.6)$$

Φ_i pourra être directement estimée en mesurant P_c puisque Δ_{opt} est connue et fixée par la taille du pinhole et h_p par l'objectif. Par contre, estimer Φ_m demande, en plus des mesures de P_c and M_c , une hypothèse sur l'épaisseur de membrane h_m (voir paragraphe *Estimation de Φ_i et Φ_m*).

Microscopie de fluorescence En microscopie de fluorescence, le plateau correspond à la contribution du cytosol C de hauteur H_i auquel sont ajoutées les contributions de deux éléments de membrane d'épaisseur h_m en haut et en bas (Memb), soit :

$$C = h_p^2 H_i \Phi_i \quad (5.7)$$

$$\text{Memb} = 2h_p^2 h_m \Phi_m \quad (5.8)$$

$$P_f = C + \text{Memb} = h_p^2 (H_i \Phi_i + 2h_m \Phi_m) \quad (5.9)$$

Pour décrire le signal du pic, la courbure de la membrane sur la distance h_p doit être prise en compte, on a alors :

$$M_f = h_m h_p S \Phi_m + h_p A \Phi_i \quad (5.10)$$

avec

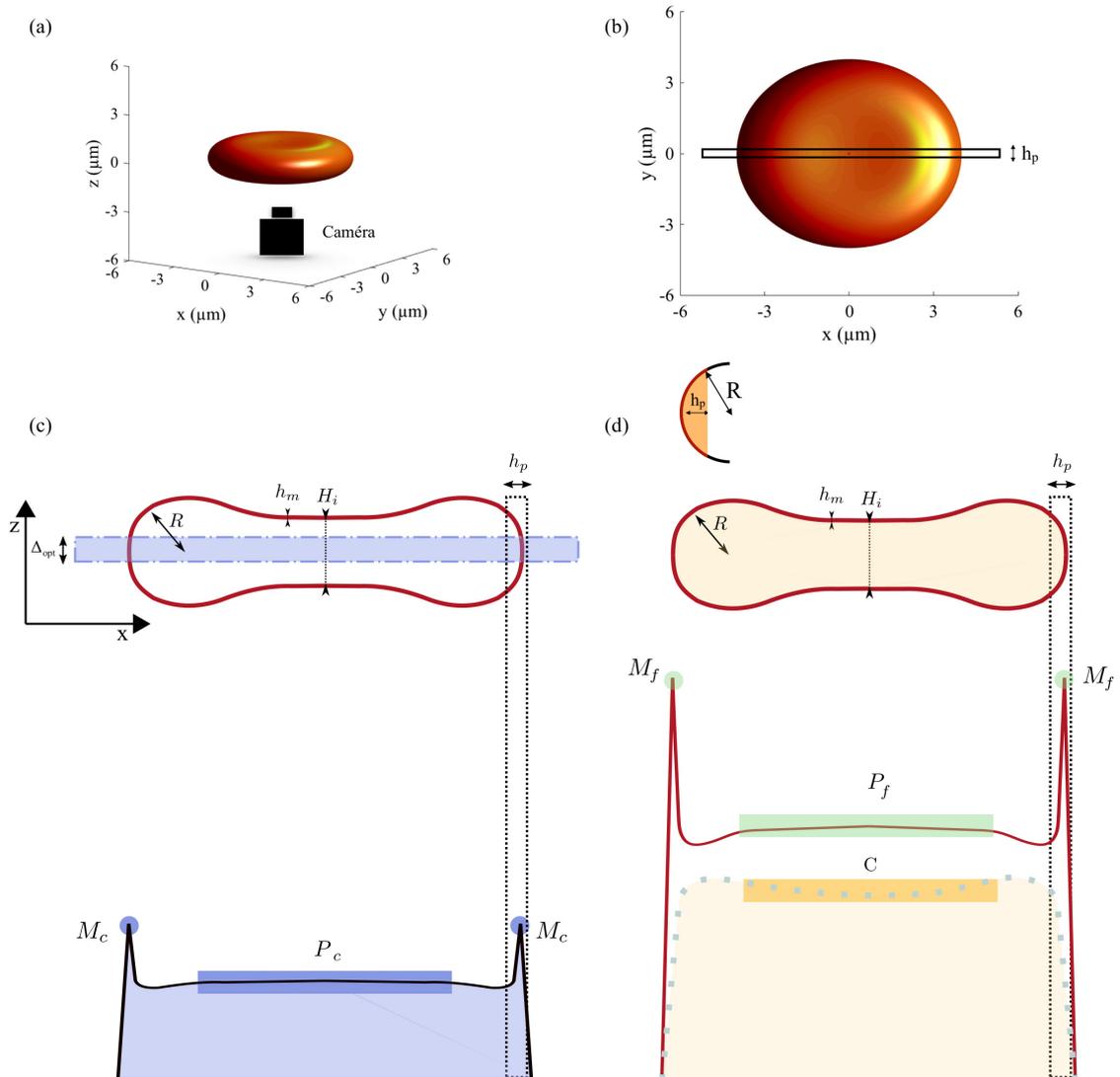


FIGURE 5.8 – **Modèle géométrique de globule et profils d'intensités.** (a) Représentation 3D d'un globule dans l'espace (x, y, z) . La caméra est le long de l'axe z . (b) Représentation 2D d'un globule dans le plan (x, y) et zone de mesure d'un profil d'intensité (rectangle de largeur h_p centré autour de $y = 0$). (c,d) Coupes 2D d'un globule pour $y = 0$ et profils d'intensité caractéristiques obtenus en microscopie confocale (c) où la hauteur de la couche optique est Δ_{opt} , et en microscopie de fluorescence (d) où tout le globule rentre dans la couche optique. Les pics et plateau des profils – M_c , P_c , M_f , P_f – sont définis ainsi que la contribution du cytosol C , et les paramètres géométriques du globule h_m , H_i et R .

- $S \approx 2\sqrt{2Rh_p}$, la longueur curviligne de la membrane, en rouge sur le zoom de la Figure 5.8-(d);
- $A \approx \frac{4h_p}{3}\sqrt{2Rh_p}$, l'aire du cytosol colorée en orange sur le zoom de la Figure 5.8-(d).

Ainsi, on obtient :

$$M_f = h_p^2 \sqrt{\frac{2R}{h_p}} \left(2h_m \phi_m + \frac{4}{3} h_p \Phi_i \right) \quad (5.11)$$

Estimation de Φ_i et Φ_m

Les fluorescences volumiques Φ_i et Φ_m sont estimées sur un échantillon statistique de 100 GRs. Ces GRs sont étudiés en microscopie confocale une fois incubés dans une solution de DASPI à 1 mM pendant 3,5h. L'image du z -stack située au centre des GRs est sélectionnée, les profils selon x tracés et les valeurs des pics M_c et plateaux P_c mesurées. La Figure 5.9 présente Φ_i et Φ_m alors estimées avec les équations 5.5 et 5.6. En nous basant sur la gamme de valeurs trouvées dans la littérature pour l'épaisseur de membrane [137-139], nous représentons les distributions de Φ_m obtenues pour trois valeurs de h_m : $h_{m_{min}} = 40$ nm, $h_{m_{moy}} = 70$ nm, $h_{m_{max}} = 100$ nm.

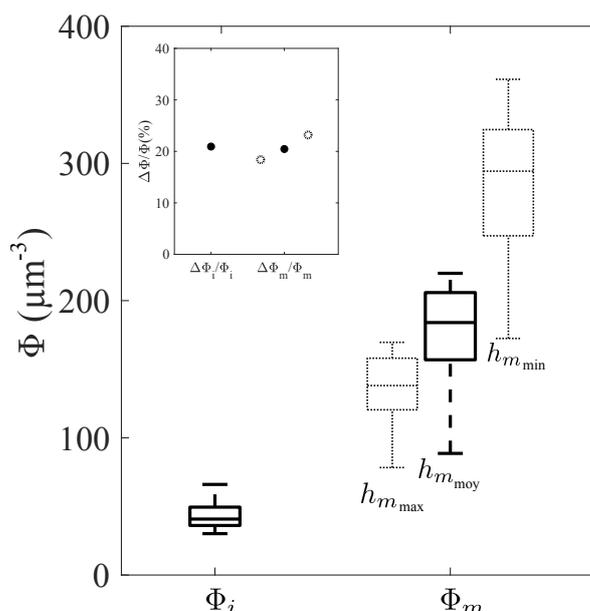


FIGURE 5.9 – **Estimation de Φ_i et Φ_m .** Les intensités volumiques du cytosol et des membranes, Φ_i et Φ_m , sont calculées à partir des équations 5.5 et 5.6 et des mesures expérimentales de M_c et P_c . Les distributions de Φ_m sont présentées pour trois valeurs de h_m ($h_{m_{min}} = 40$ nm, $h_{m_{moy}} = 70$ nm, $h_{m_{max}} = 100$ nm). Les hétérogénéités $\Delta\Phi/\Phi$ sont présentées en insert.

Nous observons que quel que soit le h_m choisi, $\Phi_m > \Phi_i$, ce qui est en accord avec l'existence de pics sur les profils d'intensité. Le choix de la valeur de h_m a un impact important sur les valeurs de Φ_m trouvées, $\Phi_m(h_{min})$ et $\Phi_m(h_{max})$ étant complètement disjointes. Bien que la distribution de Φ_i semble moins dispersée sur la figure que celle de Φ_m , les hétérogénéités $\Delta\Phi/\Phi$ (calculées à partir d'un fit gaussien des distributions) sont proches pour les deux distributions, de l'ordre de 30% (voir l'insert). L'origine de l'hétérogénéité du signal issu d'une population de GRs sera discutée au Chapitre 7.

Contribution du cytosol en microscopie de fluorescence

À partir de la détermination de Φ_m et de Φ_i obtenue ci-dessus, nous utilisons l'équation 5.9 et simulons le plateau obtenu en microscopie à fluorescence P_f qui correspond à l'intensité moyenne mesurée avec la macro ImageJ sur un globule. Nous calculons également les contributions du cytosol et des membranes, respectivement C (équation 5.7) et Memb (équation 5.8), en rappelant que $P_f = C + Memb$.

On remarque que ces équations font intervenir les paramètres géométriques h_m et H_i . Nous les faisons varier dans les gammes définies plus haut pour décrire les différentes géométries envisagées pour un GR. Les paramètres Memb, C et P_f sont alors présentés sur la Figure 5.10 pour différentes valeurs de h_m et H_i . Avec Φ_i et Φ_m fixés, la valeur de Memb est uniquement contrôlée

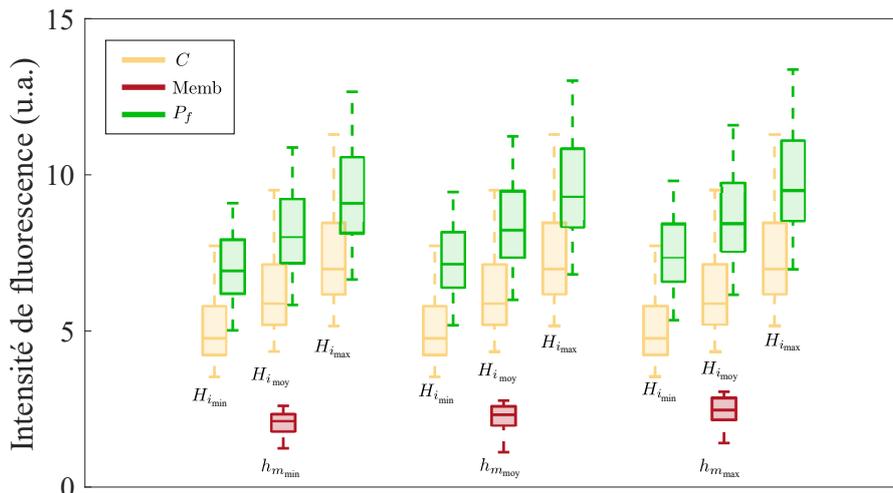


FIGURE 5.10 – **Distributions de P_f, C et Memb obtenues avec le modèle géométrique.** Pour estimer ces grandeurs, nous utilisons les valeurs de Φ_i et Φ_m obtenues en Figure 5.9. Les distributions sont évaluées pour trois valeurs de h_m : $h_{m_{min}} = 40\text{nm}$, $h_{m_{moy}} = 70\text{nm}$, $h_{m_{max}} = 100\text{nm}$ et trois valeurs de H_i : $H_{i_{min}} = 1,3\ \mu\text{m}$, $H_{i_{moy}} = 1,6\ \mu\text{m}$, $H_{i_{max}} = 1,9\ \mu\text{m}$.

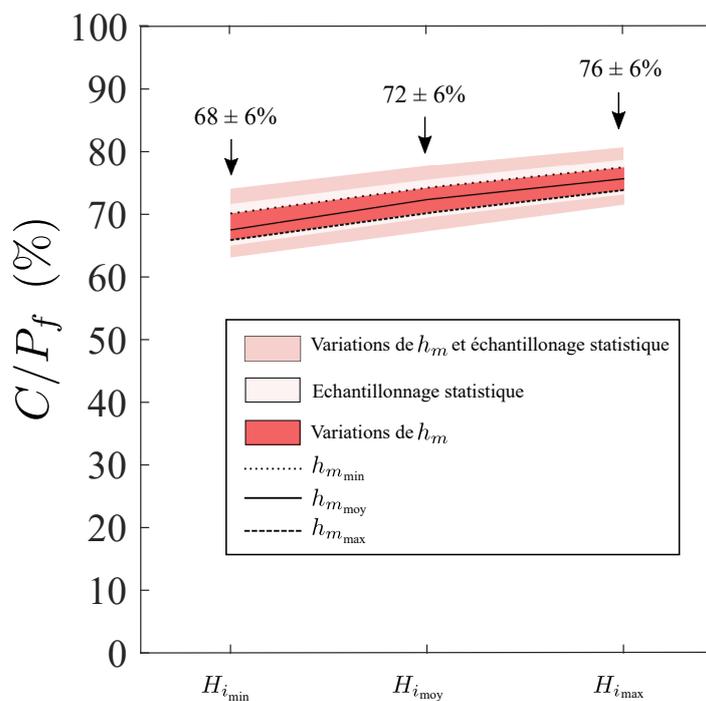


FIGURE 5.11 – **Estimation de C/P_f en fonction de H_i .** Les bandes colorées représentent les variations obtenues avec l'échantillonnage statistique de 100 globules (bande claire) et l'incertitude sur h_m (bande foncée). La ligne continue correspond aux valeurs médianes de C/P_f lorsque h_m est fixée à sa valeur moyenne. Les lignes pointillées correspondent aux valeurs médianes de C/P_f obtenues pour les valeurs extrêmes $h_{m_{min}}$ et $h_{m_{max}}$. La bande de couleur intermédiaire regroupe les deux effets. La contribution du cytosol au signal de plateau C/P_f est proche des 70%, indépendamment des valeurs prises par H_i .

par le paramètre h_m et la valeur de C uniquement par H_i . Concernant P_f , on observe qu'il dépend peu de la valeur de h_m considérée mais qu'en revanche la dépendance en H_i est significative. On comprend donc que, même si la fluorescence par unité de volume des membranes est supérieure à celle du cytosol ($\Phi_m > \Phi_i$), la très faible épaisseur de la membrane par rapport à la hauteur de la

cellule ($h_m \ll H_i$) limite la contribution de la membrane au signal total P_f . Ainsi, pour Φ_m et Φ_i constants, H_i est le paramètre contrôlant le signal mesuré sur un GR, P_f .

Pour finir, nous estimons C/P_f , pour les différentes valeurs de h_m et H_i envisagées (Figure 5.11). La quantité C/P_f quantifie la contribution du cytosol au signal cellulaire mesuré en microscopie de fluorescence. Sur la figure, nous représentons avec des bandes colorées les variations de C/P_f dues aux variations de h_m (zone foncée), à la dispersion statistique des données issues de 100 globules (zone claire), et à la somme des deux (zone de couleur intermédiaire). Nous observons que l'incertitude liée aux valeurs de h_m est plus faible que celle due à l'échantillonnage statistique ce qui montre encore une fois que la connaissance de la valeur précise de h_m n'est pas nécessaire. Plus important, on observe qu'indépendamment des valeurs prises par H_i , la contribution du cytosol au signal de plateau C/P_f est proche des 70%. Le cytosol est donc largement responsable de la fluorescence cellulaire en microscopie de fluorescence.

Conclusion Dans cette partie, nous présentons un modèle géométrique de GR qui permet d'apporter une description générale du signal mesuré sur un GR en microscopie de fluorescence et en microscopie confocale. En particulier, en estimant les contributions de membrane et du cytosol, nous montrons qu'environ 70% du signal mesuré sur un GR en microscopie de fluorescence provient du cytosol.

5.2.2 Paramètres géométriques de la détection : quel effet sur le signal ?

Il est possible que la géométrie des globules dévie de la géométrie typique décrite dans le modèle. Pour un GR donné, une variation de sa configuration 3D induira une variation du signal mesuré en microscopie de fluorescence, étant donné qu'il s'agit d'une intégrale volumique. Dans cette section, nous nous intéressons aux corrélations entre le signal cellulaire mesuré et les paramètres géométriques de la détection qui reflètent la structure 3D du GR. Les paramètres géométriques sont mesurés avec notre macro ImageJ lors de la détection des contours des cellules. Nous avons accès à :

- l'aire;
- la circularité;
- la rondeur;
- le rapport d'aspect;
- la solidité.

Ces paramètres sont définis sur la Figure 5.12.

Nous travaillons toujours sur les globules discocytaires uniquement et, pour dix échantillons étudiés, traçons les nuages de points d'intensité de fluorescence (un point par globule) en fonction de chacun de ces paramètres. En Figure 5.13, nous montrons l'exemple des résultats obtenus avec le paramètre Aire. Les distributions d'intensités ont été mesurées à 25°C et 37°C. À partir de chaque nuage de points et pour chaque échantillon i , nous cherchons une corrélation linéaire entre l'intensité de fluorescence et le paramètre géométrique j et extrayons les coefficients de corrélation $r_{i,j}$ et $p_{i,j}$ définissant respectivement la force et la significativité statistique de cette corrélation. Nous présentons en Figure 5.14 les valeurs de $\langle |r_{i,j}| \rangle_i$ et $\langle p_{i,j} \rangle_i$, moyennes de $|r|$ et p sur tous les échantillons i en fonction des différents paramètres géométriques j définis ci-dessus. Nous observons qu'aux deux températures, les corrélations trouvées entre la fluorescence et les paramètres géométriques sont des corrélations "négligeables" (zone rouge sur la Figure 5.14-(a)) et statistiquement non significatives (zone rouge sur la Figure 5.14-(b)). Le signal de fluorescence

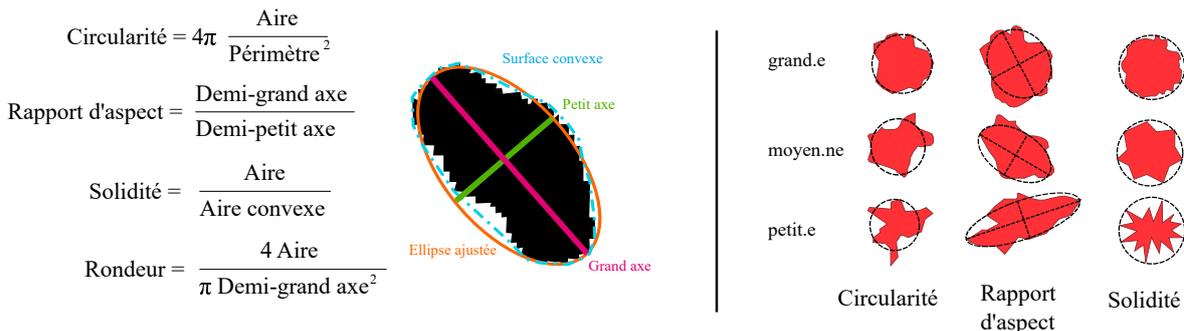


FIGURE 5.12 – Définition des paramètres géométriques de la détection : circularité, rapport d’aspect, solidité et rondeur. À droite nous présentons des illustrations correspondant à des valeurs petites, moyennes et grandes de circularité, rapport d’aspect et solidité. Figure adaptée de [140].

semble donc ne pas être corrélé aux paramètres géométriques du GR issus de la détection par la macro.

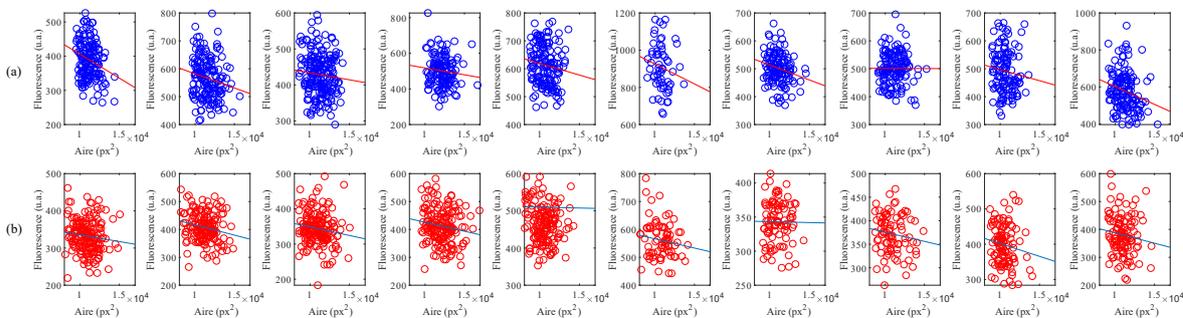


FIGURE 5.13 – Étude du paramètre géométrique Aire. Nuages de points des intensités de fluorescence (un point par globule) en fonction du paramètre géométrique Aire pour dix échantillons. Les lignes continues représentent les corrélations linéaires trouvées. (a) La température est fixée à 25°C (b) La température est fixée à 37°C.

Notons que tous les paramètres ne sont pas équivalents : certains peuvent dépendre de la qualité de l’image et de la segmentation, comme la circularité ou la rondeur, d’autres sont plus directement reliés à la géométrie 3D du GR, comme l’aire et le rapport d’aspect. Sur la Figure 5.13, on voit par exemple qu’un globule présentant une grande aire peut être de même fluorescence qu’un globule de petite aire. Ainsi, si au sein d’un échantillon les paramètres géométriques qui reflètent l’agencement 3D d’un GR ne contrôlent pas de manière significative le signal de fluorescence qui en est issu, alors des propriétés intrinsèques du globule doivent le contrôler. Dans le Chapitre 6, nous étudierons en particulier l’effet de la concentration en hémoglobine (MCHC) sur le signal cellulaire. L’effet de la hauteur des cellules H_i – non étudié ici car non accessible au niveau des cellules individuelles – sera aussi discuté.

Conclusion Nous montrons qu’à l’échelle d’un échantillon, il n’y a pas d’effet significatif des paramètres géométriques de la détection des GRs sur leur signal de fluorescence, ce qui suggère que d’autres paramètres intrinsèques aux GRs doivent le contrôler. Afin de comprendre les variations d’intensité observées entre différents échantillons, nous étudierons dans le chapitre suivant l’effet de la rigidité des GRs sur la réponse du DASPI.

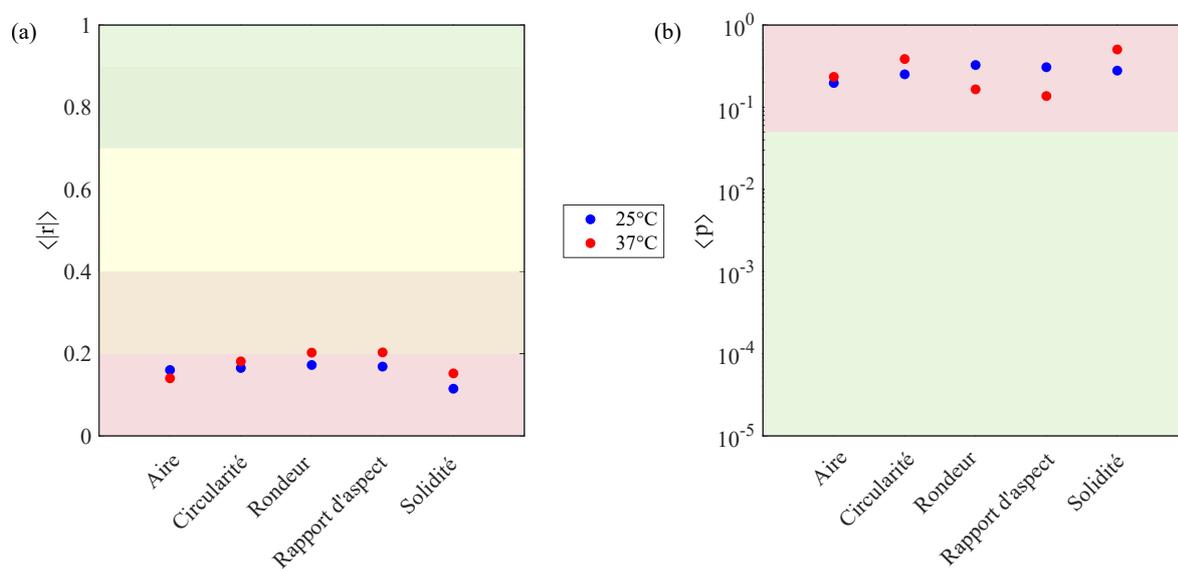


FIGURE 5.14 – **Analyse des corrélations.** Norme du coefficient de corrélation linéaire $|r|$ et p-value, moyennés sur 10 échantillons, présentés en fonction du paramètre géométrique étudié. (a) Force de la corrélation "négligeable" (zone rouge), "faible" (zone orange), "modérée" (zone jaune), "forte" et "très forte" (zones vertes). (b) Significativité statistique de la corrélation "non significatif" (zone rouge), "significatif" (zone verte). Les corrélations trouvées sont toutes négligeables et non significatives.

6

NANORHÉOLOGIE : PREUVES DE CONCEPT

Nous étudions dans ce chapitre la capacité du DASPI à sonder la rigidité des globules avec deux expériences spécifiques : d'une part en rigidifiant les globules par contrôle de température, d'autre part en comparant des échantillons provenant de donneurs sains, aux concentrations internes en hémoglobine différentes.

6.1	Rigidification par température	81
6.1.1	Viscosité de l'hémoglobine avec la température	81
6.1.2	Réponse du DASPI à la rigidification	82
6.2	La MCHC comme paramètre de rigidité	86
6.2.1	Viscosité de l'hémoglobine avec la concentration	87
6.2.2	Réponse du DASPI à la MCHC	87

6.1 Rigidification par température

Il est connu que l'abaissement de température accroît la rigidité des globules rouges à deux niveaux : la viscosité de l'hémoglobine, principal composant du cytosol, augmente [55, 56] et les membranes deviennent plus rigides [57, 58, 141]. La température comme contrôle de rigidité est particulièrement intéressante car elle n'implique aucune modification chimique au niveau du globule comme cela est le cas avec des agents rigidifiants comme le glutaraldéhyde [142]. Dans nos expériences, la température est variée entre 18°C et 43°C.

6.1.1 Viscosité de l'hémoglobine avec la température

Dans un premier temps, nous confirmons expérimentalement que la viscosité de solutions d'hémoglobine aux concentrations physiologiques augmente avec l'abaissement de température. La viscosité de six solutions dont la concentration est comprise entre 25,5 g/dL et 38,5 g/dL est mesurée par microrhéologie aux différentes températures et les résultats sont présentés en Figure 6.1. Nous avons préalablement montré que l'hémoglobine se comportait comme un fluide purement visqueux et que les solutions étaient homogènes aux concentrations considérées (Figure 4.2, Chapitre 4).

Nos expériences montrent ici que la viscosité diminue avec la température à concentration fixée, et augmente avec la concentration à température fixée. Pour une gamme de concentration donnée, on observe que les valeurs de viscosité s'étendent sur une plage plus large à basse température (zone bleue) qu'à haute température (zone rouge). L'allure de ces courbes avec la température est cohérente avec la littérature [55, 56].

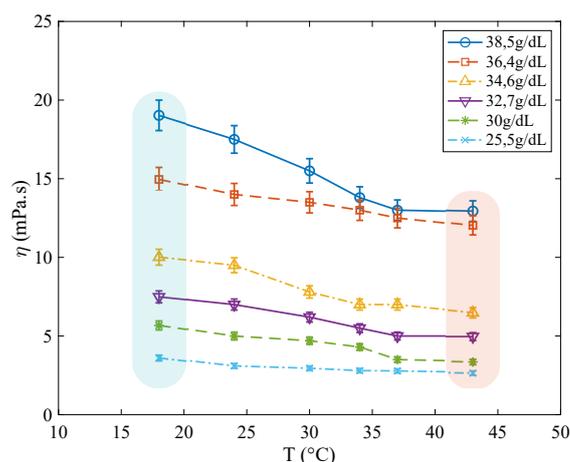


FIGURE 6.1 – **Viscosité de l'hémoglobine avec la température.** La viscosité est mesurée par microrhéologie pour des solutions d'hémoglobine dont la concentration varie entre 25,5 g/dL et 38,5 g/dL. La viscosité diminue avec la température et augmente avec la concentration. Pour une gamme de concentration donnée, les valeurs de viscosité s'étendent sur une plus grande plage à basse température (zone bleue) qu'à haute température (zone rouge).

6.1.2 Réponse du DASPI à la rigidification

Nous étudions la réponse du DASPI à la rigidification des globules par température. La Figure 6.2 montre des images de globules rouges aux températures $T = 18^{\circ}\text{C}$, 24°C , 30°C , 37°C et 43°C . Les profils d'intensité selon x des globules marqués d'une étoile sont également présentés. L'intensité du fond (solution de PBS) et du plateau des profils augmentent lorsque la température diminue. Ceci montre que le DASPI est sensible à la viscosité du fluide suspendant et à la rigidité des globules. La viscosité de la solution de PBS suspendante a été mesurée sur quelques expériences spécifiques par microrhéologie en ajoutant des billes de Latex au milieu, et les couples intensité-viscosité du fond sont présentés en Figure 6.2-(c). On observe que l'émission du rotor augmente avec la viscosité du PBS et que les données peuvent être ajustées par une loi de puissance de Förster-Hoffmann d'exposant $x = 0,7$, comme attendu dans les fluides simples.

Pour garantir un échantillonnage statistiquement pertinent, les globules étudiés proviennent de 5 échantillons sanguins de donneurs différents dont la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (MCHC) varie entre 30 g/dL et 35 g/dL. La Figure 6.3 présente les intensités mesurées sur les GRs en fonction de la température et sous forme de boxplot. Lorsque la température diminue, l'intensité médiane de la fluorescence augmente : de 35% dans les solutions de DASPI à 1 mM et de 26% dans les solutions de DASPI à 0,1 mM. L'analyse statistique fournit une corrélation négative entre l'intensité de la fluorescence et la température avec $r = -0,55$, $p = 10^{-153}$ dans une solution de DASPI à 1 mM et $r = -0,48$, $p = 10^{-188}$ dans une solution de DASPI à 0,01 mM. Ceci signifie que la température, en tant que paramètre de contrôle de rigidité, a un impact significatif sur la fluorescence du DASPI. De manière similaire, lorsque l'on considère les globules provenant d'un seul donneur (Figure 6.3-(b)), la distribution de l'intensité de fluorescence de l'échantillon se déplace vers des intensités élevées.

De plus, sur les données des cinq échantillons comme sur celles du donneur sélectionné, on observe une dispersion des intensités plus importante à basse température qu'à haute température. Dans cette première étude publiée dans *Soft Matter* en 2021 [110], nous mettions en parallèle l'élargissement de la distribution d'intensité de fluorescence avec celui de la gamme de viscosité mesurée dans les solutions d'hémoglobine à basse température (Figure 6.1). Au Chapitre 7, nous discuterons plus amplement l'origine de l'hétérogénéité d'une distribution d'intensité de fluores-

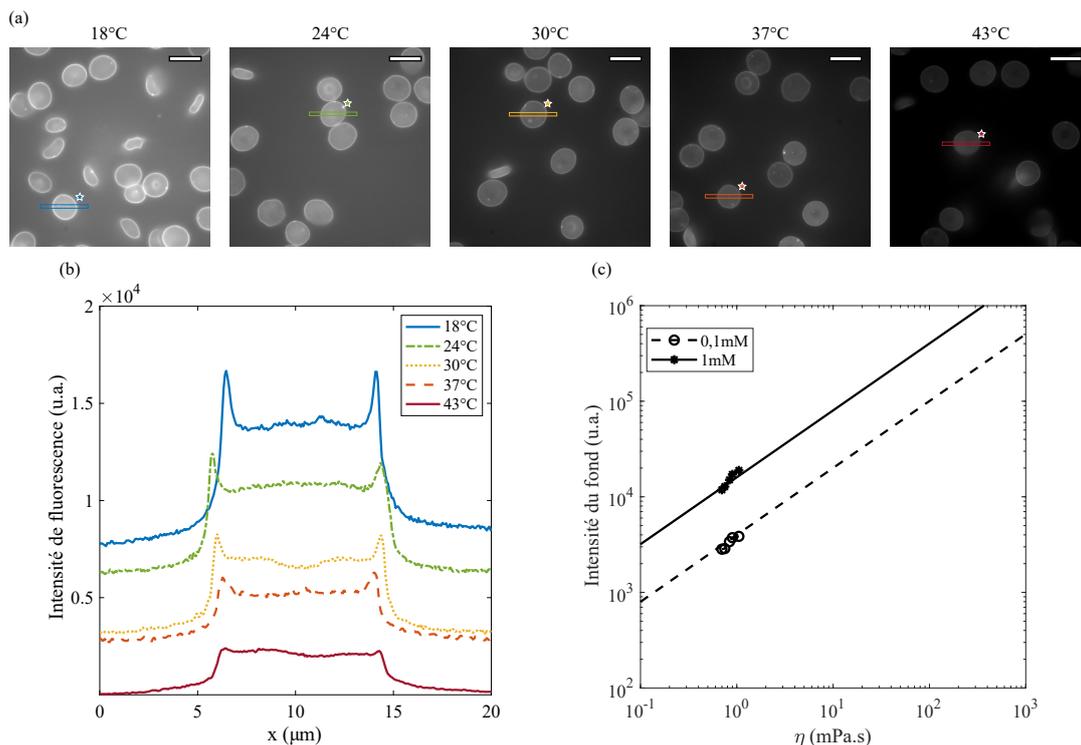


FIGURE 6.2 – **Microscopie de fluorescence de globules rouges à différentes températures.** (a) Images de globules rouges à température croissante dans une solution de DASPI à 1mM (échelle 10 μm). (b) Profils d’intensité de fluorescence selon x des globules marqués par une étoile. L’intensité est moyennée sur un rectangle d’épaisseur 1,5 μm . (c) Intensité de fluorescence du fond en fonction de la viscosité des solutions pour une concentration en DASPI de 0,1 mM et de 1 mM. Les données sont ajustées par une équation de Förster-Hoffmann avec un exposant $x = 0,7$. Résultats publiés dans [110].

cence d’un échantillon de GRs.

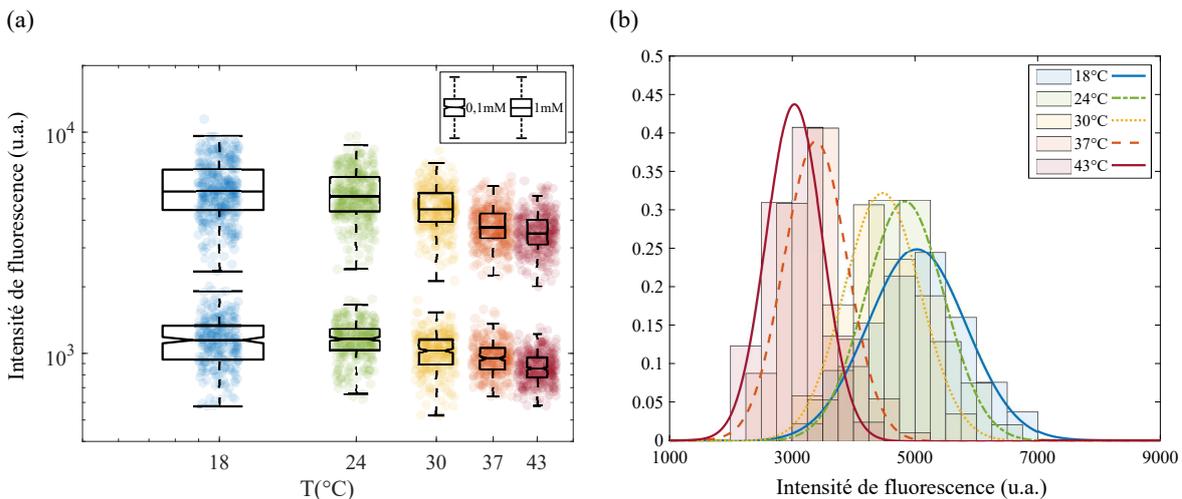


FIGURE 6.3 – **Fluorescence des globules rouges avec la température.** (a) Les GRs sont étudiés à cinq températures dans des solutions de DASPI à 0,1 mM et à 1 mM. Ils proviennent de cinq donneurs de MCHC entre 30 g/dL et 35 g/dL. (b) Pour un unique donneur de MCHC = 33,5 g/dL, nous représentons les histogrammes normalisés et distributions d’intensité calculés à partir d’environ 80 points, lorsque les GRs sont dans une solution de DASPI à 1 mM. Résultats publiés dans [110].

À présent, nous estimons indirectement la relation entre l'intensité de fluorescence des solutions d'hémoglobine contenues dans les GRs, et leur viscosité. À partir des courbes de la Figure 6.1, nous estimons la viscosité d'une solution d'hémoglobine de MCHC égale à 32,5 g/dL (moyenne des MCHC de l'échantillonnage statistique) aux différentes températures. En Figure 6.4, nous reportons ces viscosités ainsi que les intensités médianes des boxplots de la Figure 6.3 associées à chaque température. Nous remarquons alors qu'il est possible de faire passer des lois de puissance de Förster-Hoffmann d'exposant 0,7 par ces points. La solution d'hémoglobine dans les GRs suit donc une relation de Förster-Hoffmann. Ceci est cohérent avec les résultats des précédents chapitres : le signal cellulaire provient majoritairement du cytosol (Chapitre 5), constitué d'une solution d'hémoglobine, et pour l'hémoglobine, des relations intensité-viscosité de Förster-Hoffmann sont trouvées lorsque la viscosité est variée par température (Chapitre 4).

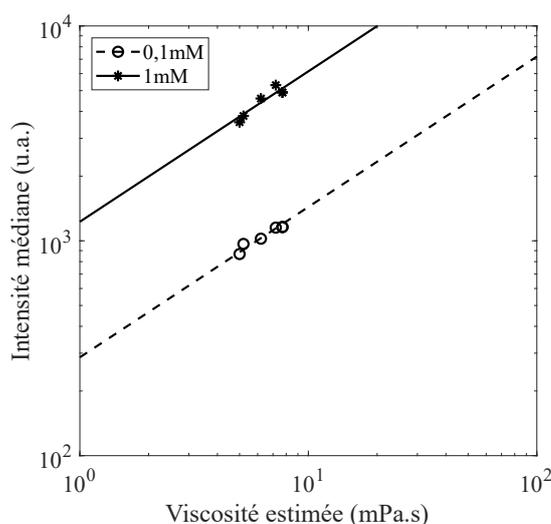


FIGURE 6.4 – **Courbes intensité-viscosité dans les GRs.** Les intensités médianes des boxplots de la Figure 6.2 sont reportées en fonction d'une viscosité estimée pour une solution d'hémoglobine "moyenne" de MCHC = 32,5 g/dL (moyenne des MCHC issues des 5 échantillons étudiés). Les données sont ajustées par une relation de Förster-Hoffmann d'exposant $x = 0,7$.

Contribution des membranes et du cytosol avec la température La température ayant un effet sur la rigidité des membranes et sur la viscosité du cytosol, nous allons estimer les contributions au signal de fluorescence de ces deux éléments : C et Memb. Nous utilisons le modèle géométrique présenté au Chapitre 5 et étudions les profils d'intensité selon x des GRs étudiés. Ici, nous travaillons en microscopie de fluorescence, nous mesurons donc sur un profil les pics et plateaux M_f et P_f (voir Figure 5.8). C et Memb s'écrivent alors :

$$C = P_f \cdot \frac{1 - \sqrt{\frac{h_p}{2R} \frac{M_f}{P_f}}}{1 - \frac{4}{3} \frac{h_p}{H_i}} \quad (6.1)$$

$$\text{Memb} = P_f - C \quad (6.2)$$

On voit que ces équations font intervenir les paramètres géométriques R et H_i . Pour rappel, dans le Chapitre 5, nous avons surtout discuté des paramètres h_m et H_i , qui sont pertinents lorsque nous analysons des profils d'intensité en microscopie confocale. Ici ce n'est pas le cas, et l'épaisseur de la couche optique nous force à prendre en compte la courbure du GR sur ces bords,

R. Ainsi, dans cette analyse, nous faisons varier R et H_i dans les gammes définies, $1\ \mu\text{m} \leq R \leq 1,5\ \mu\text{m}$ et $1,3\ \mu\text{m} \leq H_i \leq 1,9\ \mu\text{m}$, pour couvrir les différentes géométries envisagées pour un GR. Nous définissons des géométries extrêmes G1 et G2, et une géométrie moyenne G3, représentées en Figure 6.5 et détaillées dans la légende. Les paramètres R et H_i sont considérés invariants avec la température, ce qui est soutenu par les observations récentes de Jaferzadeh et al. [143].

Environ 100 profils de globules selon x sont étudiés, ce qui est représentatif de la dispersion des données de la Figure 6.2-(a) et C et Memb sont estimés pour les différentes géométries et aux différentes températures (Figure 6.5). La dispersion des données due respectivement à l'échantillonnage statistique et aux inconnues géométriques sont présentées par des bandes colorées, similairement à la Figure 5.11 (Chapitre 5).

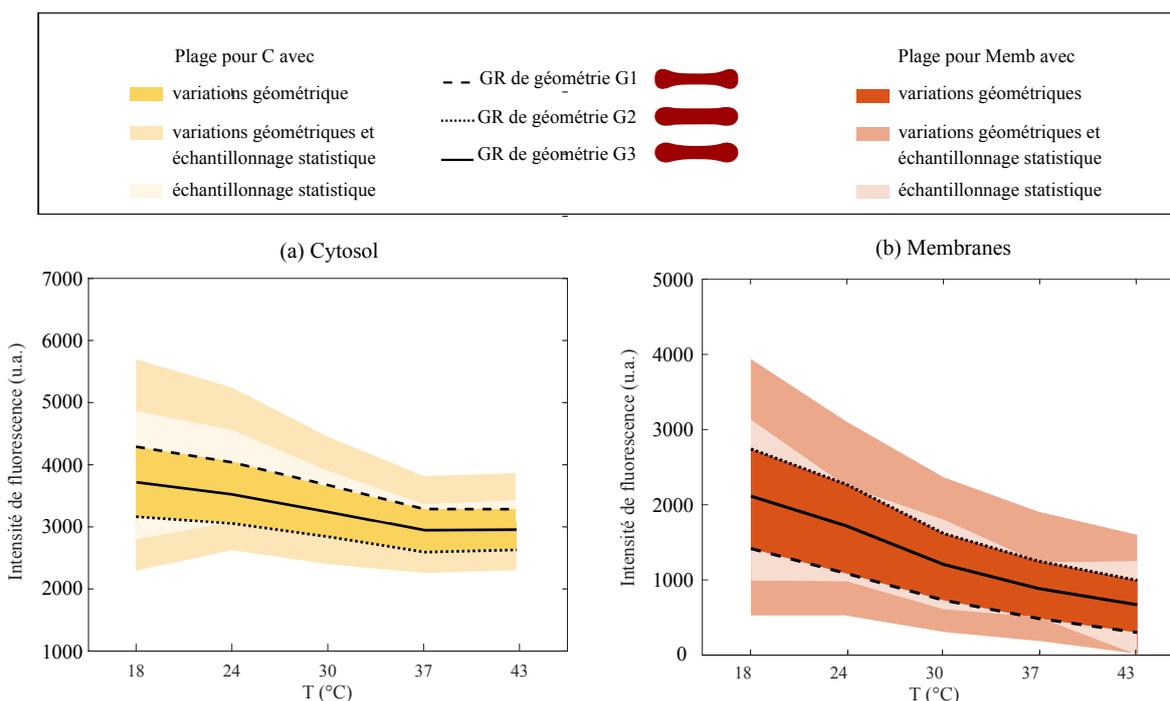


FIGURE 6.5 – **Cytosol et membranes avec la température.** Estimation de la contribution du cytosol C (a) et des membranes Memb (b) à l'aide du modèle géométrique, aux différentes températures, pour les GRs incubés dans du DASPI à 1 mM. Pour les deux sous-figures, les zones de couleur claire représentent les variations dues à l'échantillonnage statistique. Les lignes continues sont obtenues en considérant les valeurs médianes calculées avec la géométrie moyenne G3 ($R = 1,25\ \mu\text{m}$, $H_i = 1,6\ \mu\text{m}$). Les bandes sombres quantifient la dispersion des données pour toutes les géométries considérées dans les gammes $1\ \mu\text{m} < R < 1,5\ \mu\text{m}$ et $1,3\ \mu\text{m} < H_i < 1,9\ \mu\text{m}$. Les lignes pointillées correspondent aux valeurs médianes de C et Memb obtenues pour les géométries extrêmes G1 ($R = 1,5\ \mu\text{m}$, $H_i = 1,3\ \mu\text{m}$) et G2 ($R = 1\ \mu\text{m}$, $H_i = 1,9\ \mu\text{m}$). Les bandes de couleur intermédiaires rassemblent à la fois les effets de l'échantillonnage statistique et les effets des géométries possibles.

On observe en suivant les lignes continues ou pointillées, que quelle que soit la géométrie du GR, C et de Memb augmentent avec la baisse de température. Pour un GR de géométrie moyenne G3, on estime que l'augmentation d'intensité est de 35% pour C et de 220% pour Memb entre $T = 43^\circ\text{C}$ et $T = 18^\circ\text{C}$. Le signal de membrane augmente donc plus rapidement que celui du cytosol avec la diminution de température, ce qui reste à explorer en termes d'interactions rotor-membrane. Finalement, le signal global P_f présenté sur la Figure 6.3, celui du cytosol C et celui des membranes Memb, augmentent tous trois avec la rigidité globale du globule rouge. De plus, systématiquement, les incertitudes liées à l'échantillonnage statistique sont plus importantes que celles liées aux variations de géométrie. Ceci suggère que la dispersion des intensités de fluo-

cence reflète l'hétérogénéité des propriétés des GRs.

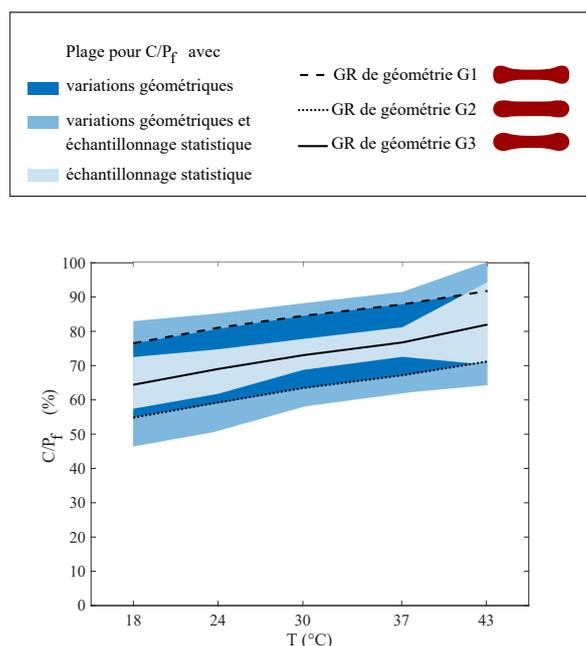


FIGURE 6.6 – **Estimation de C/P_f avec la température.** Les valeurs de C/P_f sont obtenues à partir des résultats présentés en Figure 6.3 et 6.5 pour les GRs incubés dans du DASPI à 1 mM. Les bandes de couleur et les lignes continues et pointillées se lisent similairement à celles de la Figure 6.5.

Enfin, nous estimons les variations de C/P_f avec la température et les présentons en Figure 6.6. On observe que le rapport C/P_f augmente avec la température, ce qui est cohérent avec le fait que le signal de membrane varie plus rapidement que celui du cytosol. Les valeurs trouvées pour C/P_f sont cohérentes avec celles présentées au Chapitre 5 (Figure 5.11). Nos deux études, menées sur des dispositifs de microscopie différents, et faisant intervenir des paramètres géométriques différents (R et H_i ici, h_m et H_i au Chapitre 5) mènent au même résultat : la contribution du cytosol au signal mesuré en microscopie de fluorescence est de l'ordre de 70%.

Conclusion Nous montrons ici que le DASPI répond à des variations de rigidité du globule rouge par contrôle de température à la fois au niveau global (P_f), membranaire (Memb) et intracellulaire (C), pour les différentes géométries de GRs considérées. Nous montrons une fois de plus qu'en microscopie de fluorescence, environ 70 % de l'intensité mesurée au niveau d'un GR provient du cytosol. Ainsi le DASPI est une sonde pertinente pour étudier les variations de rigidité des GRs.

6.2 La MCHC comme paramètre de rigidité

Nous testons maintenant la capacité du DASPI à détecter des variations de rigidité de GRs induites, non plus pas contrôle externe, mais lorsque cette dernière varie entre donneurs. Étant donné que le signal mesuré sur une cellule provient majoritairement du cytosol, nous nous intéressons à l'effet de la MCHC. C'est une donnée qui nous est fournie par l'EFS quand nous réceptionnons l'échantillon. Elle est mesurée à partir d'une quantification du taux d'hémoglobine Hb dans l'échantillon (par test colorimétrique), et par quantification de l'hématocrite Ht de l'échantillon (par centrifugation capillaire) avec $MCHC = Hb/Ht$. Nous obtenons de l'EFS des échantillons de MCHC aléatoire, dépendant du donneur.

6.2.1 Viscosité de l'hémoglobine avec la concentration

Nous rappelons que la viscosité de l'hémoglobine augmente avec la concentration et présentons en Figure 6.7 nos mesures réalisées en microrhéologie à 25°C sur une large gamme de concentration, $c_{\text{Hb}} = 2 - 43 \text{ g/dL}$. Nous retrouvons une courbe similaire à Chien et al. [18] (voir Chapitre 1), avec une augmentation drastique de la viscosité à haute concentration. La MCHC dans un

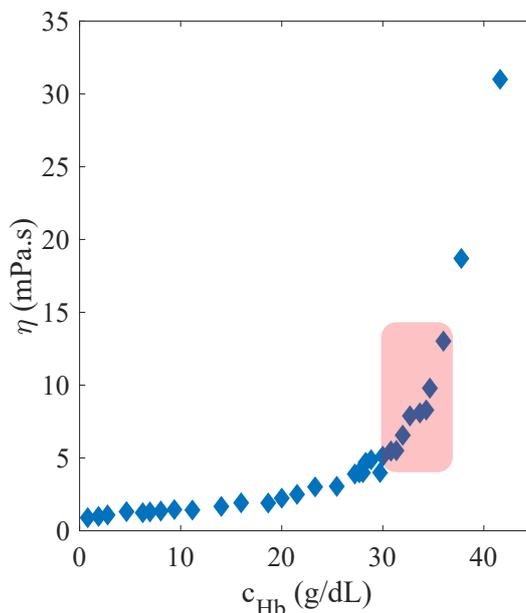


FIGURE 6.7 – **Viscosité de l'hémoglobine avec la concentration.** Les mesures sont faites en microrhéologie à $T = 25^\circ\text{C}$. La viscosité augmente avec la concentration. La zone rouge représente les variations de viscosités sur la gamme des concentrations physiologiques.

globule rouge est connue pour varier typiquement dans la gamme 30–36 g/dL. Sur ces concentrations, la viscosité varie significativement, typiquement entre 3 mPa.s et 15 mPa.s (zone rouge). Aux concentrations physiologiques, la viscosité interne et donc la rigidité globale d'un globule sont donc largement impactées par la valeur de la MCHC.

6.2.2 Réponse du DASPI à la MCHC

Nous présentons en Figure 6.8 les distributions d'intensité mesurées en microscopie de fluorescence de 8 donneurs de MCHC variant entre 31 g/dL et 36 g/dL. Les mesures sont faites à deux températures, $T = 25^\circ\text{C}$ et $T = 37^\circ\text{C}$. Sur ces faibles variations de MCHC, nous observons une augmentation significative de l'intensité avec la MCHC avec $r = 0,70$, $p = 10^{-131}$ à $T = 25^\circ\text{C}$ et $r = 0,69$, $p = 10^{-132}$ à $T = 37^\circ\text{C}$. Cette augmentation d'intensité est en accord avec une plus grande rigidité des globules à haute MCHC. Le DASPI semble donc être sensible à des variations de rigidité interne via la MCHC.

Effet de H_i ? Nous avons vu au Chapitre 5 que le paramètre géométrique H_i – hauteur de la cellule – avait son importance sur le signal mesuré en microscopie de fluorescence, P_f . Nous nous demandons donc si les variations d'intensité observées entre échantillons, au lieu d'être un effet de la MCHC, peuvent être dues à des variations de hauteur de cellule. Pour cela, nous étudions plus particulièrement 3 échantillons : celui de plus faible intensité (MCHC= 31 g/dL), celui de plus haute intensité (MCHC= 34 g/L), et un d'intensité intermédiaire (MCHC= 33 g/dL).

Leurs distributions à $T = 25^\circ\text{C}$ en fonction de la MCHC sont reportées en Figure 6.9-(a) et nous leur attribuons des couleurs pour les distinguer. Pour ces trois échantillons, nous connaissons le volume globulaire moyen VGM des GRs, fourni par l'EFS, et l'aire moyenne A des GRs, mesurée avec la macro ImageJ. En assimilant un globule à un cylindre de base d'aire A et de hauteur H_i , nous estimons la hauteur moyenne des globules pour chaque échantillon : $H_i = \text{VGM}/A$. On trouve qu'entre les deux échantillons de MCHC extrêmes, H_i varie de 8%. Avec notre modèle géométrique ($P_f = \text{Memb} + H_i h_p^2 \Phi_i$), nous estimons la variation d'intensité qui serait due uniquement à une variation de H_i . Nous supposons alors Memb et Φ_i sont identiques pour les trois échantillons et les choisissons égaux à ceux obtenus pour l'échantillon de MCHC= 33 g/dL, soit $\text{Memb} \sim 30/100 \cdot P_f^{33} = 173 \text{ u.a.}$ et $h_p^2 \Phi_i = (P_f^{33} - \text{Memb})/H_i^{33} = 273 \mu\text{m}^{-1}$. En Figure 6.9-(b), nous reportons les distributions d'intensité des trois échantillons en fonction de leur H_i , et les comparons aux estimations d'intensités obtenues en considérant l'effet de la variation de H_i uniquement (points verts). Nous observons clairement que la seule considération de la variation de H_i ne permet pas d'expliquer les variations d'intensité entre échantillons car les points verts ne collent pas aux intensités mesurées. Typiquement, si seul H_i jouait, une variation de H_i de 8% observée ici entraînerait une variation d'intensité de P_f de 6% uniquement. Les variations observées entre échantillons ici sont largement plus grandes, de l'ordre de 125%.

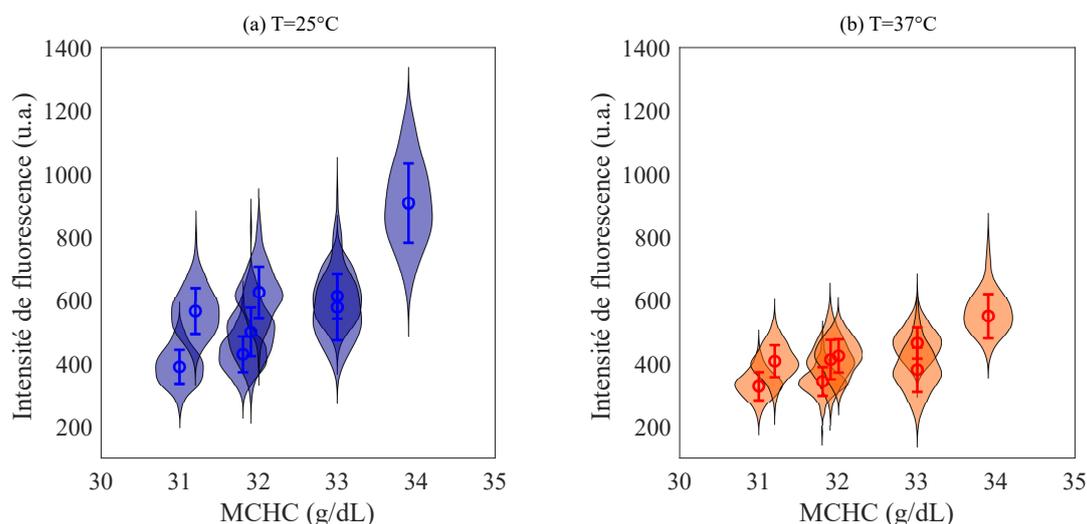


FIGURE 6.8 – **Fluorescence des globules rouges avec la MCHC.** Les distributions d'intensité de fluorescence présentées proviennent de 8 échantillons de donneurs sains et sont ordonnées en fonction de leur MCHC. Pour chaque donneur, environ 300 globules sont imagés. (a) La température est fixée à 25°C . (b) La température est fixée à 37°C . Les distributions sont représentées sous forme de violin plot, et les valeurs moyennes et déviations standards issues du fit gaussien des distributions sont ajoutées. L'intensité moyenne des distributions augmente avec la MCHC aux deux températures étudiées.

Conclusion Nous montrons que le DASPI est sensible à de faibles variations de MCHC entre les donneurs. Son intensité de fluorescence augmente de façon significative lorsque la MCHC augmente, en accord avec une plus grande rigidité des globules. Nous vérifions que ces observations ne sont pas un artefact lié à des variations de hauteur de cellule entre les échantillons. Le DASPI est donc une sonde adaptée à l'étude de variation de rigidité intracellulaire des GRs. Cette étude, associée à celle en température présentée dans la partie précédente, fournissent deux preuves de concept de la sensibilité du DASPI à la rigidité des GRs. Nous attribuons alors le mot nanorhéologie à l'utilisation du DASPI dans les GRs comme sonde de rigidité, et plus largement à notre nouvelle technique.

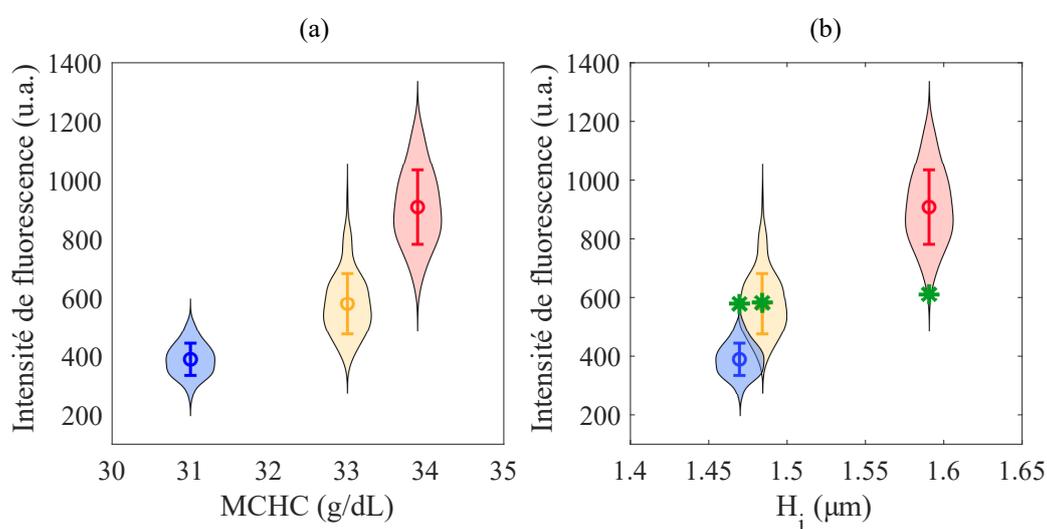


FIGURE 6.9 – **Effet de H_i sur la fluorescence?** Trois des distributions d'intensité représentées sur la Figure 6.8-(a) sont sélectionnées : celle de plus faible intensité (ici en bleu), celle de plus haute (ici en rouge) et une intermédiaire (ici en orange). (a) Les distributions sont présentées en fonction de la MCHC de leur échantillon. (b) Les distributions sont présentées en fonction du H_i moyen des GRs estimé pour chaque échantillon. Les points verts correspondent aux estimations d'intensités obtenues en considérant l'effet de la variation de H_i uniquement.

7

POTENTIELS DE LA NANORHÉOLOGIE

Nous nous intéressons ici aux potentiels de la technique de nanorhéologie comme technique de caractérisation d'échantillons sanguins et de suivi de pathologies érythrocytaires.

7.1	Contexte	91
7.2	Hétérogénéité d'une population de GRs	91
7.3	Couplage morphologie-rigidité de sous-populations	94

7.1 Contexte

Aujourd'hui, la caractérisation des globules rouges d'un échantillon sanguin se fait principalement à l'aide de grandeurs moyennes telles que les indices d'une numération (VGM, MCHC, taux d'hémoglobine, ...), les résultats de tests de fragilité (résistance osmotique) ou de déformabilité (ektacytométrie). La pertinence de ces analyses est cliniquement bien établie. Cependant, il est de plus en plus apparent que les informations disponibles ne suffisent pas à caractériser un échantillon dans sa globalité. Dans le cadre de pathologies notamment, elles ne permettent pas de comprendre tous les facteurs de gravité d'une maladie et l'hétérogénéité des symptômes manifestés. Évaluer les propriétés des globules rouges à l'échelle individuelle, ainsi que l'hétérogénéité de leurs propriétés, fournirait une caractérisation complète d'un échantillon sanguin et pourrait permettre un suivi et pronostic plus complet de certaines pathologies.

Dans ce contexte, nous mettons en avant les potentiels de la technique de nanorhéologie dans l'étude de l'hétérogénéité d'un échantillon sanguin (section 7.2) et dans l'étude de sous-populations de GRs (section 7.3).

7.2 Hétérogénéité d'une population de GRs

Il existe au sein d'une population de GRs, sains ou pathologiques, une hétérogénéité de leurs propriétés notamment marquée par des variations de morphologie (forme et taille), de densité, d'hydratation, de quantité et de type d'Hb. Comme cause, on identifie [144] :

- L'âge des GRs. Leur durée de vie de l'ordre de 120 jours conduit à un renouvellement d'environ 1% des globules chaque jour pour une production de 2 à 3 millions de globules par seconde [145].
- Le processus de formation des GRs dans la moelle osseuse. Celui-ci engendre une hétérogénéité des propriétés des réticulocytes, globules rouges immatures. Les réticulocytes se développent en globules rouges matures après environ 24h de circulation dans le sang [145].

- Des variations de l'environnement à l'échelle d'un individu (altitude, sport, infection...) et à l'échelle de la cellule (hormones, inflammation...).
- Des interventions thérapeutiques telles que la splénectomie (ablation de la rate), la transfusion, l'administration de médicaments.

La nanorhéologie s'est montrée sensible à la rigidité des globules rouges au niveau membranaire et intracellulaire, via le signal de fluorescence du DASPI. Pour un échantillon de GRs, la technique fournit une distribution d'intensité avec une valeur moyenne et une dispersion des données. Nous nous intéressons à la dispersion des données : peut-elle refléter la variabilité des propriétés des GRs, et si oui desquelles ?

Les distributions d'intensité présentées au Chapitre 6, section 6.2 (8 donneurs, mesures réalisées à 25°C et 37°C) sont de nouveau étudiées. Pour chaque distribution, nous mesurons l'hétérogénéité du signal de fluorescence $\Delta I/I$ à partir d'un fit gaussien, il s'agit du rapport entre la déviation standard et la moyenne mesurées. Les résultats sont présentés en Figure 7.1 aux deux températures.

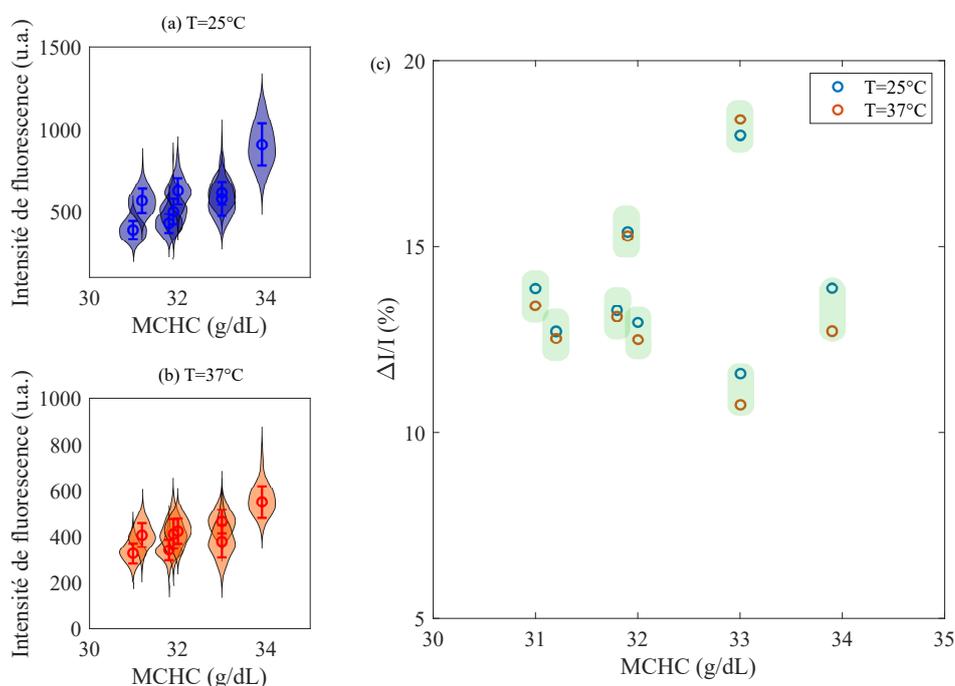


FIGURE 7.1 – **Analyse des hétérogénéités.** (a,b) Distributions d'intensité de fluorescence issues de 8 donneurs à 25°C et 37°C en fonction de leur MCHC. Ces distributions sont déjà présentées en Figure 6.8. On ajoute au violin plot les valeurs moyennes et déviations standards issues du fit gaussien des distributions. (c) Hétérogénéités $\Delta I/I$ mesurées à partir d'un fit gaussien des distributions et présentées en fonction de la MCHC de l'échantillon. Pour un échantillon donné, les valeurs de $\Delta I/I$ sont proches aux deux températures (zones vertes).

Globalement, les valeurs de $\Delta I/I$ sont proches des 15%. En comparaison, dans les solutions d'hémoglobine (Chapitre 4), on trouve une erreur relative associée à la mesure de l'intensité de fluorescence de 7%. Les $\Delta I/I$ trouvés ici sont plus importants que ceux liés à la mesure expérimentale d'intensité de fluorescence, et peuvent donc être attribués à une hétérogénéité du signal entre les GRs de la population étudiée.

Entre les échantillons, on constate que l'hétérogénéité $\Delta I/I$ varie entre 10% et 19%, indépendamment de la température. Ceci est particulièrement marquant si l'on s'intéresse aux deux échantillons à MCHC = 33 g/dL : l'un a un signal largement plus hétérogène que l'autre, quelque soit la

température. Ceci suggère que l'hétérogénéité d'intensité $\Delta I/I$ est intrinsèque à chaque échantillon, indépendante de la température, et non reliée à la valeur de la MCHC de l'échantillon dans la gamme étudiée.

L'hétérogénéité du signal mesuré pourrait-elle alors spécifiquement venir d'une variabilité de concentration interne en hémoglobine entre les GRs? Dans les solutions de protéines où le rotor agit comme une sonde d'environnement via la concentration protéinaire, nous avons montré que l'intensité de fluorescence suit une loi de puissance avec la concentration dans le régime concentré :

$$I = A \cdot c^y \quad (7.1)$$

Supposons une hétérogénéité de concentration $\Delta c/c$ en protéines. Elle induit alors à une hétérogénéité du signal de fluorescence $\Delta I/I$ selon :

$$\frac{\Delta I}{I} \approx y \cdot \frac{\Delta c}{c} \quad (7.2)$$

Cette relation nous dit que l'hétérogénéité du signal de fluorescence $\Delta I/I$ reflète l'hétérogénéité de concentration $\Delta c/c$. En transposant ce résultat à une assemblée de GRs, on apprend que la concentration interne d'hémoglobine des GRs est une des sources d'hétérogénéité du signal de fluorescence qu'il nous faut considérer. Notons que dans nos expériences, les $\Delta I/I$ sont proches aux deux températures. Ceci suggère que y est indépendant de la température, ce qu'il sera intéressant de vérifier dans les solutions de protéines.

D'autres sources d'hétérogénéité du signal sont à envisager. En particulier, la hauteur des globules H_i puisque nous avons estimé au Chapitre 6 qu'une variation $\Delta H_i/H_i$ de l'ordre de 8% entraînait une variation de 6% sur le signal de fluorescence des GRs. Une autre source possible est la variation de concentration interne en DASPI dans les GRs. Celle-ci peut provenir d'une variabilité dans les propriétés de "perméabilité" des membranes. L'intensité de fluorescence étant directement proportionnelle à la concentration en DASPI, la variation du signal due à ce phénomène serait proportionnelle aux variations de concentration interne en DASPI dans les GRs. Nous retenons ici que globalement, l'hétérogénéité du signal mesuré sur un échantillon reflète les variations des propriétés intrinsèques de ses GRs : concentration interne en hémoglobine, hauteur de la cellule, propriétés des membranes. De futures études s'attarderont à étudier plus précisément et à quantifier l'impact de ces différentes sources d'hétérogénéité.

Revenons maintenant sur notre observation du Chapitre 6 qui consistait à mettre en parallèle l'élargissement des distributions d'intensité de la Figure 6.3 à basse température avec celui de la gamme de viscosité de solutions d'hémoglobine de concentration variable (Figure 6.1). Nous comprenons à présent, après nos études du Chapitre 4 sur la réponse du rotor dans les protéines, et avec l'équation 7.2 présentée plus haut, que :

1. La concentration et la viscosité de solutions de protéines sont liées. En revanche, dans ces milieux protéinaires, c'est la concentration qui contrôle la réponse du rotor. C'est donc le paramètre à considérer.
2. Pour interpréter la dispersion des données d'intensité de fluorescence en rapport avec les propriétés intrinsèques des GRs, $\Delta I/I$ est la grandeur pertinente, et non ΔI .

Nous pouvons donc maintenant affiner notre interprétation de la Figure 6.3. En s'intéressant au paramètre $\Delta I/I$, on trouve que celui-ci ne varie pas de manière significative avec la température (non présenté). Ceci est bien cohérent avec le fait que l'hétérogénéité d'intensité $\Delta I/I$ reflète les propriétés intrinsèques des GRs, notamment celles de concentration interne en hémoglobine.

7.3 Couplage morphologie-rigidité de sous-populations

Une des particularités de la nanorhéologie est qu'il est possible de discriminer les GRs selon leur morphologie. Ceci est particulièrement pertinent pour l'étude de pathologies qui présentent des mélanges de GRs sains et de GRs pathologiques aux morphologies spécifiques (drépanocytose ou sphérocytose héréditaire par exemple). Analyser des sous-populations est également intéressant dans l'étude de la conservation de poches de sang. Dans cette partie, nous nous intéressons à cette problématique.

Il est connu que pendant leur conservation, les GRs deviennent moins déformables [146-148] et leur capacité de transport d'oxygène sont réduites [149, 150]. La durée de stockage avant une transfusion peut affecter la mortalité post-transfusionnelle chez des patients gravement malades [151, 152] ou après une chirurgie cardiaque [153-155]. Aujourd'hui, il est autorisé de conserver des GRs pendant une durée de 42 jours avant de les utiliser en transfusion. Afin d'optimiser le rendement transfusionnel, l'étude des modifications des propriétés des GRs liées au stockage, est toujours d'actualité.

Nous étudions à $T=25^{\circ}\text{C}$ deux échantillons de sang pendant 9 jours et analysons les variations de morphologie et d'intensité du signal en nanorhéologie. Pendant les 9 jours, les échantillons de sang total sont conservés à 4°C , et la préparation et l'incubation des GRs est effectuée tous les jours. Ma thèse porte principalement sur le développement et la compréhension de la technique de nanorhéologie. Cette étude a pour but principal de montrer ce dont la nanorhéologie est capable en terme de séparation de populations plutôt que d'apporter une réponse enrichie à la problématique de conservation de poches de sang.

Suivi des morphologies

La Figure 7.2 présente les cartes 2D aire-circularité des deux échantillons après 1, 7 et 9 jours de conservation ainsi que les images en fluorescence correspondantes pour le donneur 1. On identifie sur les cartes 2D, les globules discocytaires (en jaune) et les globules échinocytes (en violet). Avec le temps, on observe à l'image et sur les cartes 2D que la proportion d'échinocytes augmente.

Les pourcentages d'échinocytes et de GRs discocytaires mesurés sur les cartes 2D sont présentés en Figure 7.3 en fonction du temps de conservation. Sur les 4 premiers jours, les deux échantillons évoluent peu en terme de morphologie et les pourcentages des deux populations restent stables. Les échantillons commencent à se dégrader après 4 jours pour atteindre presque 60% d'échinocytes au jour 9. On observe que vieillissement du sang lors de sa conservation se déroule différemment chez les deux donneurs : le quadrant vert, associé aux petits globules ou sphérocytes, se remplit avec le temps chez le donneur 2, alors que ce n'est pas le cas chez le donneur 1. Dans le quadrant violet, associé aux échinocytes, les données semblent plus dispersées chez le donneur 1 que chez le donneur 2.

Ces cartes 2D obtenues grâce à la nanorhéologie permettent donc de visualiser et d'étudier les géométries présentes dans un échantillon, elles sont adaptées à la caractérisation d'une population de GRs présentant une hétérogénéité de morphologies.

Suivi du signal du DASPI

Les distributions d'intensité des deux sous-populations (discocytaires et échinocytes) sont tracées en fonction du temps de conservation en Figure 7.4. Les échinocytes apparaissent toujours légèrement plus fluorescents que les GRs discocytaires, en accord avec une augmentation de rigidité de ces derniers. Cependant, les intensités moyennes ne montrent pas de tendance particulière avec le temps de conservation. En particulier, l'intensité des GRs discocytaires reste stable dans

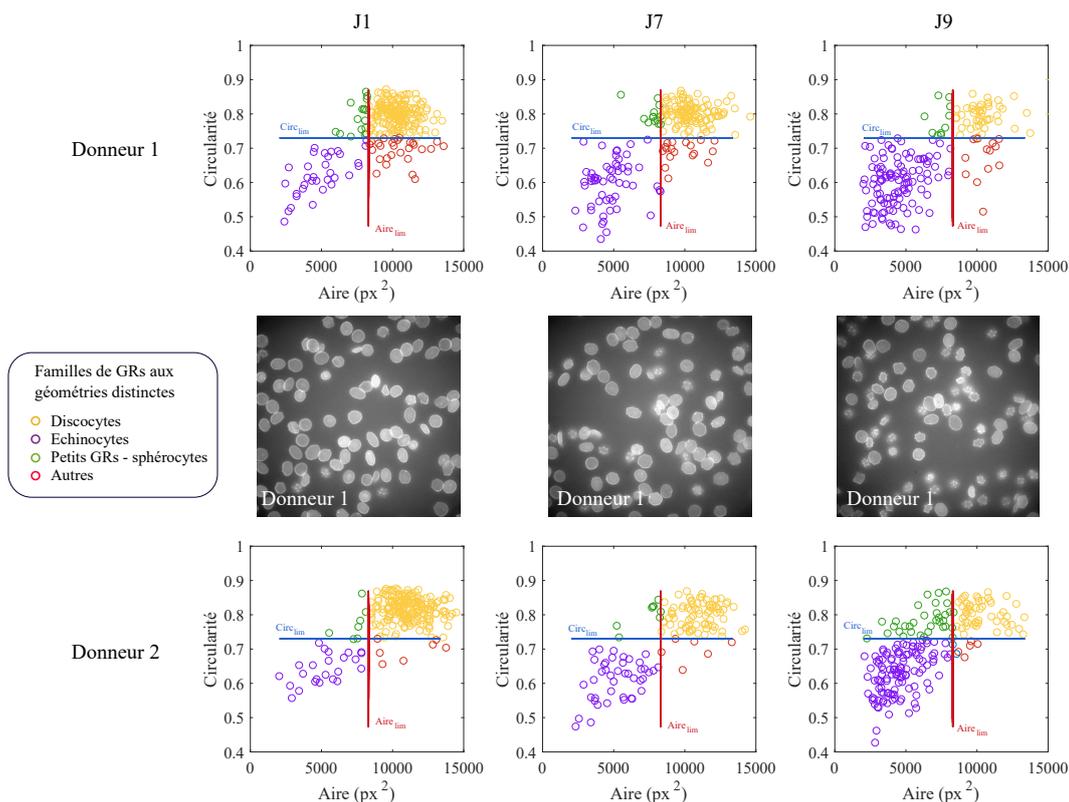


FIGURE 7.2 – **Morphologie des GRs pendant la conservation du sang.** Cartes 2D aire-circularité de deux donneurs pour des temps de conservation de 1, 7 et 9 jours. Nous nous intéressons particulièrement dans cette étude au quadrant violet, correspondant aux échinocytes, et au quadrant jaune, correspondant aux GRs discocytaires. Des images en fluorescences du donneur 1 sont également présentées.

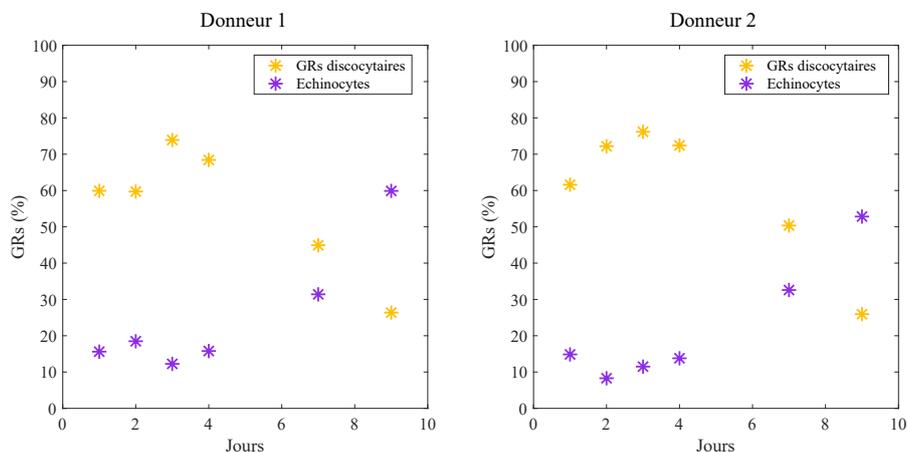


FIGURE 7.3 – **Quantification des sous-populations.** Pour les deux donneurs, les pourcentages de GRs discocytaires (jaune) et d'échinocytes (violet) sont représentés en fonction du temps de conservation de l'échantillon sanguin.

le temps, ce qui suggère qu'ils ont une rigidité constante, ou une MCHC stable, avant transformation en échinocytes. Ces résultats sont en accord avec une étude récente (Park 2016 [156]), qui observe très peu de variations de MCHC avec la conservation mais principalement des variations de morphologie des GRs.

La nanorhéologie permet donc d'analyser des sous-populations de GRs sélectionnées selon

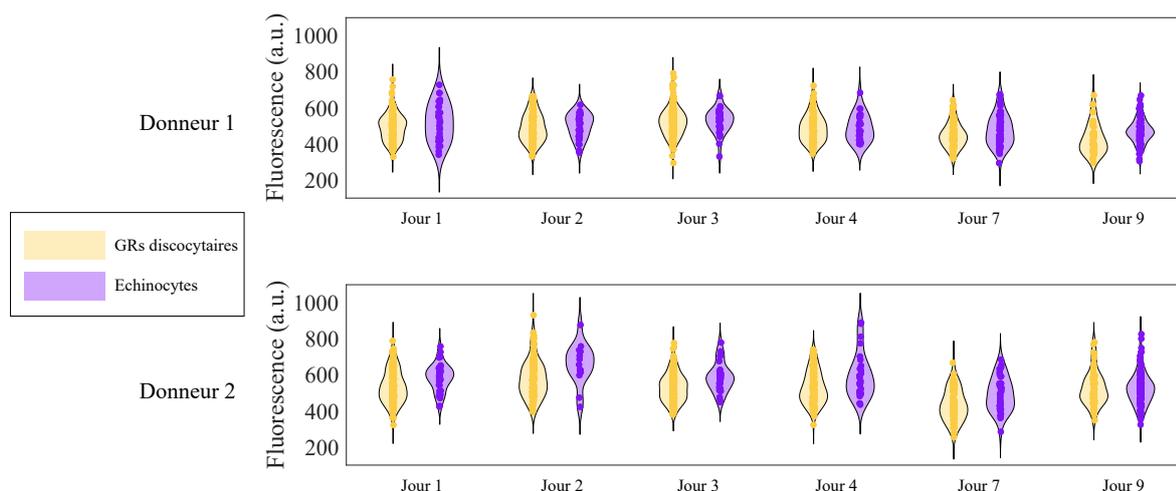


FIGURE 7.4 – **Signal du DASPI des sous-populations.** Pour les deux donneurs, les distributions d’intensité des sous-populations de GRs discocytaires (jaune) et d’échinocytes (violet) sont représentés en fonction du temps de conservation de l’échantillon sanguin.

leur morphologie. Si les variations d’intensité observées ici entre sous-populations sont faibles, cette technique peut s’avérer particulièrement intéressante dans le cadre de pathologies érythrocytaires (Chapitre 9).

8

ÉTUDE COMPARATIVE NANORHÉOLOGIE ET EKTACYTOMÉTRIE

Dans ce chapitre nous étudions la pertinence de la nanorhéologie en la comparant à l'ektacytométrie, la technique de référence des pathologies érythrocytaires.

8.1	Contexte	97
8.2	Comparaison des techniques	98
8.2.1	Réponse à la température	98
8.2.2	Réponse à la MCHC	99
8.2.3	Réponse à la présence de GRs rigides	102
8.3	Perspectives	104

8.1 Contexte

Au cours de ma thèse, nous avons débuté une collaboration avec le laboratoire BIGR de l'INSERM (<https://u-paris.fr/sdv/biologie-integree-du-globule-rouge/>), spécialistes des pathologies du globule rouge. Dans le cadre de cette collaboration, et du projet de pré-maturation SINAY (B. ABOU, PI) nous menons une étude comparative entre la nanorhéologie et l'ektacytométrie, technique de référence de mesure de déformabilité des GRs. Dans ce chapitre, je présente les premiers résultats que j'ai obtenu en collaboration avec Mickaël Marin, responsable de la plateforme d'ektacytométrie au BIGR. La suite du projet SINAY sera menée par Intesaaf Ashraf, nouveau post-doctorant au laboratoire MSC.

Dans le Chapitre 6, nous avons présenté deux preuves de concept de la sensibilité de la nanorhéologie à la rigidité des globules : rigidification par température et entre donneurs de MCHC différentes. Ici nous reproduisons ces expériences et analysons systématiquement des échantillons de sang avec les deux techniques dans les mêmes conditions. Nous étudions également la sensibilité des deux techniques à la présence de globules rigides dans un échantillon de globules rouges sains. Ces expériences permettent d'évaluer la pertinence de la technique de nanorhéologie par rapport à la technique de référence.

Nous utilisons un ektacytomètre Lorrca Maxsis (RR Mechatronics). Les globules rouges sont suspendus dans une solution visqueuse isotonique (Elon ISO, solution de polyvinylpyrrolidone) et exposés à une contrainte de cisaillement qui provoque leur déformation. Le motif de diffraction issu du passage d'un faisceau laser à travers l'échantillon est analysé par le logiciel du Lorrca. Il fournit alors un indice d'élongation, EI, représentatif de la déformabilité moyenne de la population de GRs, comme expliqué au Chapitre 1. Les mesures sont faites pour des contraintes allant de 0,3 à 50 Pa. La température de l'échantillon est contrôlée par l'appareil, on la choisit entre 25°C et 43°C.

8.2 Comparaison des techniques

8.2.1 Réponse à la température

En ektacytométrie, on compare classiquement la courbe de déformabilité de l'échantillon d'intérêt, EI en fonction de la contrainte, à celle d'un témoin. Lorsque le sang étudié est pathologique, le témoin est un échantillon de sang sain. Lorsque le sang étudié est sain, le témoin est généralement un échantillon de globules rigides. Dans notre cas, nous utilisons des sphérocytes comme témoins. Ils sont obtenus par traitement thermique en plaçant des GRs sains dans un récipient en verre au bain marie à 55°C pendant 10 mn. Les sphérocytes apparaissent sphériques et sont très peu déformables.

Nous étudions trois échantillons de sang sain avec les deux techniques en variant la température. En nanorhéologie, les mesures sont faites à 25°C et 37°C. En ektacytométrie, les mesures sont faites sur une large gamme de température, à 25°C, 30°C, 37°C et 43°C, de manière à déterminer la sensibilité de l'appareil à de telles variations. Les sphérocytes témoins, après leur traitement à 55°C, sont étudiés à 37°C. La Figure 8.1 présente les résultats obtenus avec les deux techniques pour le sang issu d'un des donneur et sont représentatifs de ce qui a été observé pour les trois donneurs. Nous présentons les réponses mesurées à 25°C et 37°C ainsi que celles des sphérocytes témoins.

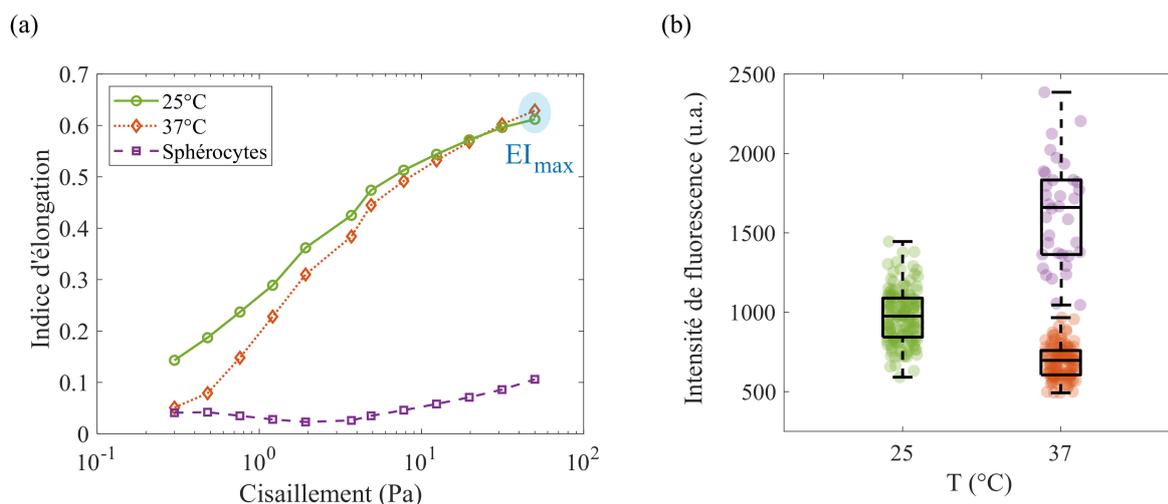


FIGURE 8.1 – **Réponse à la température.** (a) Courbes d'ektacytométrie. (b) Distributions d'intensité en nanorhéologie. Des échantillons de GRs sains sont étudiés à 25°C (vert) et 37°C (orange). Des sphérocytes témoins sont étudiés à 37°C (violet). Les courbes présentées sont celles d'un unique donneur, elles sont représentatives de ce qui a été observé chez les trois donneurs étudiés.

En ektacytométrie, la courbe témoin des sphérocytes montre un indice d'élongation faible qui varie peu avec la contrainte, en accord avec leur caractère quasi-indéformable. Pour les GRs sains, aux deux températures, les courbes de déformabilité se distinguent de cette courbe témoin. L'indice d'élongation EI augmente avec la contrainte, ce qui signifie que les GRs s'allongent et se déforment sous cisaillement. On s'intéresse maintenant à l'indice d'élongation maximal EI_{max} mesuré à contrainte maximale de 50 Pa. On observe que EI_{max} augmente avec la température comme le montre plus précisément la Figure 8.2 où ses valeurs sont présentées à toutes les températures étudiées pour les trois donneurs. Cette augmentation de EI_{max} s'interprète comme une augmentation de la déformabilité des GRs en accord avec la diminution de rigidité de membrane et de viscosité intracellulaire attendue avec la température [55-58, 141]. En nanorhéologie, on retrouve une diminution de l'intensité de fluorescence chez les GRs sains avec la température, cohérente

avec la diminution de leur rigidité. Pour les sphérocytes témoins à 37°C, l'intensité est plus élevée que celle des GRs à la même température, en accord avec leur rigidité plus importante.

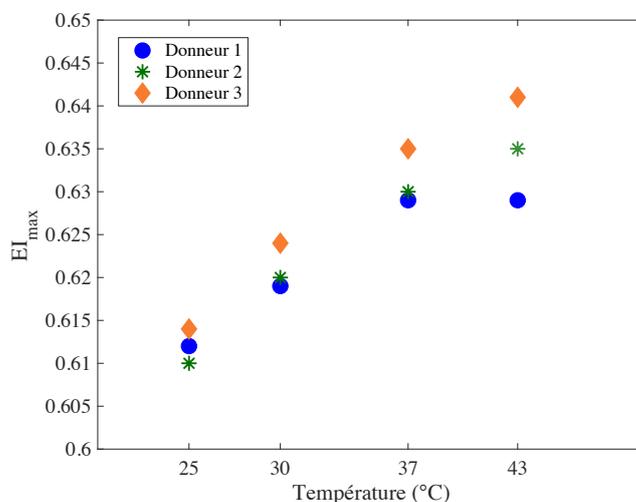


FIGURE 8.2 – **EI_{max} et température.** L'indice d'élongation maximal EI_{max}, mesuré en ektacytométrie à la contrainte maximale de 50 Pa, augmente avec la température pour les trois donneurs.

Conclusion Nos expériences montrent que les deux techniques détectent des variations de rigidité induites par la température avec, entre 25°C et 37°C, une augmentation de EI_{max} de l'ordre de 3% en ektacytométrie et une variation d'intensité de fluorescence de l'ordre de 30% en nanorhéologie. La nanorhéologie se montre donc plus sensible à une rigidification des GRs sains par contrôle de température. Cependant, ces deux techniques sondent le système de façon différente. L'ektacytométrie mesure la relation contrainte - déformation des GRs sous cisaillement, c'est une méthode active et populationnelle. Ainsi l'allure de la courbe de déformabilité des sphérocytes très peu déformables est bien distincte de celle des GRs sains discocytaires déformables. La nanorhéologie mesure un signal de fluorescence que nous interprétons comme un niveau de rigidité, sans application de contrainte extérieure. C'est une méthode passive. Ici, on observe que la seule information de l'intensité de fluorescence ne permet pas de distinguer de façon non ambiguë les sphérocytes de GRs discocytaires. Nous apprenons que les sphérocytes sont plus fluorescents donc plus rigides, la nanorhéologie permettra une analyse précise et complète en couplant les données liées à l'intensité à celles des morphologies au niveau cellulaire.

8.2.2 Réponse à la MCHC

Nous étudions les réponses en nanorhéologie et ektacytométrie de quatre échantillons provenant de donneurs sains aux MCHC comprises entre 31 g/dL et 33 g/dL. Les mesures sont réalisées à 37°C et les résultats présentés en Figure 8.3.

En ektacytométrie, les courbes de déformabilité des différents donneurs sont semblables et les EI_{max} quasiment identiques. En nanorhéologie, l'intensité de fluorescence augmente avec la MCHC, comme observé au Chapitre 6. La nanorhéologie se montre donc sensible à une rigidification intracellulaire pilotée par la MCHC que l'ektacytométrie ne détecte pas. Bien que seulement quatre échantillons soient étudiés ici, les résultats en nanorhéologie sont prometteurs. La statistique de cette expérience sera complétée dans le cadre du projet SINAY.

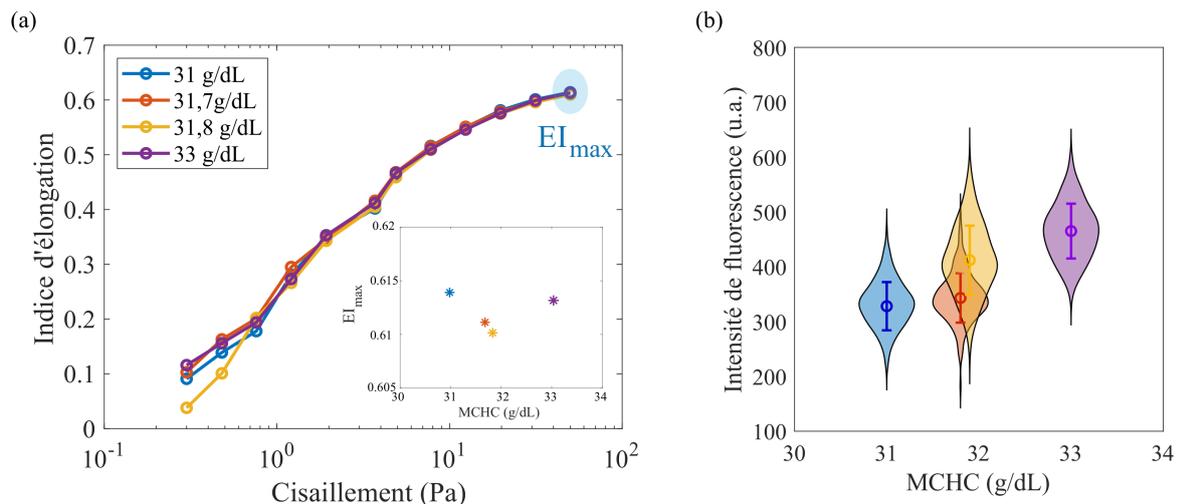


FIGURE 8.3 – **Réponse à la MCHC.** (a) Courbes d'ektactométrie. En insert sont présentées les valeurs de EI_{max} avec la MCHC. (b) Distributions d'intensité en nanorhéologie pour 4 échantillons de GRs sains. Les mesures sont réalisées à 37°C.

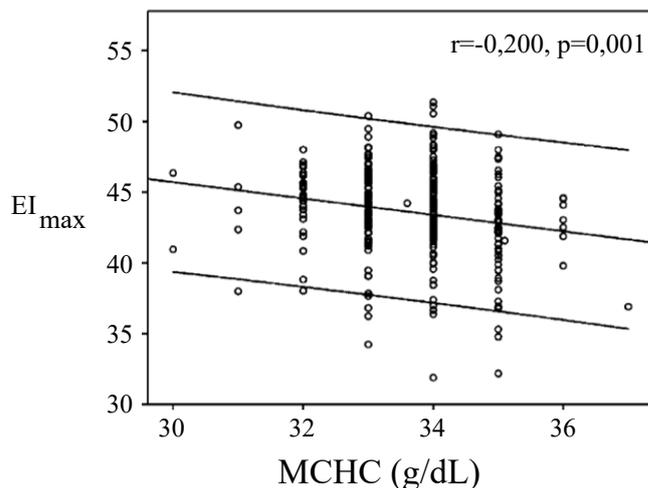


FIGURE 8.4 – **Corrélation entre EI_{max} et la MCHC en ektactométrie.** Résultats de von Tempelhoff et al. [15]. Environ 300 échantillons de GRs sains sont étudiés et la valeur de EI_{max} mesurée en ektactométrie est tracée en fonction de la MCHC. Une corrélation négative entre EI_{max} et la MCHC est alors trouvée avec $r = -0,2$ et $p = 0,01$. Figure adaptée de [15].

Comparaison avec la littérature Nous trouvons dans la littérature une étude de von Tempelhoff et al. [15] qui s'intéresse de manière quantitative (~ 300 échantillons) à l'effet de la MCHC sur la valeur de EI_{max} mesurée en ektactométrie. Ils trouvent une corrélation négative entre EI_{max} et la MCHC (Figure 8.4), en accord avec une baisse de déformabilité pour des MCHC – et donc des viscosités intracellulaires – croissantes. Ces résultats sont associés à un indice de corrélation de Pearson r caractérisant la force de la corrélation et une p-value caractérisant sa significativité statistique.

La lecture de cet article m'a donné envie de caractériser de la même façon la corrélation entre intensité du DASPI et MCHC pour la technique de nanorhéologie. Sur la Figure 8.5 nous montrons sous forme de nuage de points nos résultats présentés au Chapitre 6 pour 8 donneurs de MCHC variable, et à deux températures. Chaque point représente un globule dont l'intensité de fluorescence est associée à la MCHC moyenne de son échantillon. Aux deux températures nous

déterminons les coefficients r et p associés aux corrélations et, sur la Figure 8.6, les comparons aux valeurs de l'étude de von Tempelhoff pour l'ektacytométrie. Les r obtenus en nanorhéologie correspondent à des corrélations "modérées". Le r obtenu en ektacytométrie (von Tempelhoff et al.) correspond à une corrélation "faible". La nanorhéologie semble donc sonder de manière plus quantitative la MCHC que l'ektacytométrie, en accord avec les observations de la Figure 8.3. Les p obtenus en nanorhéologie sont plus faibles que celui obtenu par von Tempelhoff et al., ce qui suggère que la corrélation est plus significative. La comparaison des p-value est en réalité à interpréter avec prudence car notre échantillon statistique comprend ~ 2400 globules (300 par échantillons) alors que celui de von Tempelhoff comprend environ 300 échantillons.

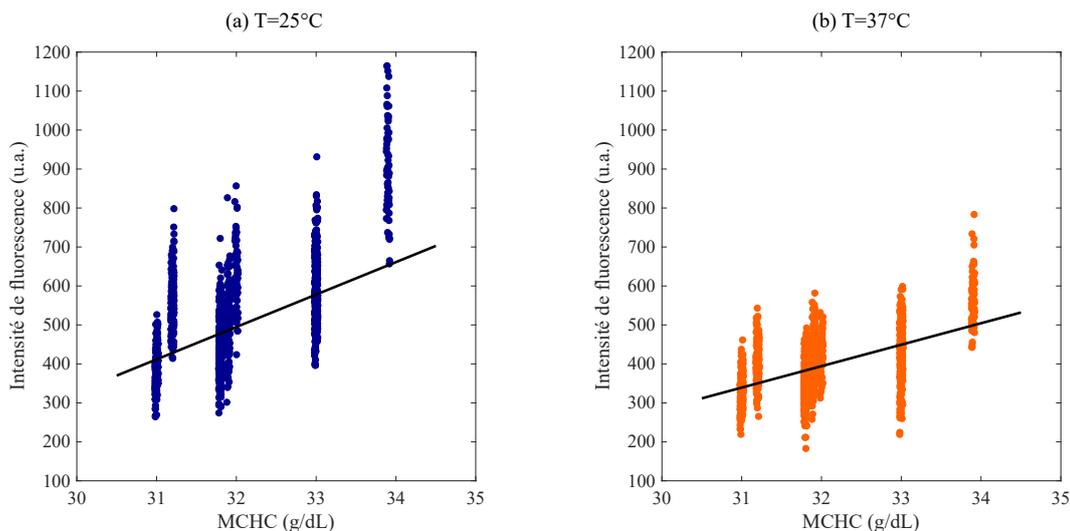


FIGURE 8.5 – **Corrélation entre l'intensité de fluorescence et la MCHC en nanorhéologie.** Les distributions d'intensité mesurées chez 8 donneurs à (a) 25°C et (b) 37°C sont présentées sous forme de nuage de points, en fonction de la MCHC. Les corrélations linéaires intensité-MCHC trouvées sont représentées par les lignes noires continues. On trouve $r = 0,70$, $p = 5 \cdot 10^{-131}$ à 25°C et $r = 0,69$, $p = 3 \cdot 10^{-132}$ à 37°C.

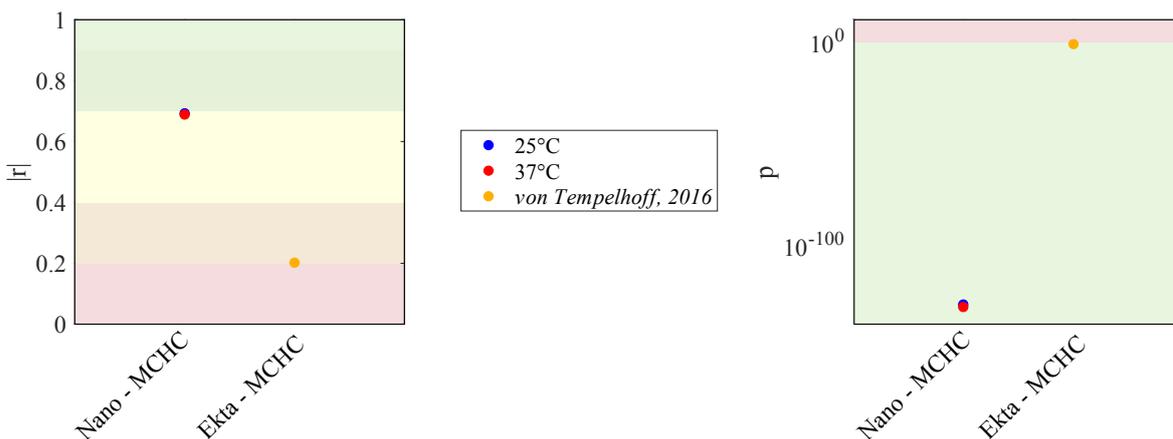


FIGURE 8.6 – **Comparaison des corrélations des deux techniques.** Norme du coefficient de corrélation linéaire $|r|$ et p-value obtenus en nanorhéologie (dans nos expériences, points bleus à 25°C, points rouges à 37°C) et en ektacytométrie (dans les expériences de von Tempelhoff et al. [15], points jaunes). (a) Force de la corrélation "négligeable" (zone rouge), "faible" (zone orange), "modérée" (zone jaune), "forte" et "très forte" (zones vertes). (b) Significativité statistique de la corrélation : "non significatif" (zone rouge), "significatif" (zone verte). En nanorhéologie, la corrélation intensité-MCHC est plus forte et plus significative que celle EI-MCHC trouvée en ektacytométrie.

Conclusion Nos expériences montrent sur un échantillon de quatre donneurs que la nanorhéologie est sensible à une rigidification des GRs via la MCHC que l'ektacytométrie ne détecte pas dans ces conditions. Pour confirmer cette tendance, la statistique de ces expériences sera augmentée au cours du projet SINAY. L'étude de von Tempelhoff montre, sur un grand échantillon statistique, que l'ektacytométrie est sensible à la MCHC car une diminution de EI_{\max} – et donc une diminution de la déformabilité du globule – est trouvée quand la MCHC augmente. Nous montrons que la corrélation reliant le signal du DASPI à la MCHC mesurée en nanorhéologie est plus forte que celle reliant EI_{\max} à la MCHC obtenue par von Tempelhoff en ektacytométrie. Ceci suggère que la sensibilité au paramètre MCHC est meilleure en nanorhéologie qu'en ektacytométrie.

8.2.3 Réponse à la présence de GRs rigides

Dans cette expérience, nous étudions parallèlement en nanorhéologie et en ektacytométrie des mélanges de globules sains et de sphérocytes rigides obtenus à partir du même échantillon sanguin. Nous étudions différents mélanges avec les pourcentages de sphérocytes suivants : 0-1-5-10-20-50-100 %. La Figure 8.7 présente une image en nanorhéologie d'un mélange contenant 50% de sphérocytes et 50% de GRs sains. Nous distinguons nettement les sphérocytes par leur petite taille et leur forte fluorescence. Les mesures sont faites à 37°C avec les deux techniques et les résultats sont présentés en Figure 8.8.

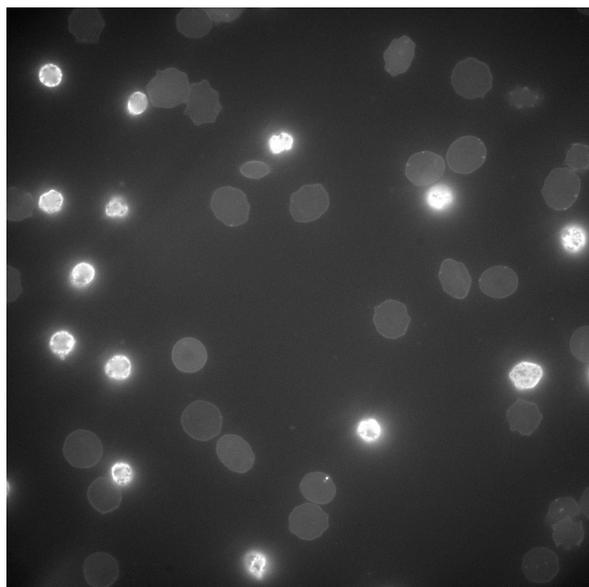


FIGURE 8.7 – **Mélange de sphérocytes et GRs sains.** Image en fluorescence d'un mélange composé de 50% de GRs sains et 50 % de sphérocytes. Les sphérocytes sont plus petits et beaucoup plus fluorescents que les GRs sains.

En ektacytométrie, les courbes de déformabilité s'abaissent quand le pourcentage de sphérocyte dans le mélange augmente. Ceci est en accord avec une diminution de la déformabilité moyenne des GRs du mélange. On remarque que l'ektacytométrie ne permet pas de distinguer clairement les mélanges inférieurs à 5% de sphérocytes car les courbes de déformabilité sont semblables. En nanorhéologie, les distributions de GRs sains (0% de sphérocyte) et de sphérocytes (100%) sont gaussiennes et disjointes. En comparaison aux GRs sains, les sphérocytes sont plus fluorescents. Dans les mélanges, les distributions ne sont plus gaussiennes, avec l'apparition de points à haute intensité. On peut retrouver le pourcentage de sphérocytes du mélange en quantifiant le nombre de points de haute intensité (Figure 8.9).

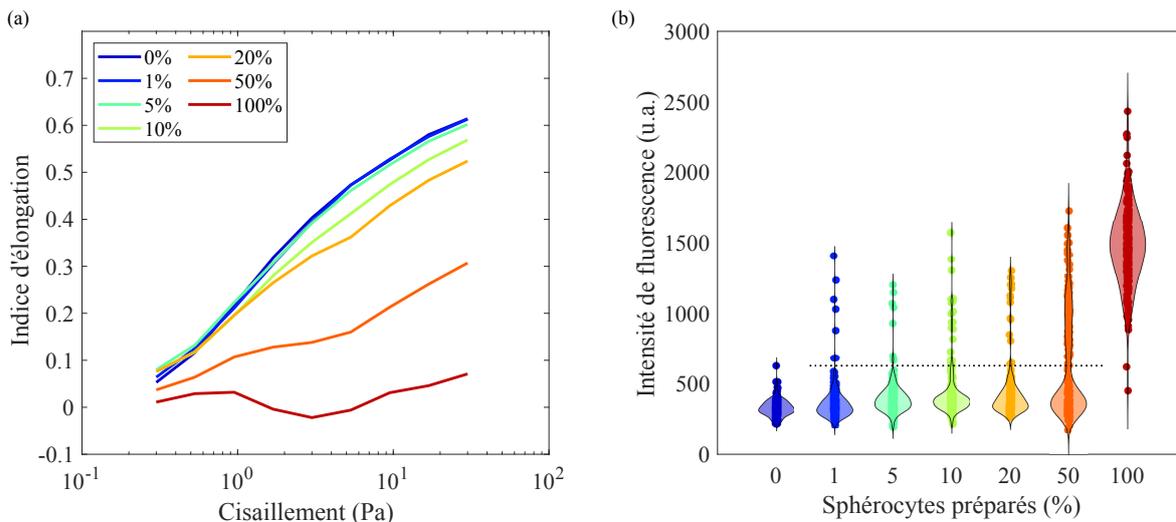


FIGURE 8.8 – **Réponse à la présence de GRs rigides.** (a) Courbes d'ektacytométrie et (b) distributions d'intensité en nanorhéologie de mélanges de GRs sains et sphérocytes. Les pourcentages de sphérocytes des mélanges sont fixés à 0, 1, 5, 10, 20, 50 et 100%. Sur la sous-figure (b), la ligne pointillée distingue, dans le cas des mélanges à 1, 5, 10, 20 et 50% de sphérocytes, les points de haute intensité des autres.

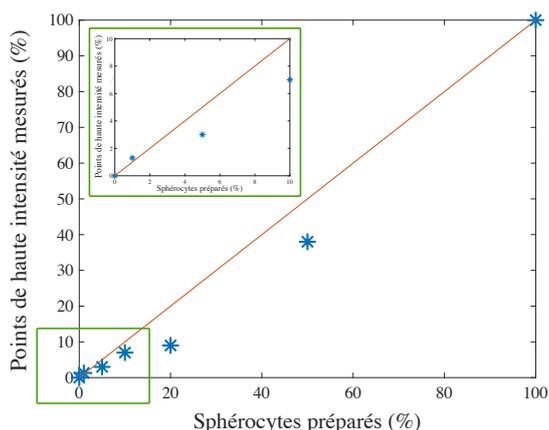


FIGURE 8.9 – **Quantification des points de haute intensité en nanorhéologie.** Pour chacune des distributions présentées en Figure 8.8, nous mesurons la proportion de points à haute intensité et la reportons en fonction du pourcentage de sphérocytes préparés dans le mélange. La ligne continue correspond à la fonction $y = x$. En insert on trouve un zoom dans la gamme 0-10%. Le pourcentage mesuré est toujours légèrement plus faible que celui préparé mais on trouve tout de même une bonne corrélation entre les deux quantités.

Conclusion Cette expérience permet de comparer la sensibilité des deux techniques à la présence de GRs rigides au sein d'un échantillon de GRs sains. En nanorhéologie, la distribution d'intensité d'un échantillon sain se distingue de celle d'un mélange présentant seulement 1% de sphérocytes, de par l'apparition de points à haute intensité. L'ektacytométrie ne permet pas dans ces expériences de distinguer clairement les mélanges de 0% à 5% de sphérocytes, tendance qu'il faudra confirmer. La nanorhéologie se montre donc plus adaptée à la caractérisation de mélanges de GRs que l'ektacytométrie. On note que l'étude marche particulièrement bien dans ce cas modèle où les sphérocytes sont très fluorescents. Il sera pertinent d'étudier des échantillons de GRs pathologiques dont une population de globules rouges altérés se distinguerait des globules sains par la réponse du DASPI.

8.3 Perspectives

Cette étude comparative montre que les deux techniques permettent de caractériser les propriétés rhéologiques des GRs, l'une sous cisaillement, l'autre sans application de contrainte externe. Plus particulièrement, l'ektacytométrie, opérant à contrainte élevée, fournit une mesure moyenne sur la population cellulaire et sonde certainement des domaines de déformation non-linéaire, ce qui n'est pas le cas de la nanorhéologie.

En variant la rigidité des GRs par température ou MCHC, on montre que la variation du signal mesuré en nanorhéologie est plus importante que la variation de l'indice d'élongation maximal mesuré en ektacytométrie. Pour les mélanges de sphérocytes et de GRs sains, la nanorhéologie présente l'avantage de distinguer de manière plus précise des mélanges de différentes proportions, notamment en identifiant des sous-populations. En comparaison à l'ektacytométrie, qui sonde la déformabilité moyenne d'une population de GRs, la nanorhéologie propose une analyse au niveau cellulaire qui permet de coupler le signal de fluorescence des GRs – lié à leur rigidité – à leur morphologie. En cela, la technique de nanorhéologie fournit des informations complémentaires et sera particulièrement intéressante pour l'étude de sang pathologique intrinsèquement hétérogène.

Ces expériences ouvrent la voie du projet SINAY. La statistique des expériences présentées ici sera augmentée. Nous approfondirons la compréhension des techniques en distinguant les sources de rigidité d'un GR (membrane, cytosol, morphologie). Par exemple, nous nous intéresserons à des GRs rigidifiés chimiquement dont la morphologie ne change pas (contrairement aux sphérocytes) et nous rigidifierons de manière ciblée les membranes de GRs sains sans toucher au cytosol. La nanorhéologie sera alors comparée à l'ektacytométrie Osmoscan qui mesure la déformabilité dans des solutions d'osmolarité variable et qui a déjà prouvé son efficacité sur la question des paramètres impactant la rigidité érythrocytaire [157].

9

ROTORS MOLÉCULAIRES ET GLOBULES ROUGES DRÉPANOCYTAIRES

Nous étudions ici des globules rouges drépanocytaires et identifions des indicateurs de la pathologie avec la nanorhéologie qui pourraient compléter les suivis cliniques actuels.

9.1	Contexte	105
9.2	Échantillons drépanocytaires en nanorhéologie	107
9.2.1	Observations en conditions oxygénées	107
9.2.2	Observations en conditions désoxygénées	111
9.2.3	Sensibilité du DASPI à la MCHC	114
9.3	Indicateurs nanorhéologiques et perspectives	115

9.1 Contexte

Comme évoqué au Chapitre 1, la drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente dans le monde. Elle est considérée comme une priorité de santé publique avec environ 300 000 nouveaux nés par an [158]. La pathologie est causée par une mutation du gène codant pour la β -globine, une des quatre sous-unités protéiques de l'hémoglobine, conduisant à la production d'une hémoglobine anormale dénommée HbS. Sous désoxygénation, les molécules d'HbS polymérisent formant ainsi des fibres qui conduisent à la rigidification des globules et à leur déformation, notamment en forme de faucille. Ce phénomène est réversible, les cycles de transformation peuvent endommager de façon non réversible les GRs, ou conduire à leur lyse.

L'HbS coexiste avec de l'hémoglobine foetale l'HbF. Alors que l'HbF existe à l'état de trace chez les individus sains (< 1%), elle est présente en plus grande quantité chez les drépanocytaires, typiquement entre 5% et 35%. Elle permet d'inhiber partiellement la falciformation en s'intercalant dans les polymères d'HbS [159, 160]. Si la cause génétique de la drépanocytose est unique, sa manifestation clinique peut toutefois s'exprimer de manière variable. En effet, plusieurs types de drépanocytose peuvent être décrites selon les associations alléliques du patient. Dans le cas d'une homozygotie (nommée SS), la drépanocytose s'exprime fortement, et est souvent responsable des cas les plus graves. Dans le cas plus complexe d'une hétérozygotie, cette mutation peut rester asymptomatique si l'autre allèle est normal (sujet AS). Dans le cas d'une association entre l'allèle S et d'autres désordres de l'hémoglobine (β -thalassémies, HbC par exemple), l'expression du syndrome drépanocytaire peut devenir extrêmement variable. La Figure 9.1 met en évidence la variabilité des caractéristiques biologiques des globules rouges associées à ces différents types de drépanocytose.

	Hb (g/dl)	VGM (fl)	réticulocytes	Morphologie érythrocytaire	Étude de l'Hb			
					HbA (%)	HbS (%)	HbF (%)	HbA ₂ (%)
AS	N	N*	N	N	60-65	35-40*	< 1	v
SS	6-10	N*	↑	Drépanocytes (+ à +++) Cellules cibles (+) Corps de Jolly (±)	0	80-95	5-20	v
SC	10-12	↓ (70-90)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (50 %) Poikilocytose	0	50 (HbC = 45)	1-7	v
S/β ⁺ -thalassémie	9-12	↓ (65-95)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poikilocytose	1-25	55-90	5-15	v
S/β ⁰ -thalassémie	7-11	↓ (60-80)	↑	Drépanocytes (+) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poikilocytose	0	80-90	5-15	v
S/PHHF	N	N*	N	Cellules cibles (±) Microcytes (±)	0	≥ 70	15-35	v

VGM : volume globulaire moyen ; N : normal.

* : valeur abaissée en cas d'α-thalassémie associée.

v : variable car le dosage de l'HbA₂ est ininterprétable en raison d'une contamination par de l'HbS.

FIGURE 9.1 – Caractéristiques biologiques des différentes formes génétiques associées à la drépanocytose. Source : <https://www.lab-cerba.com/files/live/sites/Cerba/files/documents/FR/0273F.pdf>.

Les principales manifestations cliniques de la maladie sont les crises vaso-occlusives, les syndromes thoraciques aigus, les infections et les accidents vasculaires cérébraux [161]. Malgré d'importants progrès dans la compréhension de la maladie, les options thérapeutiques disponibles sont faibles. La transfusion est couramment utilisée, et le seul médicament administré couramment depuis plus de 30 ans, dans le but de prévenir la survenue de crises vaso-occlusives, est l'hydroxyurée. Ce médicament permet d'augmenter le taux d'HbF et ainsi diminuer la polymérisation de l'HbS. Cependant, il existe une variabilité de l'effet de l'hydroxyurée entre les individus et des effets secondaires non négligeables, notamment sur une baisse réversible de fertilité masculine [162]. De plus, la crise vaso-occlusive douloureuse est largement imprévisible. Aucun test ne permet d'anticiper de manière fiable la survenue de la crise : ni en cas de douleur ni en cas d'état clinique stable. Les indicateurs de gravité actuels reposent sur le dosage de l'HbS et de l'HbF, la numération des réticulocytes, les taux de bilirubine (pigment produit suite à la destruction des globules rouges), les taux de LDH (enzyme marqueur de l'hémolyse), le nombre de cellules F (globules présentant majoritairement de l'HbF dans leur cytosol) et le nombre de GRs denses (MCHC > 41 g/dL [163]). Aujourd'hui, ces indicateurs ne sont pas suffisants pour une prise en charge clinique satisfaisante.

La mesure de déformabilité des GRs est particulièrement intéressante pour le diagnostic et le suivi de la maladie [164, 165]. Récemment, l'ektacytométrie à gradient d'oxygène – Oxygenscan – a notamment montré des résultats intéressants sur l'étude de la drépanocytose et de ses traitements [163, 166]. La technique consiste à mesurer l'indice d'élongation de l'échantillon à contrainte fixée, en faisant varier le niveau d'oxygène. Une courbe typique au cours d'un cycle de désoxygénation et ré-oxygénation est présentée en Figure 9.2. On identifie trois paramètres intéressants :

- El_{max} , l'indice d'élongation des GRs oxygénés.
- Le seuil PoS (Point of Sickling), qui correspond à la pression partielle en oxygène pour laquelle l'indice d'élongation vaut 95% de la valeur d' El_{max} . En dessous de ce seuil, l'indice d'élongation diminue fortement, reflétant ainsi la sensibilité de l'échantillon à la pression en oxygène et la polymérisation de l'HbS.
- El_{min} , l'indice d'élongation des GRs désoxygénés à la pression d'oxygène minimale.

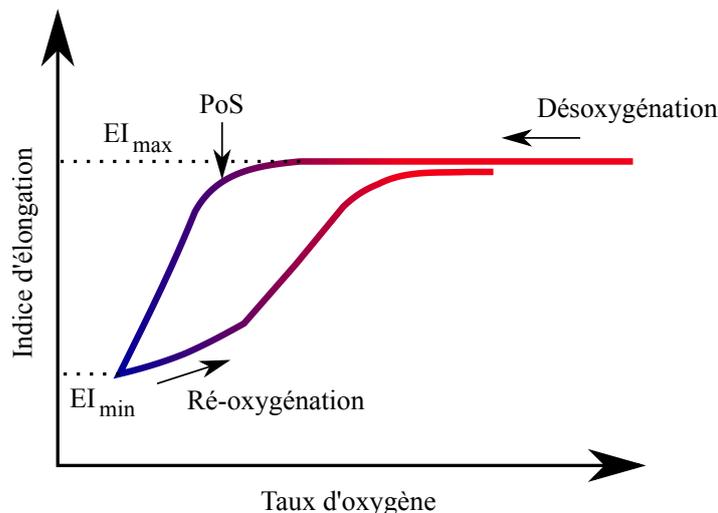


FIGURE 9.2 – **Oxygenscan.** Courbe typique d'ektacytométrie Oxygenscan pour un échantillon de sang drépanocytaire. Nous identifions les paramètres EI_{\max} , EI_{\min} et PoS. Figure adaptée de [166].

Sous ré-oxygénation, la courbe de l'indice d'élongation remonte à une valeur souvent proche de la valeur initiale, indiquant une re-solubilisation des protéines HbS. S'il remonte à une valeur plus basse que celle initiale, ceci peut révéler la présence de globules rouges irrémédiablement falciformés. Rab et al. ont montré que l'administration d'hydroxyurée et la transfusion sanguine augmentaient EI_{\max} et EI_{\min} et diminuaient la PoS [166]. Ceci indique que ces thérapies sont efficaces pour améliorer la déformabilité des GRs, en conditions oxygénées et désoxygénées. Sadaf et al. ont montré que EI_{\max} , EI_{\min} et PoS étaient corrélés avec des biomarqueurs de la gravité de la drépanocytose, tels que le taux d'HbF, le nombre de cellules F ou le nombre de GR denses [163].

Dans ce contexte, nous étudions la pertinence de la nanorhéologie comme nouvel outil de caractérisation d'échantillons drépanocytaires et proposons des nouveaux indicateurs propres à la pathologie. Cette étude se déroule dans le cadre de notre collaboration avec le laboratoire BGR et l'hôpital Necker. Les expériences que je présente sont exploratoires et bâtissent le socle de travaux futurs où nous chercherons à corréliser ces indicateurs aux biomarqueurs de gravité de la maladie actuels, et à des mesures d'ektacytométrie.

9.2 Échantillons drépanocytaires en nanorhéologie

Pour ces premières expériences sur les GRs drépanocytaires, j'ai disposé de 5 échantillons provenant d'enfants âgés entre 4 et 17 ans de phénotype SS, avec lesquels j'ai testé les différents aspects présentés ci-dessous. En conditions oxygénées – conditions normales d'observation des GRs, on identifie avec la nanorhéologie des éléments caractéristiques des GRs drépanocytaires (section 9.2.1). Sous désoxygénation puis ré-oxygénation, on montre que la nanorhéologie est prometteuse pour le suivi des GRs drépanocytaires au cours de leur changement de morphologie (section 9.2.2). Dans ces expériences, les échantillons de GRs drépanocytaires sont préparés similairement aux GRs sains : ils sont lavés, incubés dans du DASPI à 1mM pendant 3h30 puis observés au microscope de fluorescence à $T = 25^{\circ}\text{C}$.

9.2.1 Observations en conditions oxygénées

Dans cette partie, nous travaillons en conditions d'oxygénation normale. Nous présentons une image en microscopie de fluorescence d'un échantillon de GRs drépanocytaires avec du DASPI à

1 mM en Figure 9.3-(a). Des zooms sur quelques cellules sont également présentés en Figure 9.3-(c). A première vue, nous observons une hétérogénéité de morphologie avec notamment des GRs discocytaires et des GRs falciformés. Nous notons également la présence de spots lumineux très fluorescents et localisés en nombre important.

Comparaison d'un échantillon drépanocytaire à un échantillon sain

Nous comparons ici l'échantillon drépanocytaire présenté à un échantillon sain témoin. Ils sont étudiés dans les mêmes conditions. Nous commentons les aspects des distributions d'intensité, la présence de spot lumineux, et les morphologies observées.

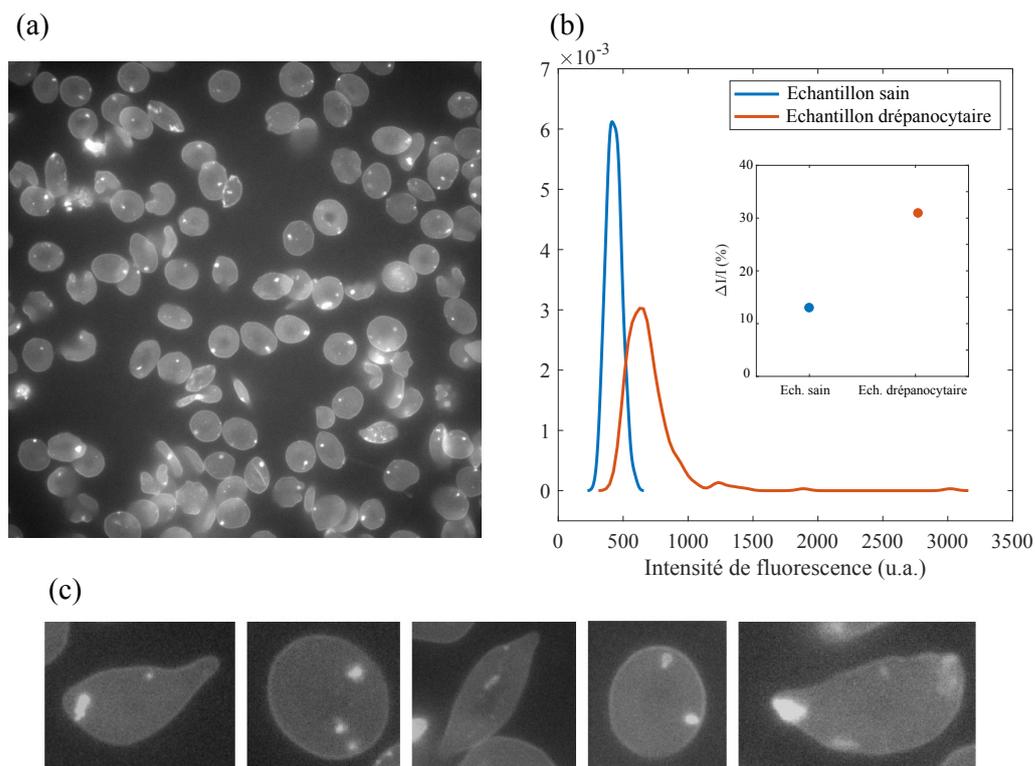


FIGURE 9.3 – **Nanorhéologie de GRs drépanocytaires.** (a) Image en microscopie de fluorescence d'un échantillon drépanocytaire incubé dans du DASPI à 1 mM. (b) Distributions d'intensité de l'échantillon drépanocytaire et de l'échantillon sain témoin. En insert sont présentées les hétérogénéités $\Delta I/I$ calculées à partir de fits gaussiens des distributions. (c) Zooms sur quelques cellules présentant des morphologies variées et des spots lumineux.

Distributions d'intensités La Figure 9.3-(b) présente la distribution d'intensité mesurée sur environ 300 GRs de l'échantillon drépanocytaire avec notre macro ImageJ et celle de l'échantillon sain témoin, toutes géométries confondues. Sur cet exemple, la fluorescence moyenne de l'échantillon drépanocytaire est légèrement plus importante que celle de l'échantillon sain. L'hétérogénéité d'intensité $\Delta I/I$ est également plus importante chez les GRs drépanocytaires que chez les GRs sains. Quelques GRs très fluorescents sont à l'origine de l'apparition d'une branche de haute intensité pour l'échantillon drépanocytaire. Nous notons que ces GRs très fluorescents contiennent tous des spots lumineux.

Spots lumineux Sur les GRs sains, on observe parfois quelques spots lumineux, généralement beaucoup plus petits que ceux observés dans les GRs drépanocytaires, et surtout en plus petit

nombre (Figure 5.1, Chapitre 5). L'origine des spots lumineux des GRs drépanocytaires, présents de manière plus systématique, nous a donc interpellée. Notre première idée était qu'il pouvait s'agir de fibres d'HbS. Cependant cette hypothèse s'est montrée peu probable car ces spots sont relativement petits, mobiles, ne grandissent pas sous désoxygénation et ne sont pas identifiables en lumière polarisée. Ces spots se situent généralement à l'intérieur de la cellule, non sur la membrane. Nous pensons qu'il pourrait s'agir d'inclusions cellulaires comme des corps de Howell Jolly et de Pappenheimer correspondant à des restes de noyaux ou des débris d'hémoglobine associée à du fer (https://www.mqzh.ch/cm/images/bph/bp_2008_1_2.pdf). Ces corps sont généralement éliminés par la rate quand celle-ci fonctionne correctement. Or, chez les drépanocytaires, la rate est sur-sollicitée à cause de la rigidité accrue des GRs et fonctionne moins bien. Il est donc courant de retrouver ce genre d'inclusions cellulaires chez les drépanocytaires, et il est raisonnable de penser que le DASPI réponde différemment aux composants de ces corps qu'à l'hémoglobine du cytosol. Pour valider cette hypothèse, il sera intéressant d'analyser en nanorhéologie des échantillons de GRs provenant d'individus ayant subi une splénectomie (ablation de la rate).

Morphologies Nous représentons sur la Figure 9.4 les carte 2D des échantillons drépanocytaires et sain étudiés ci-dessus. Ces cartes nous permettent de caractériser les morphologies présentes dans chaque échantillon. Pour rappel, sur la carte d'un échantillon sain, on délimite quatre zones correspondant à quatre familles de géométrie classiquement observées : les discocytes, les échinocytes, les petits GRs, et ce que nous avons appelé les autres géométries.

Sur la carte de l'échantillon drépanocytaires, nous appliquons le même découpage. Nous nous attendons à ce que les GRs falciformés de l'échantillon drépanocytaires remplissent le quadrant des géométries "autres" (petite circularité, grande aire). Ce n'est pas ce que nous observons dans nos différentes expériences. Nous identifions une zone triangulaire représentée en bleu qui s'étend sur les deux quadrants du bas, et qui semble correspondre aux GRs falciformés. Par comparaison, cette zone s'avère peu peuplée pour l'échantillon sain. Dans les expériences présentées ici, la sélection de cette zone est faite manuellement. Une étude approfondie des paramètres géométriques correspondant aux GRs falciformés permettra de définir clairement et systématiquement cette zone et d'adapter notre outil de carte 2D aux échantillons drépanocytaires.

Sur ces deux cartes, il reste pertinent de discuter de la répartition des données sur le quadrant associé aux GRs discocytaires (jaune). Pour l'échantillon sain, les points sont concentrés spatialement, ce qui est cohérent avec le fait qu'il y ait peu de variabilité dans leur géométrie. Pour l'échantillon drépanocytaires en revanche, les points sont plus dispersés, mettant en évidence que les GRs discocytaires drépanocytaires sont moins mono-dispersés. A ce stade de nos observations, une remarque sur la répartition des points dans le quadrant vert ne serait pas statistiquement pertinente.

Plus généralement, il est intéressant de considérer la carte 2D d'un échantillon sain ou drépanocytaires comme sa carte de visite. Ici, la comparaison des deux cartes met en évidence l'hétérogénéité de morphologie des GRs drépanocytaires, en comparaison aux GRs sains. Sur les échantillons drépanocytaires, une investigation de la délimitation des zones correspondant aux différentes géométries pourra permettre à l'avenir de définir de façon systématique la zone associée aux GRs falciformes, géométrie d'intérêt dans le cas de la drépanocytose.

Comparaison entre deux échantillons drépanocytaires

Nous étudions à présent deux échantillons drépanocytaires pour lesquels nous avons sélectionné géométriquement les sous-populations de GRs discocytaires et de GRs falciformés. En Figure 9.5, nous traçons pour chaque échantillon et chaque sous-population sa distribution d'intensité de fluorescence. On observe que les GRs falciformés sont systématiquement plus fluorescents que les discocytaires. De plus, la différence d'intensité moyenne entre les sous-populations varie. En

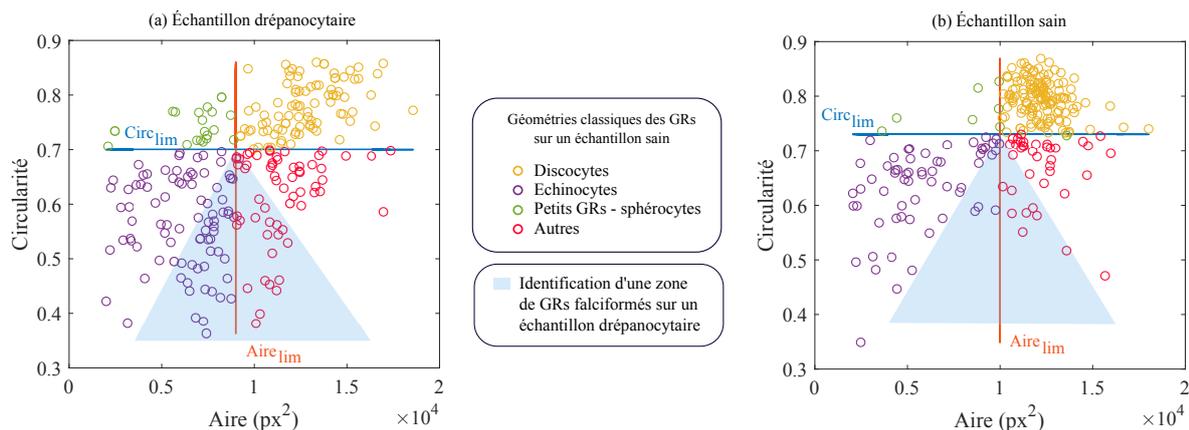


FIGURE 9.4 – **Cartes 2D aire-circularité.** (a) Échantillon drépanocytaire. (b) Échantillon sain. On retrouve les quatre quadrants associés aux géométries classiquement identifiées. On définit manuellement une zone triangulaire associée aux géométries falciformés, très remplie pour l'échantillon drépanocytaire et peu remplie pour l'échantillon sain.

particulier, le donneur 1 présente une faible différence d'intensité entre les sous-populations et on remarque des GRs très fluorescents à l'origine de la branche de haute intensité. Chez le donneur 2, la différence d'intensité entre les sous-populations est plus importante et il n'existe aucun point de très haute intensité. Cette variabilité entre donneurs observée avec le DASPI sera à mettre en parallèle avec leurs profils cliniques.

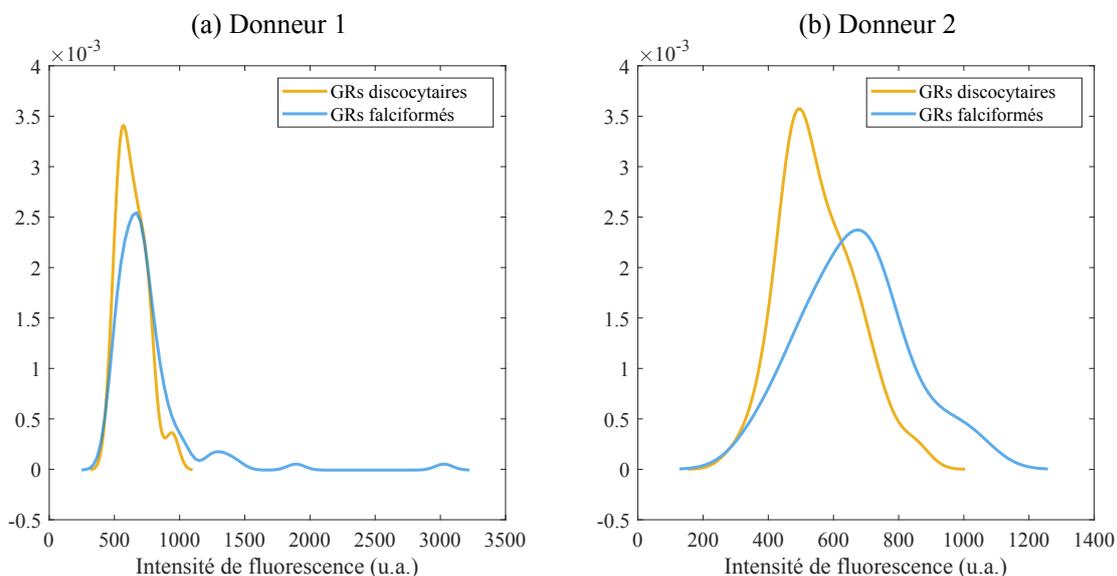


FIGURE 9.5 – **Comparaison de deux échantillons drépanocytaires.** Les distributions des sous-populations de GRs discocytaires et de GRs falciformés sont présentées pour deux donneurs.

Conclusion Nous montrons qu'un échantillon drépanocytaire se distingue d'un échantillon sain par une variabilité de morphologies que l'on peut observer sur les cartes 2D aire-circularité, ainsi que par la présence de spots lumineux très fluorescents. Entre donneurs drépanocytaires, il existe une variabilité de la réponse en nanorhéologie qui sera à mettre en parallèle avec celle de leur profil clinique.

9.2.2 Observations en conditions désoxygénées

Nous nous intéressons à présent à la désoxygénation des GRs drépanocytaires.

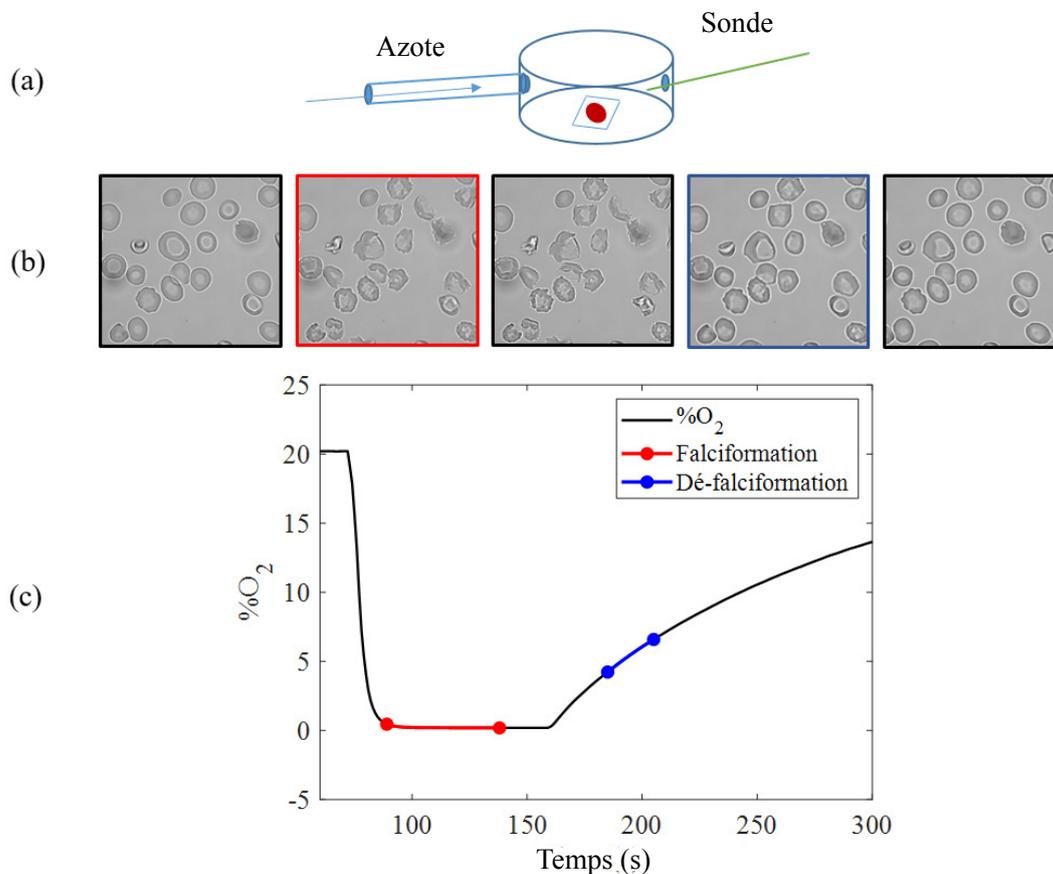


FIGURE 9.6 – **Désoxygénation des GRs drépanocytaires.** (a) Dispositif de désoxygénation. (b) Images en champ clair de GRs au cours d'un événement de désoxygénation et ré-oxygénation. Les images aux contours colorés sont prises dans les intervalles de temps représentés en (c) de la même couleur. (c) Niveau d'oxygène sondé au cours de temps. La ligne rouge correspond à l'intervalle de temps pendant lequel les GRs se falciforment. La ligne bleue correspond à l'intervalle de temps pendant lequel les GRs reviennent à leur forme d'origine.

Dispositif de désoxygénation

Nous avons construit au laboratoire, avec Oune-Saysavanh Souramasing qui travaille à l'atelier de mécanique, un dispositif de désoxygénation adapté au microscope inversé et à notre géométrie de mesure. Il s'agit d'une petite boîte transparente et fermée, représentée en Figure 9.6-(a). Elle permet d'accueillir une lamelle de verre sur laquelle nous déposons une goutte de l'échantillon qui est alors en contact direct avec l'air de la boîte. La boîte est percée de deux trous, l'un accueille l'arrivée d'azote reliée à un contrôleur de pression (Flow EZ™, Fluigent) et l'autre une sonde à oxygène (FireSting-O2, Bionef) qui permet de contrôler en temps réel le niveau d'oxygène. Avec ces deux trous, la boîte reste ouverte sur l'extérieur pour permettre la circulation des gaz et éviter les surpressions. La désoxygénation se fait donc par flux d'azote. La Figure 9.6-(b) montre des images en champ clair d'un échantillon drépanocytaires sans DASPI au cours d'un événement de désoxygénation et de ré-oxygénation. La Figure 9.6-(c) montre l'allure du niveau d'oxygène mesuré par la sonde en fonction du temps. Dans cette expérience, la désoxygénation est très rapide,

il faut environ 30 secondes pour passer d'un pourcentage d'oxygène de 20% (taux normal dans l'air) à 0%. Une fois le milieu totalement désoxygéné, la falciformation des GRs commence et se déroule sur l'intervalle de temps représenté par le trait rouge. L'image encadrée en rouge, où l'on voit que les globules sont falciformes, est prise pendant cette période. Dans cette expérience, nous coupons l'arrivée d'azote à 160 secondes et laissons la boîte se ré-oxygéner naturellement grâce aux petites ouvertures. La ré-oxygénation est plus lente que la désoxygénation. Nous observons que la dé-falciformation se produit 20 secondes après le début du processus de ré-oxygénation, sur un intervalle de 30 secondes représenté par le trait bleu. L'image encadrée en bleu, où l'on voit que les GRs reprennent leur forme d'origine, est prise pendant cette période. Notre dispositif va ainsi nous permettre d'étudier des GRs incubés avec du DASPI lors de leur désoxygénation.

Protocole de désoxygénation avec le DASPI

En présence de DASPI, nous avons remarqué un fait intéressant lors de la désoxygénation des GRs drépanocytaires : quand l'illumination fluorescente est présente durant le processus de désoxygénation, les globules ne se falciforment pas. L'origine du phénomène reste floue à ce stade. Il est possible que la forme TICT du DASPI, présente seulement sous illumination, inhibe la falciformation en s'intercalant, de la même manière que l'HbF, dans les polymères d'HbS. Nous avons alors adapté notre protocole d'étude lorsque les GRs sont incubées dans du DASPI : l'illumination fluorescente est enclenchée lorsque les GRs sont déjà désoxygénés et falciformés. Elle reste enclenchée pendant la ré-oxygénation de la boîte lorsque les GRs reprennent leur forme d'origine. Nous analysons alors le signal du DASPI des GRs désoxygénés puis ré-oxygénés selon ce protocole.

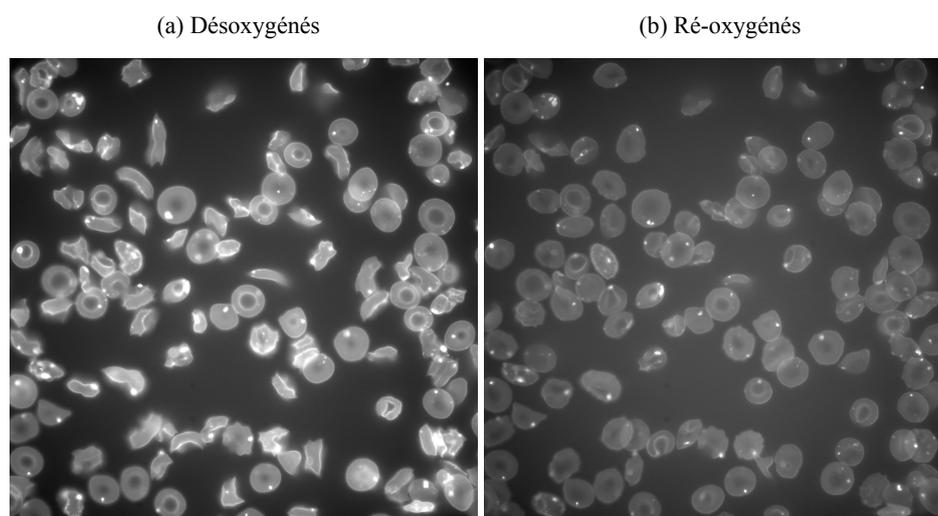


FIGURE 9.7 – **Fluorescence d'un échantillon drépanocytaire désoxygéné puis ré-oxygéné.** (a) Les GRs sont désoxygénés. (b) Les GRs sont ré-oxygénés.

Réponse du DASPI sous désoxygénation puis ré-oxygénation

La Figure 9.7 présente des GRs, incubés dans du DASPI, désoxygénés, puis ré-oxygénés, en microscopie de fluorescence. Les globules sont identifiables d'une image à l'autre. Les GRs désoxygénés, falciformes ou discocytaires, apparaissent plus fluorescents que les GRs oxygénés, ce qui se confirme en traçant les distributions d'intensité de l'échantillon dans chaque état en Figure 9.8-(a). En comparaison, un échantillon sain témoin ne montre pas de variation significative de fluorescence entre l'état oxygéné et l'état désoxygéné comme l'attestent les distributions de la Figure 9.8-(b). Les morphologies des GRs sains ne sont pas affectées non plus par le niveau d'oxygène

(non présenté). Sur la Figure 9.8-(a), chaque couleur correspond à un GR, et il est particulièrement intéressant de noter que la réponse du DASPI sur les GRs peut être variable d'un globule à l'autre : certains voient leur signal de fluorescence varier de 100% entre les deux états tandis que d'autres d'à peine 10%. La nanorhéologie se montre donc particulièrement intéressante pour étudier la réponse des cellules individuelles au cours d'un événement de désoxygénation et ré-oxygénation. Il sera intéressant d'identifier les sous-populations présentant des réponses distinctes au cours d'un ou plusieurs événement(s) de désoxygénation et ré-oxygénation et d'étudier la relation entre variation d'intensité individuelle, variation de morphologie et variation de rigidité.

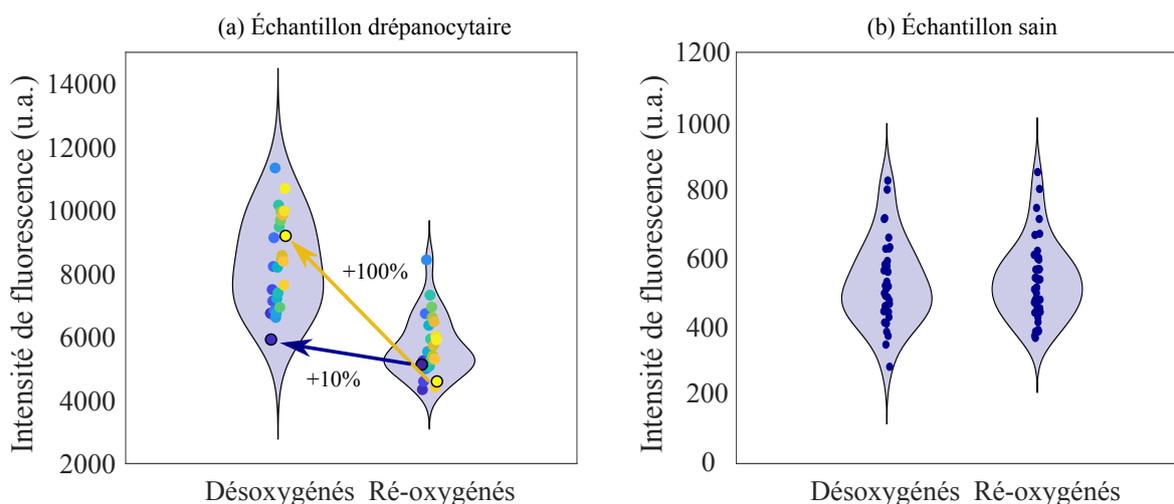


FIGURE 9.8 – **Réponse du DASPI sous désoxygénation.** (a) Distributions d'intensité d'un échantillon drépanocytaire sous désoxygénation et ré-oxygénation. Chaque GR est représenté par la même couleur dans les deux distributions. Pour certains GRs, la variation d'intensité entre les deux états est de plus de 100% (GR et flèche jaunes), pour d'autres d'à peine 10% (GR et flèche bleus). (b) Distributions d'intensité d'un échantillon sain témoin sous désoxygénation et ré-oxygénation. Les distributions sont similaires dans les deux états d'oxygénation.

Conclusion Nous montrons que sur des GRs drépanocytaires, le signal du DASPI dépend de leur état d'oxygénation. L'intensité des GRs désoxygénés est plus importante que celles des GRs ré-oxygénés, qu'ils soient discocytaires ou falciformés. D'autre part, après un événement de désoxygénation puis ré-oxygénation, il existe une variabilité dans la réponse des GRs individuels. Dans les chapitres précédents, nous avons montré que le signal du DASPI dépendait de la structure 3D du GR, du cytosol via la MCHC et de la rigidité des membranes. Au cours de la désoxygénation, ces trois paramètres sont susceptibles de varier : la géométrie et la rigidité des membranes par la falciformation, le cytosol par la polymérisation de l'HbS. Ainsi, la variation d'intensité mesurée entre les états oxygéné et désoxygéné sera à relier à ces différents paramètres. Il sera en particulier intéressant d'étudier les variations du signal au niveau cellulaire avec les cycles de désoxygénation pour identifier des sous-populations de GRs présentant des réponses distinctes. Nous nous attacherons également à coupler les informations sur la morphologie et sur la rigidité de ces sous-populations. De plus, comme pour les GRs sains, une étude complète impliquant les quantifications des contributions du cytosol et des membranes, et l'effet des variations géométriques sur le signal, permettra de comprendre et interpréter la réponse du DASPI dans les GRs drépanocytaires.

9.2.3 Sensibilité du DASPI à la MCHC

Dans le Chapitre 6, nous avons montré que le DASPI était sensible à la MCHC chez les GRs sains. Nous nous demandons, si cette sensibilité est retrouvée chez les GRs drépanocytaires. En Figure 9.9, nous ajoutons aux données des GRs sains, les distributions d'intensité de 3 donneurs drépanocytaires dont nous connaissons la MCHC (les numérations n'ont pas systématiquement été réalisées sur ces expériences préliminaires). Les mesures sont faites en condition normales – i.e. oxygénées – et à 25°C. Afin de comparer les signaux issus des mêmes géométries, les distributions d'intensité sont celles issues de la famille des GRs discocytaires. Nous observons que les MCHC des échantillons drépanocytaires sont globalement plus grandes que celles des GRs sains, ce qui est caractéristique de la pathologie. Nous observons également que les distributions des GRs drépanocytaires ne s'alignent pas sur la courbe maîtresse des donneurs sains. Elles sont plus basses que cette courbe maîtresse. Si elles suivaient la tendance obtenue chez les GRs sains, on s'attendrait à des intensités plus élevées.

Nous interprétons la différence de niveau d'intensité de fluorescence entre GRs sains et drépanocytaires comme un effet de la composition du cytosol. En effet, les GRs sains contiennent de l'hémoglobine HbA et les GRs drépanocytaires un mélange d'HbS et d'HbF. Nous avons vu dans la partie II que la réponse du rotor était contrôlée par le milieu dans lequel il se trouvait. Il semble donc raisonnable d'obtenir deux niveaux d'intensité distincts pour les deux milieux, et ainsi de ne pas trouver la même courbe maîtresse. Afin d'approfondir ce sujet, il sera pertinent de quantifier les pourcentages d'HbS et d'HbF dans les échantillons et de faire des expériences de calibration dans chaque type hémoglobine similairement à celles réalisées dans l'HbA.

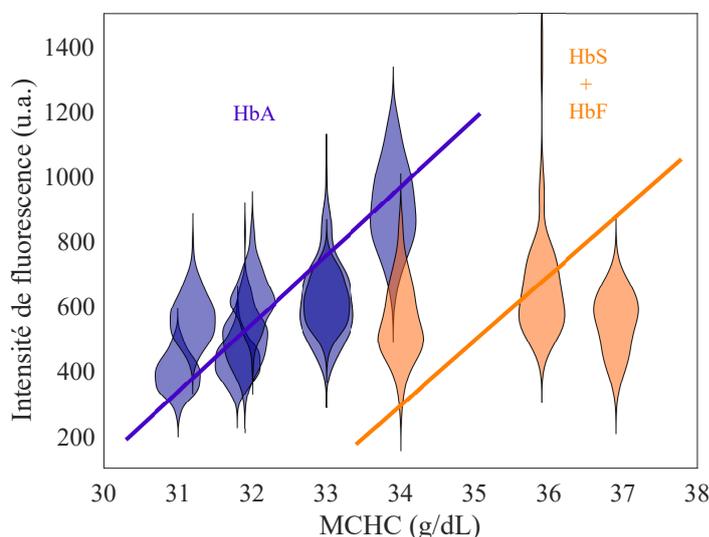


FIGURE 9.9 – **Sensibilité du DASPI à la MCHC.** Les données des 8 échantillons sains du Chapitre 6 sont représentées en violet en fonction de leur MCHC. Les données des 3 échantillons drépanocytaires dont nous connaissons la MCHC sont représentées en orange. Les GRs sains contiennent dans leur cytosol principalement de l'HbA, les GRs drépanocytaires majoritairement de l'HbS avec de l'HbF. Nous représentons symboliquement par des lignes continues les courbes maîtresses auxquelles on pourrait s'attendre pour ces deux compositions de cytosol.

9.3 Indicateurs nanorhéologiques et perspectives

Grâce aux observations précédentes, nous proposons quelques quantités pertinentes à étudier de manière systématique sur des échantillons de GRs drépanocytaires. Elles sont représentées schématiquement en Figure 9.10 et décrites ci-dessous :

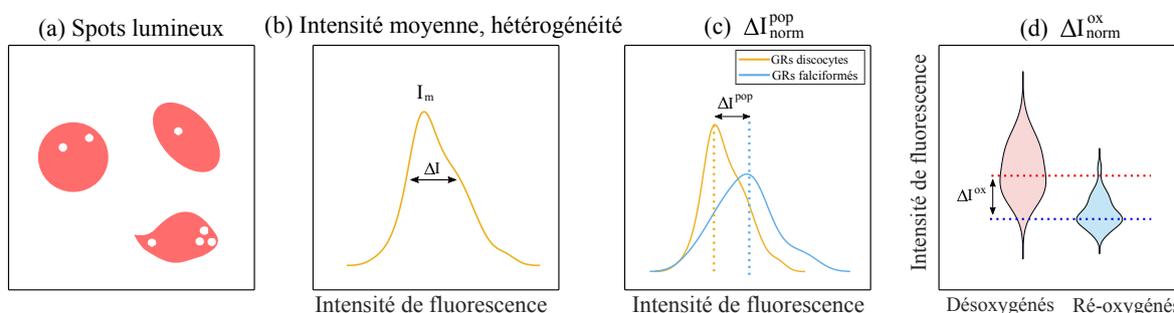


FIGURE 9.10 – **Indicateurs de la pathologie.** Schématisation des indicateurs proposés dans le texte.

- Le nombre de spots lumineux fluorescents. Il est quantifié avec la fonction *find maxima* de ImageJ, qui trouve les points d'intensité au moins 50% plus importante que la fluorescence moyenne de l'image. On normalise ce nombre par le nombre de GRs imagés. En Figure 9.11, nous présentons cet indicateur dans le cas de GRs sains et drépanocytaires. Le nombre de spots est plus important chez les drépanocytaires que chez les sains, et présente une grande variabilité entre les échantillons drépanocytaires.
- L'intensité moyenne I_m et l'hétérogénéité $\Delta I/I$ des distributions des sous-populations de GRs discocytaires et falciformes. Ces indicateurs sont présentés en Figure 9.12 pour des échantillons sains et drépanocytaires. Les GRs drépanocytaires, qu'ils soient discocytaires ou falciformes, sont en moyenne légèrement plus fluorescents que les GRs sains, et plus hétérogènes en intensité. L'hétérogénéité $\Delta I/I$ présente une plus grande variabilité entre les échantillons drépanocytaires que chez les sains.
- La différence d'intensité moyenne des sous populations de GRs discocytaires et falciformes. Cette valeur est normalisée par la fluorescence moyenne des GRs discocytaires. Cet indicateur $\Delta I_{\text{norm}}^{\text{POP}}$ est présenté en Figure 9.13 pour les échantillons drépanocytaires. On voit que sur 5 échantillons, 3 ont un $\Delta I_{\text{norm}}^{\text{POP}}$ quasiment nul et 2 un $\Delta I_{\text{norm}}^{\text{POP}}$ important, reflétant encore une grande variabilité entre les donneurs.
- La variation de fluorescence moyenne entre une population de GRs désoxygénés et ré-oxygénés, normalisée par l'intensité moyenne des GRs réoxygénés, $\Delta I_{\text{norm}}^{\text{OX}}$. L'étude des GRs en conditions désoxygénées est prometteuse (Figure 9.8), mais n'a à ce stade pas été quantitativement explorée. Cet indicateur sera étudié de manière systématique lors de futures expériences. Il sera également pertinent d'étudier son évolution lors de cycles de désoxygénation et ré-oxygénation répétés.

Conclusion Nous proposons dans cette partie des indicateurs de la nanorhéologie adaptés à l'étude des GRs drépanocytaires et montrons qu'ils présentent une variabilité entre les 5 échantillons étudiés. La suite du projet visera à interpréter cette variabilité à l'aune de celle des profils cliniques. En particulier, une analyse de chaque indicateur en relation avec les marqueurs biologiques connus de la pathologie nous permettrait de les valider pour le suivi clinique. Des indicateurs supplémentaires sont fortement susceptibles d'émerger au cours d'études futures, no-

tamment en s'intéressant à l'effet de cycles de désoxygénation sur les GRs, et en testant leur réponse à différentes valeurs de pression d'oxygène. Dans ces études, il sera également pertinent de comparer les réponses des échantillons en nanorhéologie avec des expériences d'ektacytométrie Oxygenscan.

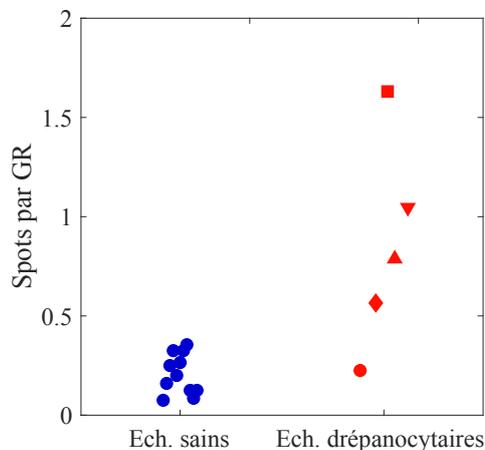


FIGURE 9.11 – **Nombre de spots par GRs.** Cet indicateur est présenté pour des échantillons sains et drépanocytaires. Nous distinguons les 5 échantillons drépanocytaires par leurs symboles. Ils seront identiques dans les figures suivantes.

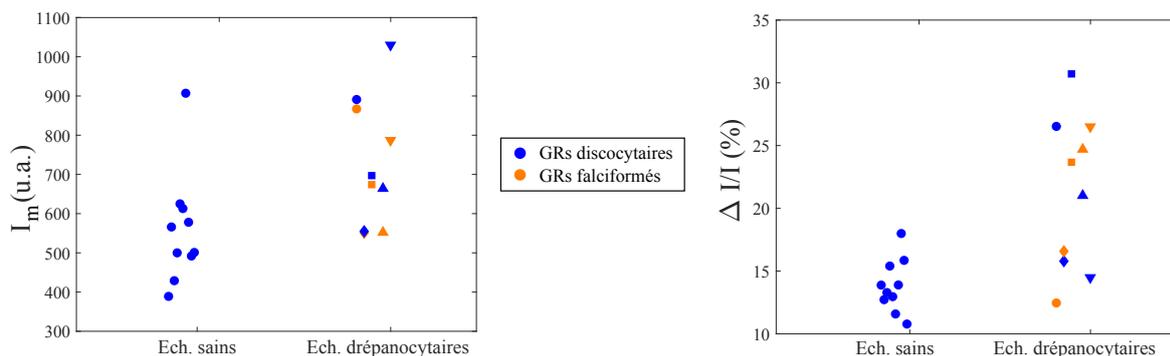


FIGURE 9.12 – **Intensité moyenne et hétérogénéité.** Ces deux indicateurs sont présentés pour des échantillons sains (GRs discocytaires) et pour des sous-populations des échantillons drépanocytaires aux géométries discocytaires (bleu) et falciformés (orange). Nous distinguons les 5 échantillons drépanocytaires par leur symbole.

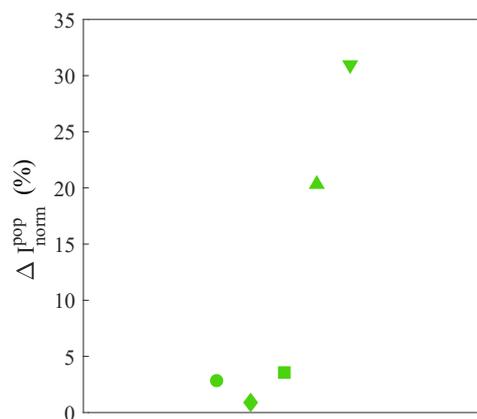


FIGURE 9.13 – Différence d'intensité moyenne des sous-populations de GRs drépanocytaires discocytaires et falciformés. L'indicateur $\Delta I_{\text{norm}}^{\text{pop}}$ est présenté pour les 5 échantillons drépanocytaires, distingués par leurs symboles.

IV

RHÉOLOGIE DE SOLUTIONS DE BSA

10

RHÉOLOGIE DE SOLUTIONS DE BSA : DYNAMIQUE LENTE DE SPHÈRES MOLLES

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la rhéologie de solutions de BSA concentrées en micro-rhéologie et diffusion de lumière. Étant annexe au fil directeur de ce manuscrit, nous expliquons ce qui nous a amené vers ce sujet et présentons quelques outils nécessaires à la compréhension de l'étude. Nous faisons le choix de présenter les résultats directement à travers un article, actuellement en cours de révision.

10.1	Contexte	121
10.2	Généralités	122
10.2.1	Rhéologie des sphères dures	122
10.2.2	Diffusion dynamique de lumière	123
10.3	Article : Slow and fluctuating dynamics of concentrated solutions of BSA proteins .	125

10.1 Contexte

Au cours de mes expériences de calibration du rotor moléculaire DASPI dans les solutions de protéines (Chapitre 4), j'ai été amenée à travailler avec des solutions d'hémoglobine et de BSA sur une large gamme de concentration. La BSA a été choisie comme protéine modèle car elle ressemble à l'hémoglobine par sa structure 3D et compacte – protéine globulaire – et sa taille. La BSA présente en plus l'avantage de ne pas être absorbante. Pour rappel, j'ai réalisé des mesures de viscosité dans les solutions de protéines afin de les relier à l'intensité du rotor. Il nous est alors apparu que la signature rhéologique des deux protéines était similaire : elles présentent une augmentation drastique de viscosité à haute concentration (Chapitre 4, Figure 4.9). Cette signature est similaire à celle observée dans les colloïdes de sphères dures où l'on observe une transition vitreuse associée à une dynamique lente. Nous nous sommes particulièrement intéressées à ce comportement dans les solutions de BSA, et avons complété les mesures de microrhéologie avec des mesures de diffusion dynamique de lumière (DLS) qui permettent de sonder la dynamique du système.

En particulier, nous montrons que l'augmentation drastique de viscosité mesurée en micro-rhéologie est associée à une augmentation des temps de relaxation du système sondés par la DLS, ce qui révèle l'existence de mouvements collectifs dans la solution. Avec des expériences spécifiques de trempe en température, nous montrons que les temps de relaxation des solutions concentrées fluctuent dans le temps, ce qui est classiquement observé pour des colloïdes de sphères molles. S'il existe dans la littérature, de nombreuses études qui comparent la rhéologie de solutions de protéines globulaires à celle de suspensions colloïdales de sphères dures [115, 118, 119,

[126, 128, 167], nous montrons pour la première fois que des solutions de BSA concentrées présentent une dynamique lente associée à un comportement de sphères molles qui peuvent se réarranger et s'interpénétrer. Dans la suite, nous proposons des généralités sur les modèles de sphères dures et sur la technique de DLS qui fourniront les bases théoriques nécessaires à la compréhension de l'étude. L'article "Slow and fluctuating dynamics of concentrated solutions of BSA proteins" [168], actuellement en cours de révision, est ensuite présenté.

10.2 Généralités

10.2.1 Rhéologie des sphères dures

Lorsque des particules sont suspendues dans un fluide, elles perturbent l'écoulement du fluide et l'énergie dissipée par frottement visqueux devient plus importante. La viscosité d'une suspension est donc systématiquement plus élevée que celle du fluide suspendant seul. Afin de décrire une telle solution, le cas d'étude consiste à considérer une suspension de sphères monodisperses et indéformables que l'on nommera "sphères dures". Le paramètre de contrôle est la fraction volumique Φ , qui représente le volume des particules sur le volume total de solution. On distingue selon la valeur de Φ trois régimes de concentration décrits ci-dessous :

Régime dilué

Dans ce régime dilué, la concentration en sphères est suffisamment faible pour que l'on considère les particules suffisamment éloignées les unes des autres et sans interactions. Einstein (1906) fut le premier à proposer une expression pour la viscosité de telles suspensions [169] :

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2,5\Phi \quad (10.1)$$

avec η la viscosité de la suspension, η_0 la viscosité du fluide suspendant. Cette relation au premier ordre en Φ reste valable pour de faibles concentrations, typiquement $\Phi < 0,1\%$, tant qu'une particule ne ressent pas la particule voisine la plus proche.

Régime semi-dilué

À concentration légèrement plus élevée, on peut décrire le système en prenant en compte les interactions entre deux sphères voisines. Batchelor [170] a alors étendu la formule d'Einstein en ajoutant un terme d'ordre 2 en Φ :

$$\eta_r = 1 + 2,5\Phi + 6,2\Phi^2 \quad (10.2)$$

Le régime semi-dilué est considéré valable jusqu'à $\Phi = 0,2$.

Régime concentré

La généralisation des formules d'Einstein et de Batchelor devient compliquée pour des concentrations plus importantes. Elle se fait principalement de manière empirique en respectant deux règles : premièrement, à faible concentration, le développement limité à l'ordre 1 doit redonner la formule d'Einstein ; deuxièmement, la viscosité doit devenir infiniment grande lorsque la concentration tend vers une concentration critique Φ_c , en accord avec les observations expérimentales. On retrouve principalement l'équation de Krieger et Dougherty [171, 172], équation 10.3, et celle de Mooney [173], équation 10.4 :

$$\eta_r = \left(1 - \frac{\Phi}{\Phi_c}\right)^{-[\eta]\Phi_c} \quad (10.3)$$

$$\eta_r = \exp\left(\frac{[\eta]\Phi}{1 - K\Phi}\right) \tag{10.4}$$

Φ_c est la fraction volumique d'empilement maximum des particules en suspension, $[\eta] = \lim_{\Phi \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \Phi}$ la viscosité intrinsèque et K un facteur d'encombrement. Dans le cas de particules sphériques, $[\eta] = 2,5$ (équation 10.1). Il est supérieur à 2,5 et augmente pour d'autres géométries. K varie notamment avec la polydispersité de la solution. Ces équations présentent l'intérêt de rendre compte de la variation de viscosité sur toute la gamme de concentration, et de la divergence de la viscosité à haute concentration.

10.2.2 Diffusion dynamique de lumière

La diffusion de la lumière est une technique d'analyse qui repose sur l'interaction entre une onde lumineuse et le système d'étude. Elle permet d'obtenir des informations aux échelles de longueur d'onde de la lumière visible. Considérons un élément de volume V illuminé par un faisceau incident de longueur d'onde λ . S'il existe dans la solution, et à l'échelle sondée, une inhomogénéité d'indice optique – c'est le cas pour des solutions de molécules suffisamment grandes ou dans le cas de suspensions colloïdales – le faisceau incident est diffusé dans toutes les directions de l'espace.

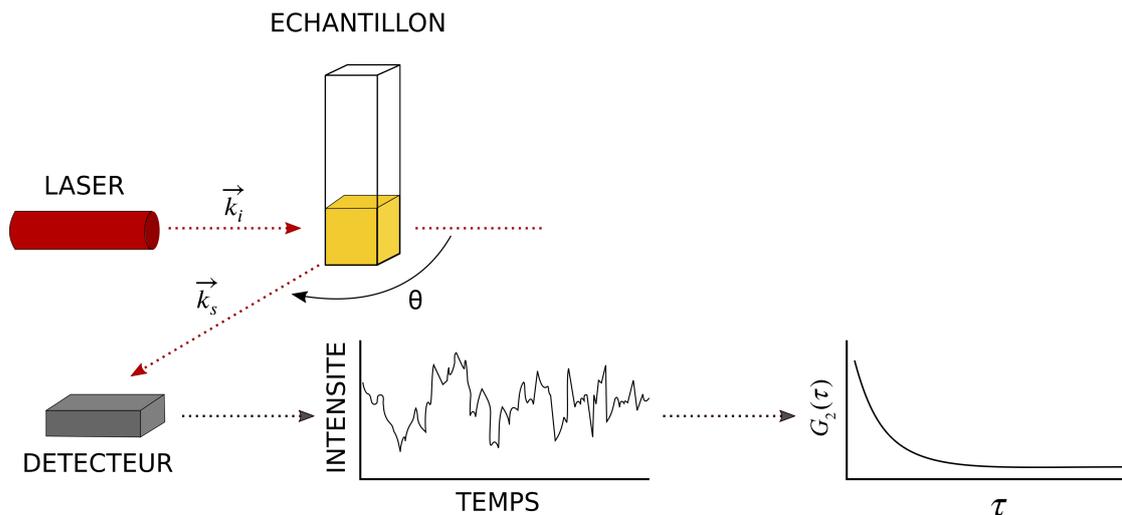


FIGURE 10.1 – Principe de la diffusion dynamique de la lumière. Figure adaptée de [174].

La diffusion statique de la lumière (Static Light Scattering ou SLS) analyse l'intensité diffusée $\langle I(\theta) \rangle$ en fonction de l'angle θ , la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering ou DLS) s'intéresse aux fluctuations d'intensité diffusée au cours du temps, à un angle fixé. Lorsqu'un fluide est au repos, l'agitation brownienne des particules diffusantes induit une variation de l'intensité diffusée autour de sa valeur moyenne $\langle I(\theta) \rangle$ comme l'illustre la Figure 10.1. Ces fluctuations s'analysent à l'aide d'un corrélateur qui calcule les fonctions d'autocorrélations sur une large gamme d'intervalles de temps. On définit la fonction d'autocorrélation normalisée du champ électrique $g^{(1)}(\tau) = \langle E_f(t)E_f^*(t + \tau) \rangle / \langle E_f(t)E_f^*(t) \rangle$ et celle de l'intensité diffusée $g^{(2)}(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle / \langle I(t) \rangle^2$, l'intensité étant simplement la norme du champ électrique $I(t) = E_f(t)E_f^*(t)$. Ces fonctions d'autocorrélation expriment le degré de similitude de la fonction d'intérêt (E ou I) entre deux instants séparés d'un temps τ . Pour τ petit, les positions des particules diffusantes

et donc les intensités diffusées sont fortement corrélées de sorte que la fonction est maximale. Lorsque τ augmente, les positions des particules en mouvement aléatoire ne sont plus corrélées (elles ont perdu la "mémoire" de leurs positions précédentes), et la fonction décroît.

Pour des particules sphériques monodisperses et sans interactions, les expressions suivantes sont obtenues pour $g^{(1)}(\tau)$ et $g^{(2)}(\tau)$ [175] :

$$g^{(1)}(\tau) = \exp(-Dq^2\tau); \quad g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta \exp(-2Dq^2\tau) \quad (10.5)$$

avec D le coefficient de diffusion des particules diffusantes, β un facteur de cohérence spatial – résultant du rapport signal sur bruit et inférieur ou égal à 1 – et q la norme du vecteur $\vec{q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i$, différence entre le vecteur d'onde du faisceau diffusé et incident. La norme du vecteur d'onde q s'exprime ainsi :

$$q = \frac{4\pi\langle n \rangle}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (10.6)$$

avec $\langle n \rangle$ l'indice moyen de réfraction du fluide. Notons que q^{-1} est homogène à une longueur et est de l'ordre de 10 à 1000 nm, représentatif des échelles sondées.

Ainsi, lorsque les particules sont libres et sans interactions (régime dilué), la fonction $g^{(2)}(\tau) - 1$ est une exponentielle décroissante de la forme $\exp(-\tau/\tau_0)$ avec $\tau_0 = 1/2Dq^2$ le temps caractéristique de la fonction exponentielle. La mesure de τ_0 permet de déduire le coefficient de diffusion des particules diffusantes au sein du liquide [175-177] et ainsi le rayon hydrodynamique R_h des particules ou la viscosité du milieu η , avec la loi de Stokes-Einstein.

Quand les particules ne sont pas uniquement soumises au mouvement Brownien ou quand la solution est polydisperse, l'interprétation de $g^{(2)}(\tau)$ n'est plus si simple. On peut trouver plusieurs temps caractéristiques de décroissance qui reflètent plusieurs tailles caractéristiques de l'échantillon. À haute concentration, des phénomènes de diffusion multiple, souvent anticipés par une turbidité du milieu, peuvent mener à une fausse interprétation de la fonction d'autocorrélation. À faible concentration, quand le nombre de particules dans le volume sondé devient faible, des fluctuations d'intensité provoquées par des entrées et sorties de particules dans le volume de mesure peuvent également fausser l'interprétation de la fonction d'autocorrélation [174].

Pour conclure, la diffusion dynamique de lumière permet de sonder l'échantillon aux longueurs d'onde de la lumière utilisée, des temps caractéristiques du système sont mesurés à travers la fonction d'autocorrélation $g^{(2)}(\tau)$ et doivent être attentivement interprétés en tenant compte du régime de concentration. Plus de détails peuvent être lus dans le livre de Bruce J. Berne et Robert Pecora [175].

10.3 Article : Slow and fluctuating dynamics of concentrated solutions of BSA proteins

Slow and fluctuating dynamics of concentrated solutions of BSA proteins

Alice Briole and Bérengère Abou

Matière et Systèmes Complexes, UMR7057 CNRS - Université Paris Cité, 75205 Paris, France

ABSTRACT

Many studies have borrowed the colloidal description to account for the complex behaviour of protein solutions in the concentrated phase, in particular the increase in viscosity. It is now widely recognised that proteins encompass greater complexity than colloidal spheres due to their 3D structure, heterogeneous surface charges and pairwise interactions. In particular in the colloidal description, the use of the volume fraction as a control parameter, assumed to be proportional to the concentration over the whole range via a constant quantity, is highly questionable. Here we present a study of globular BSA protein solutions over a wide concentration range 1 – 55g/dL never before performed, using particle tracking microrheology and dynamic light scattering. The control parameter is chosen to be the concentration of the solution and is measured independently by Bradford tests. With increasing concentration, we measure a slowing down of the dynamics, characterised by a drastic increase in viscosity with concentration over 3 decades, complementing measurements from other groups. The increase in viscosity is associated with a drastic increase in the relaxation times of the system probed by DLS, which are revealing of collective motions within the solution. After quenching at very high concentration and low temperature, where very slow dynamics is achieved, the slow relaxation times saturate and fluctuate strongly with time, similar to the aging process observed in very soft colloids. This soft-sphere dynamics suggests that the proteins rearrange and interpenetrate, making the volume fraction parameter inadequate at high concentrations.

Introduction

Predicting the behaviour of concentrated protein solutions is a subject that has received increasing attention over the last twenty years^{1–11}. Proteins are biological macromolecules with a complex three-dimensional structure (anisotropic charge distribution, hydrophobic patches) and form solutions whose mechanical properties and phase behaviour generally depend on parameters such as concentration, ionic strength, pH or temperature. The interactions between the macromolecules, which are negligible at low concentration, become more pronounced at high concentration and make it impossible to extrapolate the behaviour from low to high concentration.

Proteins are very common in biological media, pharmaceutical, cosmetic and food industries. In intracellular media, they are generally found in high concentrations up to 40 g/dL, which has an influence on cellular mechanisms⁴. During food processing, proteins commonly undergo concentration steps such as drying or membrane filtration, with concentrations that can locally reach several hundred grams per litre. High concentrations are also achieved in pharmaceutical industry with implications for product functionality. The formulation of injectable drugs requires a highly concentrated protein composition to limit the maximum volume administered without phase transition¹². These high concentration formulations have an impact on chemical and physical stability, mechanical properties and transport efficiency. In particular, this raises problems in limiting the increase in viscosity with concentration in order to optimise production processes.

With this in mind, the colloidal point of view has been widely explored to describe globular protein solutions in concentrated phase, and especially the drastic increase in viscosity^{10,11,13–16}. In particular, to adapt the colloidal glass transition formalism, the volume fraction was used as a control parameter in these protein solutions. Limitations of the colloidal description were pointed out based on the evidence that protein are macromolecules much more complex than hard spheres, with size polydispersity, anisotropic shape and molecular interaction^{7–9}. In addition, these ingredients – structure and interactions – cannot be considered invariant over the entire concentration and pH range, as is the case for hard sphere colloids⁹. It follows that the volume fraction is a questionable control parameter to reproducibly describe protein solutions at high concentration. It is therefore not reasonable to estimate this parameter, especially with several significant digits, from a constant parameter – voluminosity of sphere radius – over the whole concentration range.

In this context, we present a study of Bovine Serum Albumin (BSA) solutions over a wide concentration range 1 – 55g/dL, using particle tracking microrheology and dynamic light scattering (DLS) at $pH = 7.4$. Our objective is to propose a complete characterisation of the rheology and temporal dynamics of concentrated BSA solutions as a function of the parameter concentration, which allows comparison with other groups and is not subject to biases as the volume fraction, especially at

high concentration. The wide concentration range, never reached before, was evaluated by Bradford tests. We measure the drastic increase in viscosity over more than 3 decades with concentration, in agreement with measurements by other groups over a narrower concentration range. We show that the solutions remain viscous and spatially homogeneous liquids at the micrometer scale over the entire concentration range. The size of the protein is determined by DLS and microrheology, results already established in the literature^{16–18}. The increase in viscosity is associated with the concomitant increase in relaxation times measured by DLS, over 4 decades with concentration, suggesting collective motions within the solution. After quenching at very high concentration and low temperature, where the dynamics becomes very slow, we measure fluctuations in relaxation times, corresponding to an aging process and resulting from micro-rearrangements similar to that observed in very soft spheres. This dynamics of soft spheres suggests that the proteins interpenetrate and rearrange, making the volume fraction parameter inadequate at high concentration.

1 Materials and Methods

1.1 Preparation of BSA solutions

BSA solutions are prepared by diluting lyophilized BSA powder from Sigma-Aldrich (molar mass 66 kDa) in Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH = 7.4 and concentration 0.01 M). In our protocol, the mixtures are stored at 4°C without stirring. At high concentrations, several days may be necessary to obtain a liquid without turbidity, which is our final dilution criteria. The concentration of BSA in the solution was measured by colorimetry with Comassie Blue Bradford Test (Sigma-Aldrich) in the concentration range 0.25 – 55g/dL. In this range, the solutions remain transparent regardless of the concentration, as can be seen in Figure 7 in Appendix A.

1.2 Viscosity of BSA solutions

Particle tracking microrheology Particle tracking microrheology is a technique which consists of determining the rheological properties of a material from the study of the Brownian motion of micrometric probes embedded in the material^{19,20}. In our set-up, the sample is placed under an inverted microscope (Leica DMI 8, Germany) at 100X magnification (oil immersion, numerical aperture 1.3), and the Brownian motion of the micrometric beads is measured with a high speed sCMOS camera (OrcaFlash4.0 v2+, Hamamatsu Photonics, France). Particle tracking microrheology typically requires less than 1 μL of sample and is suitable for rheological measurements even with tiny material quantities, which is common in the study of biological samples. This technique is also useful for studying heterogeneities in the rheological properties of the sample²¹, by examining the response of each bead in the sample separately.

The protein solution was placed into a $1 \times 1 \text{ cm}^2$ chamber made of a microscope slide and a coverslip separated by a 250 μm thick adhesive spacer. The chamber is sealed to avoid evaporation and contamination. Calibrated Polystyrene beads (0.994 μm diameter, VWR) were dispersed in the solutions to be studied at a volume fraction of less than 1%. The temperature of the sample was controlled with an objective heater using immersion oil in contact with the sample (Bioptechs Inc., Butler, PA, USA) to within $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

The Brownian motion of the tracer beads in the protein solution was recorded for 20s at 100Hz with the fast camera under the inverted microscope. The positions $x(t)$ and $y(t)$ of the beads near the focal plane were tracked with image analysis software developed locally under ImageJ²². The beads close to the surfaces – microscope slide and free surface of the drop – were not selected in order to avoid measurement biases due to the friction of the probe near a surface. For each tracer bead i , the time-averaged mean-squared displacement was calculated according to $\langle \Delta r_i^2(t) \rangle = \langle [x_i(t+t') - x_i(t')]^2 + [y_i(t+t') - y_i(t')]^2 \rangle_{t'}$. The ensemble-averaged mean-squared displacement (MSD), $\langle \Delta r^2(t) \rangle$, was then calculated as the average of the time-averaged MSDs over all beads in the sample. In a 'simple' viscous fluid of viscosity η , the Brownian motion of the probes is diffusive. The ensemble-averaged MSD linearly increases with the lag time, according to $\langle \Delta r^2(t) \rangle = 4Dt$ (in two dimensions), with D the diffusion coefficient. In this case, the viscosity η can then be estimated using the Stokes–Einstein relation, $\eta = kT/6\pi R D$, where R is the bead radius and kT is the thermal energy²³. A number of materials (foams, colloids, gels) however have more complex rheological properties and the MSD adopts a dependence that is no longer linear with time. This is a signature that the probed material is viscoelastic and a generalised Stokes–Einstein equation will then be used to determine the elastic and viscous moduli of the probed material^{19,20,24}.

Capillary viscometer The viscosity of BSA solutions was measured with a capillary viscometer at concentrations between 40 and 52 g/dL. The principle of the capillary viscometer is as follows: under the effect of gravitational force, the liquid flows through a thin capillary tube according to a Poiseuille law. The liquid viscosity η is then determined according to the relation $\eta = K\rho\Delta t$, where ρ is the fluid density, Δt is proportional to the inverse volume flow rate and $K = 5,13 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2 \text{ s}^{-2}$ is the conversion factor of the capillary viscometer determined from its geometry.

1.3 Dynamic Light Scattering

Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out on BSA solutions with concentrations between 0.25 – 55g/dL using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) with a measurement range of 0.3nm to 10 μ m. The wavelength of the incident light delivered by a Helium-Neon laser is $\lambda = 632.8\text{nm}$ and the light is collected by an avalanche photodiode at a scattering angle $\theta = 173^\circ$. The Nano ZS instrument integrates non-invasive backscattering (NIBS) optics, which not only provides the advantages of backscatter but allows higher concentrations of the sample to be measured by reducing multiple scattering. The solutions were first poured into glass cuvettes, stabilised for a few minutes and placed in the sample holder. The temperature of the sample was controlled by the cuvette holder and set at $T = 5^\circ\text{C}$, 25°C or 45°C . For each sample at a given temperature, the normalized intensity auto-correlation function $g_2(q, t) = \langle I(q, 0) \cdot I(q, t) \rangle / \langle I(q, 0) \rangle^2$ was determined, with $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta/2)$ the modulus of the scattering vector ($q^{-1} = 38\text{nm}$), t the lag time and $n = 1.33$ the refractive index of the solvent.

2 Results and discussion

2.1 Viscosity of BSA protein solutions

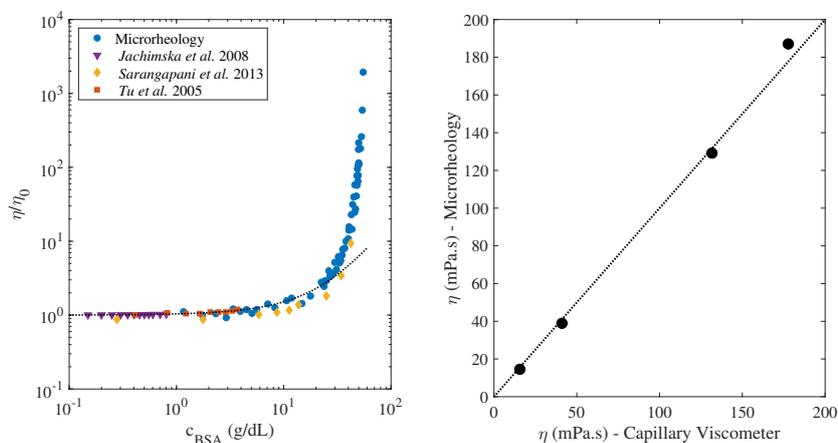


Figure 1. Left: Relative viscosity of BSA solutions with concentration between 1 – 55g/dL at temperature $T = 25^\circ\text{C}$, measured with microrheology. The effective concentration of the solutions was evaluated by Bradford tests. The figure gathers our experimental data (blue circles) and those of Jachimska *et al.*¹⁸, Sarangapani *et al.*⁹ and Tu *et al.*¹⁶. The dotted line represents the Einstein-Batchelor fit of our data in the semi-diluted regime, determined a posteriori by $c_{\text{BSA}} \leq 10\text{g/dL}$; Right: Microrheology versus capillary viscometer experiments, spanning the viscosity range at temperature $T = 25^\circ\text{C}$, showing excellent agreement and validating the use of polystyrene tracer beads for particle tracking microrheology.

The viscosity of BSA solutions with concentrations in the range 1 – 55g/dL was measured by particle tracking microrheology, at temperature $T = 25^\circ\text{C}$. The concentration of the solutions was evaluated by Bradford tests, demonstrating the validity of the wide range of concentrations studied. One of the strengths of microrheology is that it allows the spatial heterogeneity of rheological properties to be probed at the micrometer scale. It can also measure whether the fluid has an elastic component, which may be the case for complex fluids which are generally viscoelastic¹⁹. We measured that the BSA solutions are viscous liquids, without elasticity, at all concentrations which is characterised by a linear MSD of the tracer beads as a function of time as shown in Appendix A. The BSA solutions are also spatially homogeneous at the micrometer scale in their rheological properties, as evidenced by an MSD independent of the tracer position. In addition, Appendix A shows that the solutions remain transparent at different concentrations up to 55g/dL.

Figure 1-left shows that the relative viscosity – viscosity η normalized by that of the PBS solvent, η_0 – increases by 3 orders of magnitude at high concentration, recalling the characteristic signature of hard-sphere colloidal suspensions, widely used in globular proteins to account for this drastic increase^{10,11,14–16,25,26}. For comparison, viscosity data in BSA solutions measured by other groups, under similar conditions ($\text{pH} = 7.4$) – Jachimska *et al.*¹⁸, Tu *et al.*¹⁶ and Sarangapani *et al.*⁹ – have been plotted. They were carried out in a narrower concentration range, and show good consistency with our measurements. In addition, microrheology with polystyrene beads was supplemented by capillary viscometry at the highest concentrations 40 – 52g/dL (Figure 1-right). In the literature, adsorption of proteins to surfaces has been widely discussed in the choice of

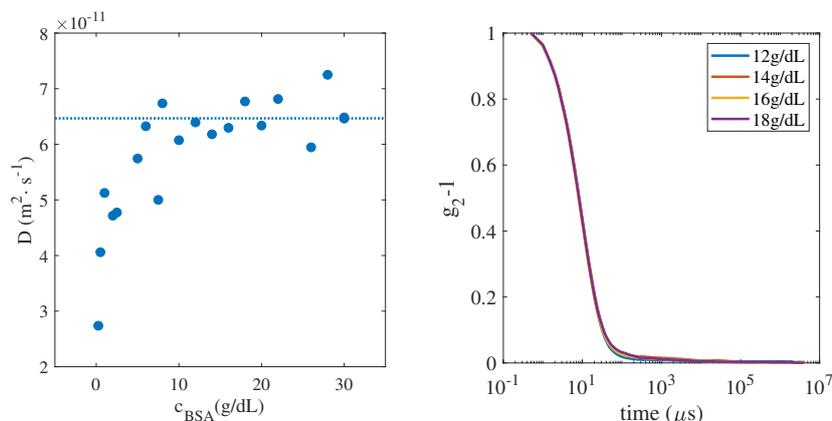


Figure 2. Left: Diffusion coefficient as a function of the concentration of the protein solution up to 30g/dL. At very low concentration, fluctuations in the number of scattering molecules underestimate the diffusion coefficient. At higher concentration, the diffusion coefficient is very little dependent on the concentration. Right: Intensity correlation functions of BSA solutions of concentration 12, 14, 16, 18g/dL, at temperature $T = 25^\circ\text{C}$. The average diffusion coefficient extracted from these curves allows us to determine the hydrodynamic radius of the protein assimilated to a sphere.

tracer particles^{11,15,16,27,28}. They may affect solution concentration, tracer size or solution quality by inducing particle-particle or particle-protein aggregation, and thus distort viscosity measurements. In BSA solutions, it has been shown that adsorption of the molecule onto polystyrene beads, provided that the overall concentration of the solution does not vary, does not influence the viscosity of the solution¹⁶. This is also the case in our microrheology experiments, performed with a low concentration of $< 1\%$ tracer beads, and validated by agreement with capillary viscometry.

In globular protein works, concentration is usually converted to volume fraction, with a packing volume per unit weight (voluminosity or apparent protein volume in $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) or a particle volume^{10,13,14,25}. The intention is to describe the protein solution by a colloidal model where the volume fraction is the control parameter for the drastic increase in viscosity as observed in colloids^{29,30}. This is without taking into account the 3D anisotropic shape and polydispersity of BSA molecules. Also, as recently discussed⁷⁻⁹, it is very likely that morphological changes and complex interactions of the protein take place at high concentration, and that the volume fraction determined from a constant volume parameter is not relevant over the whole concentration range, and subject to a large margin of error. We choose to express our results in terms of concentration, a parameter that can be compared to measurements made by other groups, and is less subject to large error bars as we will see in section 2.3.

However, at low concentrations, where interactions between proteins can be neglected, it is tempting to adopt the colloidal formalism to show that microrheology is sufficiently accurate to estimate the size of the BSA protein. At low concentration below $c_{\text{BSA}} \leq 10\text{g/dL}$, the viscosity data were fitted with an Einstein-Batchelor model for hard spheres:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + 2.5 \cdot \alpha \cdot c + 6.2 \cdot \alpha^2 \cdot c^2; \quad \alpha = \Phi/c = \frac{N_a \frac{4}{3} \pi R^3}{M} \quad (1)$$

with c the mass concentration, α a coefficient relating c and the volume fraction Φ , R the sphere radius, M the molar mass and N_a the Avogadro constant. With Eqn. 1, the radius R of the BSA considered as a sphere, has been estimated to be $R = 33 \pm 2 \text{ \AA}$. Another way to estimate the protein size is to perform dynamic light scattering measurements assuming that the globular protein is a sphere of hydrodynamic radius R_h . In a first set of measurements, we analysed the dependence of the diffusion coefficient D on the concentration between 0.25 – 30g/dL (Figure 2-(left)). In this range, autocorrelation functions of the intensity $g_2(q, t) - 1$ exhibit a single-exponential decay modelled as $g_2(q, t) - 1 = \exp(-2Dq^2t)$. At low concentration in Figure 2-(left), fluctuations in the number of scattering molecules in the scattering volume lead to an underestimation of D , while at higher concentration, D exhibits a relatively low concentration dependence. Based on this analysis, the autocorrelation functions $g_2(q, t) - 1$ between $c = 12 - 18\text{g/dL}$ are plotted in Figure 2-(right), and an average diffusion coefficient D was determined. According to the Stokes-Einstein equation²³, $D = k_B T / 6\pi\eta_0 R_h$, with k_B the Boltzmann constant and T the temperature, we estimate the hydrodynamic radius $R_h = 38 \pm 3 \text{ \AA}$. Although the anisotropic shape of the protein deviates significantly from a spherical shape^{18,31}, microrheology and DLS provide an estimate of the size of the BSA, and this is consistent with values found in the literature¹⁶⁻¹⁸.

The drastic increase in viscosity at high concentration is a signature of the increase in relaxation times with crowding, suggesting slow dynamics. In the next section, we focus on the dynamics of the solutions probed by dynamic light scattering.

2.2 Slow dynamics and collective motions

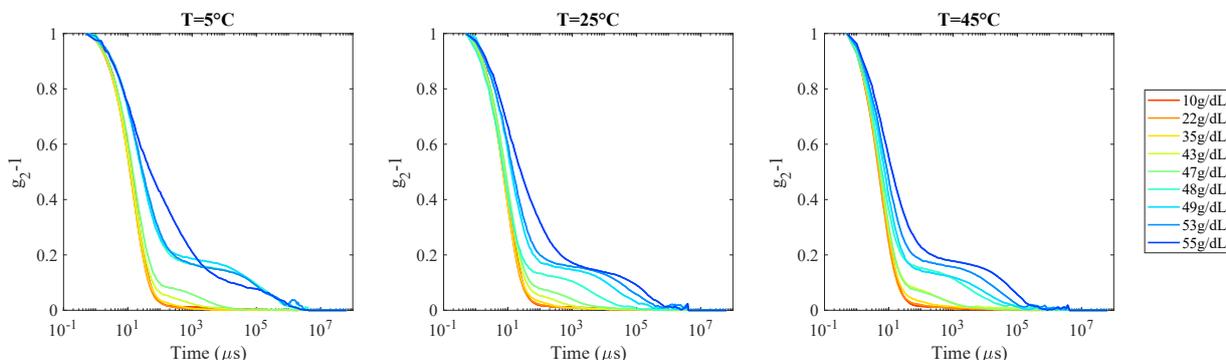


Figure 3. Autocorrelation functions of the scattered intensity, $g_2(t) - 1$, measured by dynamic light scattering experiments for increasing BSA concentration (in g/dL) at temperature 5°C (left), 25°C (center) and 45°C (right). As the concentration increases, a second and slower relaxation develops, spanning 3-4 decades, which we interpret as collective motions of BSA molecules.

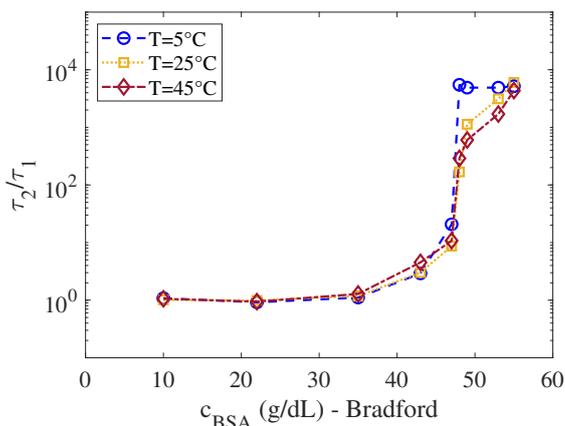


Figure 4. The characteristic relaxation time τ_2 , normalized by the relaxation time τ_1 of the dilute regime, increases over nearly 4 decades with concentration. τ_1 and τ_2 are arbitrarily defined for $g_2(\tau) - 1 = 0.05$. At the lowest temperature 5°C, there is a sharp increase in relaxation time and saturation at very high concentrations.

The dynamics of the BSA solutions with concentration was studied by DLS at temperatures $T = 5, 25$ and 45°C . Figure 3 shows the autocorrelation functions $g_2(t) - 1$ in the range 10 – 55 g/dL at each temperature. Below 33g/dL, the dynamics is fast and $g_2(t) - 1$ shows a single-exponential decay with a fast relaxation time τ_1 , which is that of the diluted regime. As the concentration increases, the dynamics slows down dramatically and $g_2(t) - 1$ develops a second and slower relaxation with a characteristic decay time τ_2 . Figure 4 illustrates the increase of τ_2/τ_1 over nearly 4 decades at the highest concentrations^a associated with a drastic slowing down of the dynamics.

The two-step relaxation of the autocorrelation function is characteristic of that observed in concentrated hard colloids³². The first relaxation characterises the Brownian diffusion of the BSA molecules with a relaxation time τ_1 on short length scales. We tested the hypothesis of the second relaxation in terms of collective motions by re-diluting the solutions at the highest

^a τ_1 and τ_2 were arbitrarily defined as $g_2(\tau) - 1 = 0.05$. This definition is an arbitrary choice and we have verified that varying this definition does not significantly change the shape of the curve obtained.

concentrations and measuring the corresponding autocorrelation functions. For example, the 55g/dL solution was rediluted to lower concentration and its new concentration measured by Bradford tests. We found the same dependence of $g_2 - 1$ with the concentration for the diluted solution than for the ones shown in Figure 3. These additional experiments exclude the presence of aggregates which would be visible again on the autocorrelation functions under dilution. This is also consistent with studies conducted in BSA at different pH and concentrations^{8,9}, where it is shown that protein clustering is not very pronounced under similar working conditions ($pH = 7.4$) between 20 – 500mg/mL (2 – 50g/dL). The second and slower relaxation, with a characteristic time τ_2 , thus reveals the collective motions of the molecules with their closest neighbours, on larger length scales. The height of the plateau of $g_2 - 1$ increases with concentration, indicating that the molecules are more tightly caged when crowding increases. Since the scattering vector $q^{-1} = 38\text{nm}$, the self and collective diffusion are measured over distances much larger than the protein size.

The slow and fast relaxations are well separated, except at the lowest temperature 5°C for the highest concentration 55g/dL, where the dynamics is expected to be slowest^b. At 5°C, the slow mode τ_2 saturates at very high concentration. A similar signature has been recently reported in soft colloids³³. Next section presents DLS measurements at high concentration after quenching.

2.3 Fluctuating dynamics in concentrated solutions

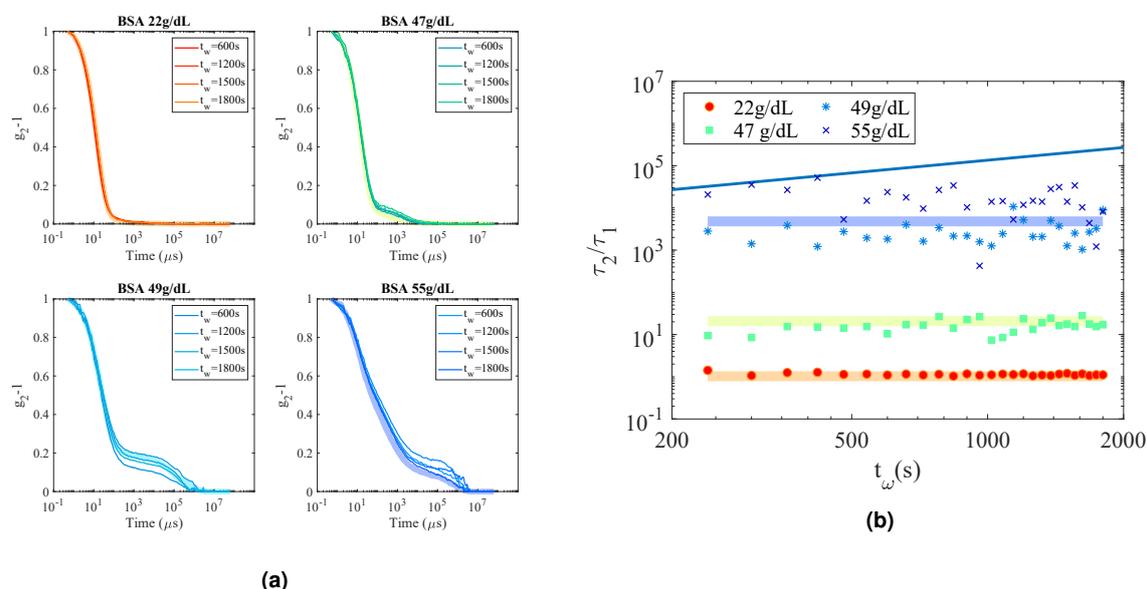


Figure 5. (a). Autocorrelation functions $g_2 - 1$ with increasing aging time t_w . The solutions, at concentration 22, 47, 49, 55g/dL, are quenched from the high temperature of 45°C to 5°C, defining the aging time $t_w = 0$. The thicker curve represents the stationary autocorrelation function reached without quenching at the given concentration. (b). Slow relaxation times with aging time. At 22g/dL, the autocorrelation function and the relaxation times are stable over time t_w . At higher concentrations, significant fluctuations in the dynamics are observed. The line shows $\tau_2 = t_w$. In our experiments $\tau_2 < t_w$ ensures that the experiments are performed in a quasi-stationary regime.

The dynamics of BSA solutions in the regime where τ_2 saturates at high concentrations – 47, 49 and 55 g/dL – was studied as follows. The samples are brought to an elevated temperature of 45°C and then quenched by placing the sample in the cuvette holder of the DLS setup at 5°C. The quenching to lower temperature defines the aging time $t_w = 0$. This procedure allows us to reach very slow dynamics and to study the aging of the solutions from a well defined time $t_w = 0$. The autocorrelation functions were then measured over time t_w . The quenching was also carried out with a low concentration solution, 22g/dL, which does not show a second relaxation, as a control.

Figure 5 displays the temporal fluctuations of the autocorrelation functions with t_w , and the associated normalised relaxation times τ_2/τ_1 . At low concentration 22g/dL, τ_2 is stable with aging time t_w , as expected for an equilibrium solution. In contrast,

^bThe continuous decay of $g_2 - 1$ suggests a broad distribution of relaxation times between τ_1 and τ_2 , highlighting a complex dynamics.

at higher concentration 49 and 55 g/dL in the regime where τ_2 saturates in Fig. 4, the fluctuations in τ_2 are quite large, covering almost one decade of time. This behaviour has already been observed in very soft colloids, where the saturation regime of τ_2 was attributed to mild aging due to particle softness, and intermittent release of internal stress³³. We believe that at very low temperature $T = 5^\circ\text{C}$, we reach this regime of fluctuations at the highest concentrations after quenching. Without going into the details of the complex interactions, this suggests that BSA molecules interpenetrate and rearrange smoothly in a crowded environment, resulting in fluctuations in relaxation times. This rules out the description in terms of hard spheres at high concentration, as already mentioned in⁷⁻⁹, as well as the estimation of the volume fraction from invariant parameters over the whole concentration range.

As evidence, we estimate this volume fraction parameter at high concentration, where soft colloids like behavior is observed. A calculation can be made with the radius measured in microrheology $R = 33 \pm 2 \text{ \AA}$. The coefficient $\alpha = \Phi/c = 1.36 \pm 0.27 \text{ mL/g}$ considered as a constant, gives a volume fraction $\Phi = 0.64 \pm 0.13$ at concentration $c = 47 \text{ g/dL}$, $\Phi = 0.67 \pm 0.13$ at concentration $c = 49 \text{ g/dL}$ and $\Phi = 0.75 \pm 0.15$ at concentration $c = 55 \text{ g/dL}$. With the constant coefficient $\alpha = \Phi/c = 2.08 \pm 0.54 \text{ mL/g}$ estimated from the radius $R_h = 38 \pm 3 \text{ \AA}$ measured in DLS, we obtain a volume fraction $\Phi = 0.98 \pm 0.25$ at concentration $c = 47 \text{ g/dL}$, $\Phi = 1.02 \pm 0.26$ at concentration $c = 49 \text{ g/dL}$ and $\Phi = 1.14 \pm 0.30$ at concentration $c = 55 \text{ g/dL}$. Several comments can be made. At high concentration, Φ is larger than 0.64 (random close packing), maximum value that can be explored with hard spheres in disordered phase. It is even larger than 1 which is consistent with the picture of soft colloids than can interpenetrate and thus be compressed. We now consider the error bar on the volume fraction. An error bar of 8% on the radius in DLS translates into an error bar on the volume fraction of 25%. With a 6% error bar on the radius in microrheology, we get an error bar of 20%. This simply illustrates how a description of concentrated solutions in terms of volume fractions with an unreasonable number of significant digits, without any error bar, and above all an overly impressive fit to the hard sphere formalism, is not relevant.

3 Conclusion

We have studied the rheology and temporal dynamics of globular BSA protein solutions over a wide concentration range 1 – 55 g/dL. Under our experimental conditions, the BSA solutions are homogeneous and viscous liquids at all concentration, when probed at the micrometer scale with particle tracking microrheology. At high concentration, we observe a drastic increase in viscosity and capture slow dynamics with collective rearrangements, as well as fluctuating and mild aging of soft spheres with dynamic light scattering. This soft-sphere dynamics suggests that the proteins rearrange and interpenetrate at high concentrations, making the volume fraction calculated from a constant parameter – equivalent sphere radius or voluminosity – over the entire concentration range inadequate. We chose to present our results as a function of solution concentration, measured independently by Bradford tests. Our study illustrates the limitations of the colloidal hard sphere formalism applied to the globular protein BSA, with the volume fraction as control parameter.

A Microrheology and turbidity of BSA solutions

We present in Figure 6 the mean-squared displacements (MSD) of tracer beads in BSA solutions with increasing concentration 18, 33, 46, 50 g/dL. At all concentration, the MSD is linear with time, which is the signature of a viscous fluid (no elasticity) at the probed micrometric scale. For each concentration, the different beads have the same MSD revealing that the BSA is spatially homogeneous, even at very high concentrations. BSA solutions remain clear and non-turbid at all concentrations, as can be seen in Figure 7.

References

1. Yadav, S., Shire, S. J. & Kalonia, D. S. Viscosity analysis of high concentration bovine serum albumin aqueous solutions. *Pharm. Res.* **28**, 1973–1983, DOI: [10.1007/s11095-011-0424-7](https://doi.org/10.1007/s11095-011-0424-7) (2011).
2. Bucciarelli, S. *et al.* Dramatic influence of patchy attractions on short-time protein diffusion under crowded conditions. *Sci. Adv.* **2**, e1601432 (2016).
3. Cardinaux, F. *et al.* Cluster-driven dynamical arrest in concentrated lysozyme solutions. *J. Phys. Chem. B* **115**, 7227–7237 (2011).
4. Zhou, H.-X., Rivas, G. & Minton, A. Macromolecular crowding and confinement: Biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 375–97 (2008).
5. Fernandez, C. & Minton, A. Static light scattering from concentrated protein solutions ii: Experimental test of theory for protein mixtures and weakly self-associating proteins. *Biophys. J.* **96**, 1992–1998 (2009).
6. Jezek, J. *et al.* Viscosity of concentrated therapeutic protein compositions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 1107–1117 (2011).

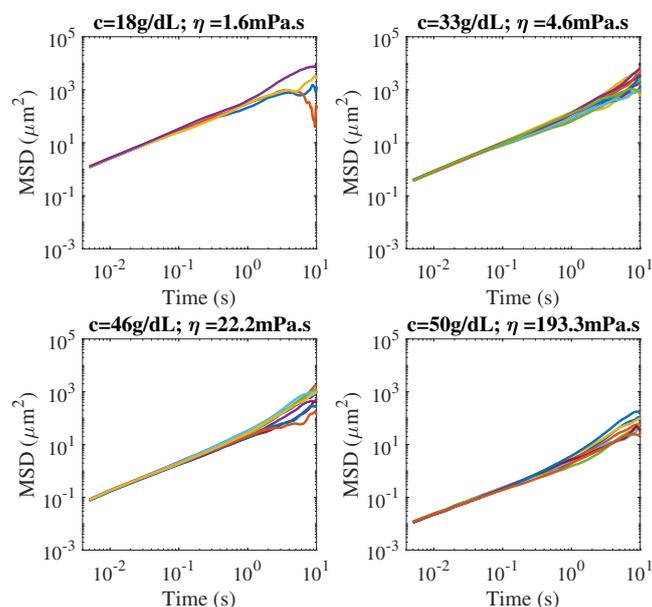


Figure 6. Mean-squared displacement (MSD) of latex beads in BSA solutions with increasing concentration at $T = 25^\circ\text{C}$. The BSA solutions are viscous fluids as characterised by the linear dependency of the MSD with time. They are also spatially homogeneous, even at very high concentrations, since different tracers placed at different locations in the sample have the same MSD.

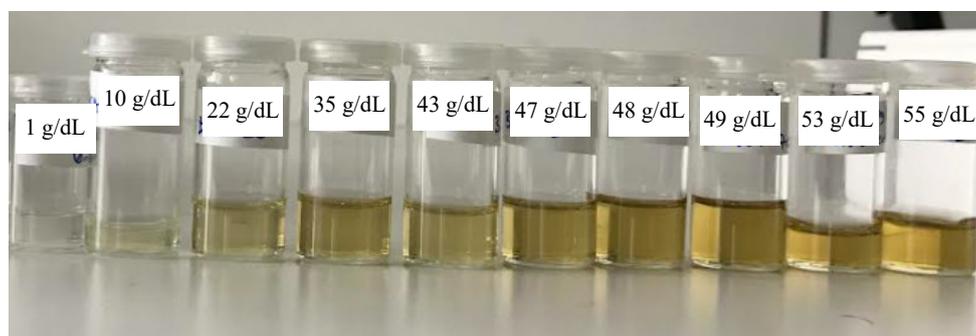


Figure 7. Appearance of the BSA solutions in the concentration range studied. The solutions remain transparent, without turbidity.

7. Stradner, A. & Schurtenberge, P. Potential and limits of a colloid approach to protein solutions. *Soft Matter* **16**, 307–323, DOI: [10.1039/c9sm01953g](https://doi.org/10.1039/c9sm01953g) (2020).
8. Sarangapani, P. S., Hudson, S. D., Jones, L., Ronald, Douglas, J. F. & Pathak, J. A. Critical examination of the colloidal particle model of globular proteins. *Biophys. J.* **108**, 724–737 (2015).
9. Sarangapani, P. S., Hudson, S. D., Migler, K. B. & Pathak, J. A. The limitations of an exclusively colloidal view of protein solution hydrodynamics and rheology. *Biophys. J.* **105**, 2418–2426, DOI: [10.1016/j.bpj.2013.10.012](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.10.012) (2013).
10. Foffi, G. *et al.* Hard sphere-like glass transition in eye lens alpha-crystallin solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 16748–16753, DOI: [10.1073/pnas.1406990111](https://doi.org/10.1073/pnas.1406990111) (2014).
11. Garting, T. & Stradner, A. Optical microrheology of protein solutions using tailored nanoparticles. *Small* **14**, 1801548, DOI: [10.1002/smll.201801548](https://doi.org/10.1002/smll.201801548) (2018).

12. Liu, J., Nguyen, M., Andya, J. & Shire, S. Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* **94**, 1928–1940 (2005).
13. Begam, N. *et al.* Packing and dynamics of a protein solution approaching the jammed state. *Soft Matter* **16**, 7751–7759, DOI: [10.1039/D0SM00962H](https://doi.org/10.1039/D0SM00962H) (2020).
14. Brownsey, G. J., Noel, T. R., Parker, R. & Ring, S. G. The glass transition behavior of the globular protein bovine serum albumin. *Biophys. J.* **85**, 3943–3950, DOI: [10.1016/S0006-3495\(03\)74808-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74808-5) (2003).
15. Josephson, L. L., Furst, E. M. & Galush, W. J. Particle tracking microrheology of protein solutions. *J. Rheol.* **60**, 531–540, DOI: [10.1122/1.4948427](https://doi.org/10.1122/1.4948427) (2016).
16. Tu, R. S. & Breedveld, V. Microrheological detection of protein unfolding. *Phys. Rev. E* **72**, 041914, DOI: [10.1103/PhysRevE.72.041914](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.72.041914) (2005).
17. Uversky, V. N. & Fink, A. L. The chicken-egg scenario of protein folding revisited. *FEBS Lett.* **515**, 79–83, DOI: [10.1016/S0014-5793\(02\)02441-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02441-9) (2002).
18. Jachimiska, B., Wasilewska, M. & Adamczyk, Z. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir* **24**, 6866 – 6872, DOI: [10.1021/la800548p](https://doi.org/10.1021/la800548p) (2008).
19. Waigh, T. A. Microrheology of complex fluids. *Rep. Prog. Phys.* **68**, 685–742 (2005).
20. Waigh, T. A. Advances in the microrheology of complex fluids. *Rep. Prog. Phys.* **79**, 074601 (2016).
21. Colin, R. *et al.* Spatially heterogeneous dynamics in a thermosensitive soft suspension before and after the glass transition. *Soft Matter* **7**, 4504, DOI: [10.1039/c0sm01184c](https://doi.org/10.1039/c0sm01184c) (2011).
22. Rasband, W. *ImageJ, U. S. Natl. Institutes Heal. Bethesda, Maryland, USA* DOI: <https://imagej.nih.gov/ij/> (1997-2018).
23. Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilche. *Ann. Phys.* **18**, 549–560 (1905).
24. Mason, T. Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized stokes-einstein equation. *Rheol. Acta* **39**, 371–378 (2000).
25. Parker, R., R., N. T., J., B. G., K., L. & G., R. S. The nonequilibrium phase and glass transition behavior of beta-lactoglobulin. *Biophys. J.* **89**, 1227 – 1236 (2005).
26. Sharma, V., Jaishankar, A., Wang, Y.-C. & McKinley, G. H. Rheology of globular proteins: apparent yield stress, high shear rate viscosity and interfacial viscoelasticity of bovine serum albumin solutions. *Soft Matter* **7**, 5150, DOI: [10.1039/c0sm01312a](https://doi.org/10.1039/c0sm01312a) (2011).
27. Valentine, M. *et al.* Colloid surface chemistry critically affects multiple particle tracking measurements of biomaterials. *Biophys. J.* **86**, 4004–4014, DOI: [10.1529/biophysj.103.037812](https://doi.org/10.1529/biophysj.103.037812) (2004).
28. McGrath, J., Hartwig, J. & Kuo, S. The mechanics of f-actin microenvironments depend on the chemistry of probing surfaces. *Biophys. J.* **79**, 3258, DOI: [10.1016/S0006-3495\(00\)76558-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76558-1) (2000).
29. De Kruif, C. G., Van Lersel, E. M. F., Vrij, A. & Russel, W. B. Hard sphere colloidal dispersions : viscosity as a function of shear rate and volume fraction. *The J. chemical physics* **83**, 4717–4725, DOI: [10.1063/1.448997](https://doi.org/10.1063/1.448997) (1985).
30. Cheng, Z., Zhu, J., Chaikin, P. M., Phan, S. & Russel, W. B. Nature of the divergence in low shear viscosity of colloidal hard-sphere dispersions. *Phys. Rev. E* **64**, 041405, DOI: [10.1103/PhysRevE.65.041405](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.041405) (2002).
31. *RCSB Protein Data Bank* DOI: <http://www.pdb.mde-berlin.de>.
32. Bartlett, P. & van Megen, W. *Mehta, A. (eds) Granular Matter*, chap. Physics of Hard-Sphere Colloidal Suspensions (Springer New York, 1994).
33. Philippe, A.-M. *et al.* Glass transition of soft colloids. *Phys. Rev. E* **97**, 040601, DOI: [10.1103/PhysRevE.97.040601](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.97.040601) (2018).

Author contributions

A. B. performed the experiments and processed the experimental data. A. B. and B. A. discussed the results and implications and wrote the manuscript.

Conflic of interests

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors would like to thank A. Pelosse and M. Oléron for the use of the capillary viscometer. They thank F. Carn for the fruitful discussions about dynamic light scattering, and F. Van Wijland for those on glass transition.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, nous avons été guidées par l'idée d'utiliser des rotors moléculaires dans les globules rouges afin de développer un nouvel outil d'analyse de leur rigidité, adapté à la recherche clinique. Il s'agit d'un projet expérimental et pluridisciplinaire qui a pris son essor à mon arrivée au laboratoire. Dans ce manuscrit, une étude annexe sur la rhéologie de solutions de BSA concentrées est également présentée.

J'ai dans un premier temps caractérisé la réponse du rotor moléculaire DASPI, sélectionné pour ses propriétés spectrales adaptées à l'hémoglobine. Le DASPI agit comme une sonde de viscosité dans les fluides simples, où son intensité de fluorescence suit une relation de Förster-Hoffmann avec la viscosité. Dans des solutions de protéines, nous montrons que la viscosité n'est plus le paramètre pertinent pour décrire la réponse du rotor. Le DASPI agit plutôt comme sonde d'environnement via la concentration protéinaire. Cette étude fournit une première étude quantitative de la réponse d'un rotor moléculaire en milieu protéinaire. Pour compléter ces travaux, des recherches permettant de comprendre le mécanisme d'interaction rotor-protéine au niveau moléculaire seront les bienvenues.

Dans un second temps, nous avons introduit le DASPI dans des globules rouges sains. Nous nous intéressons au processus de pénétration du rotor dans les GRs et étudions les réponses respectives des membranes et du cytosol. Nous montrons alors que lorsque les mesures de fluorescence sont réalisées en microscopie de fluorescence, dispositif expérimental privilégié pour la rapidité de l'analyse, environ 70% du signal provient du cytosol, ce qui fait du DASPI une sonde intracellulaire. Le cœur de ce travail a ensuite consisté à montrer que le DASPI permettait de distinguer des GRs de rigidité variable. Avec deux preuves de concept, en induisant une rigidification des GRs par contrôle de température, ou en comparant des échantillons de MCHC variable, nous faisons alors éclore notre nouvelle technique de nanorhéologie.

Avec la nanorhéologie, nous avons exploré différents aspects liés à la caractérisation de sang sain et pathologique. La technique se montre particulièrement intéressante pour sonder les propriétés individuelles des GRs et leurs hétérogénéités au sein d'un échantillon. Elle se distingue ainsi des mesures populationnelles de déformabilité comme l'ektacytométrie. Le couplage des informations liées à la morphologie des GRs et à leur rigidité permet de sélectionner et d'étudier de sous-populations au sein d'un échantillon. Pour une population de GRs, nous avons montré que l'hétérogénéité de la distribution d'intensité reflétait l'hétérogénéité des propriétés intrinsèques des GRs. Il sera pertinent d'explorer l'influence des différentes sources d'hétérogénéité. En particulier, la concentration interne en DASPI dans les GRs ayant un impact direct sur le signal de fluorescence, il sera nécessaire d'étudier comment la pénétration du rotor est influencée par la rigidité des membranes et la morphologie des GRs.

La nanorhéologie a été testée sur quelques échantillons de GRs drépanocytaires. Nous montrons qu'elle permet de les distinguer des échantillons sains par l'hétérogénéité de morphologie et la présence de spots lumineux très fluorescents. La comparaison entre plusieurs échantillons drépanocytaires montre une grande variabilité de la réponse du DASPI entre eux, bien plus importante que celle existante entre individus sains. Nous identifions avec la nanorhéologie des indicateurs qui seront à mettre en parallèle avec les biomarqueurs connus de la pathologie et avec les profils cliniques des donneurs. L'étude des GRs drépanocytaires en conditions désoxygénées se montre prometteuse, elle pourrait permettre de distinguer des sous-populations de GRs

qui répondent de manière spécifique à la désoxygénation. Ce nouveau biomarqueur pourra alors être testé au cours d'une étude clinique comme outil de suivi et de prédiction des crises vaso-occlusives. L'utilisation du DASPI pourra également être étendue à d'autres pathologies érythrocytaires. En particulier, nos résultats semblent indiquer une différence dans la réponse du rotor selon le type d'Hb (HbA, HbS, HbF). L'étude de pathologies rares affectant l'hémoglobine en nanorhéologie est donc une piste intéressante.

Dans ce travail, le globule rouge sain se présente comme une cellule modèle car il est simplement constitué d'une membrane englobant une solution homogène d'hémoglobine. Utiliser un rotor dans des cellules plus complexes pour étudier leur rhéologie intracellulaire nécessitera forcément de nouvelles étapes de calibration et une adaptation du protocole expérimental, comme c'est déjà le cas pour les GRs drépanocytaires. Au cours de ma thèse, nous avons pu commencer un tel travail avec Sandrine Adiba, biologiste à l'ENS, sur des amibes. Ces cellules ont la capacité de s'adapter à la rigidité de leur substrat. Selon nos premières observations, le DASPI permettrait de distinguer des sous-populations de cellules plus ou moins adhésives. On observe donc encore une fois que même si le rotor n'est pas utilisé pour faire une mesure directe de viscosité intracellulaire, sa présence et sa réponse nous permettent de détecter des variations des propriétés des cellules – ici l'adhésivité – au sein d'une population.

De manière plus générale, ma thèse montre qu'il est possible d'utiliser les rotors moléculaires en milieu biologique de manière plus quantitative qu'actuellement, en analysant les mesures d'intensité de fluorescence en rapport avec une modélisation spécifique du système étudié. En ce qui concerne les globules rouges, ces travaux ouvrent la voie vers l'utilisation de rotors moléculaires pour le suivi de pathologies érythrocytaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABOU, B. *et al.* Extensive collection of femtolitre pad secretion droplets in the beetle *Leptinotarsa decemlineata* allows nanolitre microrheology. *Journal of The Royal Society Interface* **7**, 1745-1752 (2010).
2. MENZEL, F. *et al.* Communication versus waterproofing: the physics of insect cuticular hydrocarbons. *Journal of Experimental Biology* **222**, jeb210807 (2019).
3. DANIELS, B. R. *et al.* Differences in the microrheology of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biophysical journal* **99**, 3563-3570 (2010).
4. FABRY, B. *et al.* Scaling the microrheology of living cells. *Physical review letters* **87**, 148102 (2001).
5. MASSIERA, G., VAN CITTERS, K. M., BIANCANIELLO, P. L. & CROCKER, J. C. Mechanics of single cells: rheology, time dependence, and fluctuations. *Biophysical Journal* **93**, 3703-3713 (2007).
6. COLIN, R. *et al.* Spatially heterogeneous dynamics in a thermosensitive soft suspension before and after the glass transition. *Soft Matter* **7**, 4504-4514 (2011).
7. TSENG, Y., KOLE, T. P. & WIRTZ, D. Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophysical journal* **83**, 3162-3176 (2002).
8. VALENTINE, M. T. *et al.* Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking. *Physical Review E* **64**, 061506 (2001).
9. BREEDVELD, V. & PINE, D. J. Microrheology as a tool for high-throughput screening. *Journal of Materials Science* **38**, 4461-4470 (2003).
10. POTTIER, N. *Physique statistique hors équilibre* EDP Sciences (2007).
11. MASON, T. G. & WEITZ, D. A. Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Physical review letters* **74**, 1250 (1995).
12. WAIGH, T. A. Microrheology of complex fluids. *Reports on progress in physics* **68**, 685 (2005).
13. De SANTÉ, H. A. Lecture critique de l'hémogramme : valeurs seuils à reconnaître comme probablement pathologiques et principales variations non pathologiques. (1997).
14. GIFFORD, S. C. *et al.* Parallel microchannel-based measurements of individual erythrocyte areas and volumes. *Biophysical journal* **84**, 623-633 (2003).
15. Von TEMPELHOFF, G.-E. *et al.* Correlation between blood rheological properties and red blood cell indices (MCH, MCV, MCHC) in healthy women. *Clinical hemorheology and microcirculation* **62**, 45-54 (2016).
16. HANEY, C. R., BUEHLER, P. W. & GULATI, A. Purification and chemical modifications of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers. *Advanced drug delivery reviews* **40**, 153-169 (2000).
17. ERICKSON, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online* **11**, 32-51 (2009).
18. CHIEN, S., USAMI, S. & BERTLES, J. F. Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *Journal of Clinical Investigation* **49**, 623-634 (1970).

19. COKELET, G. R. & MEISELMAN, H. J. Rheological comparison of hemoglobin solutions and erythrocyte suspensions. *Science* **162**, 275-277 (1968).
20. MONKOS, K. Viscometric study of human, bovine, equine and ovine haemoglobin in aqueous solution. *International journal of biological macromolecules* **16**, 31-35 (1994).
21. OKUDA, M. I. Concentration dependence of Brownian motion and the viscosity of hemoglobin solutions. *Japanese journal of applied physics* **36**, 3786 (1997).
22. ROSS, P. D. & MINTON, A. P. Hard quasispherical model for the viscosity of hemoglobin solutions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **76**, 971-976 (1977).
23. MOONEY, M. The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles. *Journal of Colloid Science* **6**, 162-170 (1951).
24. RENOUX, C. *et al.* Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition. *Scientific reports* **9**, 1-7 (2019).
25. NAMVAR, A. *et al.* Surface area-to-volume ratio, not cellular viscoelasticity, is the major determinant of red blood cell traversal through small channels. *Cellular microbiology* **23**, e13270 (2021).
26. DIEZ-SILVA, M., DAO, M., HAN, J., LIM, C. T. & SURESH, S. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. *MRS Bulletin* **35**, 382-388 (2010).
27. SAFEUKUI, I. *et al.* Quantitative assessment of sensing and sequestration of spherocytic erythrocytes by the human spleen. *Blood* **120**, 424-430 (2012).
28. MUSIELAK, M. Red blood cell-deformability measurement: review of techniques. *Clinical hemorheology and microcirculation* **42**, 47-64 (2009).
29. HOCHMUTH, R. M. & WAUGH, R. E. Erythrocyte Membrane Elasticity and Viscosity. *Annual Review of Physiology* **49**, 209-219 (1987).
30. EVANS, E. A. & LA CELLE, P. L. Intrinsic material properties of the erythrocyte membrane indicated by mechanical analysis of deformation. *Blood* **45**, 29-43 (1975).
31. SHIGA, T., MAEDA, N. & KON, K. Erythrocyte rheology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **10**, 9-48 (1990).
32. HOCHMUTH, R. M. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics* **33**, 15-22 (2000).
33. WAUGH, R. E. & AGRE, P. Reductions of erythrocyte membrane viscoelastic coefficients reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *Journal of Clinical Investigation* **81**, 133-141 (1988).
34. GANGOTRA, A. & WILLMOTT, G. R. Mechanical properties of bovine erythrocytes derived from ion current measurements using micropipettes. *Bioelectrochemistry* **128**, 204-210 (2019).
35. HÉNON, S., LENORMAND, G., RICHERT, A. & GALLET, F. A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers. *Biophysical Journal* **76**, 1145-1151 (1999).
36. DAO, M., LIM, C. & SURESH, S. Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* **51**, 2259-2280 (2003).
37. SLEEP, J., WILSON, D., SIMMONS, R. & GRATZER, W. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study. *Biophysical journal* **77**, 3085-3095 (1999).

38. NOWAKOWSKI, R., LUCKHAM, P. & WINLOVE, P. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1514**, 170-176 (2001).
39. MACIASZEK, J. L., ANDEMARIAM, B. & LYKOTRAFITIS, G. Microelasticity of red blood cells in sickle cell disease. *The Journal of Strain Analysis for Engineering Design* **46**, 368-379 (2011).
40. MACIASZEK, J. L. & LYKOTRAFITIS, G. Sickle cell trait human erythrocytes are significantly stiffer than normal. *Journal of Biomechanics* **44**, 657-661 (2011).
41. PUIG-DE-MORALES-MARINKOVIC, M., TURNER, K. T., BUTLER, J. P., FREDBERG, J. J. & SUR-ESH, S. Viscoelasticity of the human red blood cell. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **293**, C597-C605 (2007).
42. AMIN, M. S. *et al.* Microrheology of red blood cell membranes using dynamic scattering microscopy. *Optics express* **15**, 17001-17009 (2007).
43. MATTHEWS, K., LAMOUREUX, E. S., MYRAND-LAPIERRE, M.-E., DUFFY, S. P. & MA, H. Technologies for measuring red blood cell deformability. *Lab on a Chip* (2022).
44. GUO, Q. *et al.* Microfluidic analysis of red blood cell deformability. *Journal of biomechanics* **47**, 1767-1776 (2014).
45. BRANSKY, A., KORIN, N., NEMIROVSKI, Y. & DINNAR, U. Correlation between erythrocytes deformability and size: a study using a microchannel based cell analyzer. *Microvascular research* **73**, 7-13 (2007).
46. FORSYTH, A. M., WAN, J., RISTENPART, W. D. & STONE, H. A. The dynamic behavior of chemically “stiffened” red blood cells in microchannel flows. *Microvascular research* **80**, 37-43 (2010).
47. SHEVKOPLYAS, S. S., YOSHIDA, T., GIFFORD, S. C. & BITENSKY, M. W. Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device. *Lab on a Chip* **6**, 914-920 (2006).
48. BOW, H. *et al.* A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria. *Lab on a Chip* **11**, 1065-1073 (2011).
49. DOBBE, J. *et al.* Analyzing red blood cell-deformability distributions. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **28**, 373-384 (2002).
50. DOBBE, J., STREEKSTRA, G., HARDEMAN, M., INCE, C. & GRIMBERGEN, C. Measurement of the distribution of red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* **50**, 313-325 (2002).
51. DOBBE, J., HARDEMAN, M., STREEKSTRA, G. & GRIMBERGEN, C. Validation and application of an automated rheoscope for measuring red blood cell deformability distributions in different species. *Biorheology* **41**, 65-77 (2004).
52. KIM, J., LEE, H. & SHIN, S. Advances in the measurement of red blood cell deformability: A brief review. *Journal of Cellular Biotechnology* **1**, 63-79 (2015).
53. BOSCH, F. *et al.* Characteristics of red blood cell populations fractionated with a combination of counterflow centrifugation and Percoll separation (1992).
54. WILLEKENS, F., BOSCH, F., ROERDINKHOLDER-STOELWINDER, B., GROENEN-DÖPP, Y. & WERRE, J. Quantification of loss of haemoglobin components from the circulating red blood cell in vivo. *European journal of haematology* **58**, 246-250 (1997).
55. ARTMANN, G., KELEMEN, C., PORST, D., BÜLDT, G. & CHIEN, S. Temperature transitions of protein properties in human red blood cells. *Biophysical Journal* **75**, 3179-3183 (1998).

56. KELEMEN, C., CHIEN, S. & ARTMANN, G. Temperature transition of human hemoglobin at body temperature: effects of calcium. *Biophysical journal* **80**, 2622-2630 (2001).
57. LECKLIN, T., EGGINTON, S. & NASH, G. B. Effect of temperature on the resistance of individual red blood cells to flow through capillary-sized apertures. *Pflügers Archiv* **432**, 753-759 (1996).
58. XU, Z. *et al.* Stiffness increase of red blood cells during storage. *Microsystems & Nanoengineering* **4**, 1-6 (2018).
59. PARSHINA, E. Y., YUSIPOVICH, A., BRAZHE, A., SILICHEVA, M. & MAKSIMOV, G. Heat damage of cytoskeleton in erythrocytes increases membrane roughness and cell rigidity. *Journal of Biological Physics* **45**, 367-377 (2019).
60. PUCKERIDGE, M., CHAPMAN, B. E., CONIGRAVE, A. D. & KUCHEL, P. W. Membrane flickering of the human erythrocyte: physical and chemical effectors. *European Biophysics Journal* **43**, 169-177 (2014).
61. YAMAİKINA, M., MANSUROV, V. & IVASHKEVICH, É. Thermal destruction of erythrocyte spectrin: rheology, deformability, and stability with respect to detergents. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics* **69**, 283-286 (1996).
62. BARABINO, G. A., PLATT, M. O. & KAUL, D. K. Sick Cell Biomechanics. en. *Annual Review of Biomedical Engineering* **12**, 345-367 (2010).
63. KAUL, D. K., FABRY, M. E., WINDISCH, P., BAEZ, S. & NAGEL, R. L. Erythrocytes in sickle cell anemia are heterogeneous in their rheological and hemodynamic characteristics. en. *Journal of Clinical Investigation* **72**, 22-31 (1983).
64. LONGO, D. L., PIEL, F. B., STEINBERG, M. H. & REES, D. C. Sick cell disease. *N Engl J Med* **20**, 1561-1573 (2017).
65. BALLAS, S. K. & MOHANDAS, N. Sick red cell microrheology and sickle blood rheology. *Microcirculation* **11**, 209-225 (2004).
66. VALEUR, B. & BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular fluorescence: principles and applications* (John Wiley & Sons, 2012).
67. JABŁOŃSKI, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik* **94**, 38-46 (jan. 1935).
68. STOKES, G. G. On the change of refrangibility of light. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 463-562 (1852).
69. ROTKIEWICZ, K., GRELLMANN, K. & GRABOWSKI, Z. Reinterpretation of the anomalous fluorescence of pn, n-dimethylamino-benzonitrile. *Chemical Physics Letters* **19**, 315-318 (1973).
70. ALLEN, B. D., BENNISTON, A. C., HARRIMAN, A., ROSTRON, S. A. & YU, C. The photophysical properties of a julolidene-based molecular rotor. *Physical Chemistry Chemical Physics* **7**, 3035-3040 (2005).
71. KUNG, C. E. & REED, J. K. Microviscosity measurements of phospholipid bilayers using fluorescent dyes that undergo torsional relaxation. *Biochemistry* **25**, 6114-6121 (1986).
72. HAIDEKKER, M., BRADY, T., LICHLTYER, D. & THEODORAKIS, E. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorganic chemistry* **33**, 415-425 (2005).
73. FÖRSTER, T. & HOFFMANN, G. Die viskositätsabhängigkeit der fluoreszenzquantenausbeuten einiger farbstoffsysteme. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **75**, 63-76 (1971).

74. VOGEL, M. & RETTIG, W. Excited state dynamics of triphenylmethane-dyes used for investigation of microviscosity effects. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **91**, 1241-1247 (1987).
75. LOUTFY, R. O. Fluorescence probes for polymer free-volume, 429-448 (1986).
76. LAW, K. Fluorescence probe for microenvironments: anomalous viscosity dependence of the fluorescence quantum yield of pN, N-dialkylaminobenzylidenemalononitrile in 1-alkanols. *Chemical Physics Letters* **75**, 545-549 (1980).
77. WANG, K., SHI, W., JIA, J., CHEN, S. & MA, H. Characterization of 2-phenylbenzo [g] quinoxaline derivatives as viscosity-sensitive fluorescent probes. *Talanta* **77**, 1795-1799 (2009).
78. HAIDEKKER, M. A. & THEODORAKIS, E. A. Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors. *Journal of biological engineering* **4**, 1-14 (2010).
79. SCHUDDERBOOM, W. *et al.* Excited-state dipole moments of dual fluorescent 4-(dialkylamino) benzonitriles: influence of alkyl chain length and effective solvent polarity. *The Journal of Physical Chemistry* **96**, 10809-10819 (1992).
80. DRAGAN, A., GRAHAM, A. E. & GEDDES, C. D. Fluorescence-based broad dynamic range viscosity probes. *Journal of fluorescence* **24**, 397-402 (2014).
81. VYVNIAUSKAS, A. *et al.* Unravelling the effect of temperature on viscosity-sensitive fluorescent molecular rotors. *Chemical science* **6**, 5773-5778 (2015).
82. IWAKI, T., TORIGOE, C., NOJI, M. & NAKANISHI, M. Antibodies for fluorescent molecular rotors. *Biochemistry* **32**, 7589-7592 (1993).
83. KUBÁNKOVÁ, M. *et al.* Probing supramolecular protein assembly using covalently attached fluorescent molecular rotors. *Biomaterials* **139**, 195-201 (2017).
84. MA, C. *et al.* A minireview of viscosity-sensitive fluorescent probes: design and biological applications. *Journal of Materials Chemistry B* **8**, 9642-9651 (2020).
85. MIAO, W., YU, C., HAO, E. & JIAO, L. Functionalized BODIPYs as fluorescent molecular rotors for viscosity detection. *Frontiers in chemistry* **7**, 825 (2019).
86. LEE, S.-C. *et al.* Fluorescent molecular rotors for viscosity sensors. *Chemistry—A European Journal* **24**, 13706-13718 (2018).
87. ZHOU, F. *et al.* *Molecular rotors as fluorescent viscosity sensors: molecular design, polarity sensitivity, dipole moments changes, screening solvents, and deactivation channel of the excited states* 2011.
88. LOUTFY, R. O. & TEEGARDEN, D. M. Effect of polymer chain tacticity on the fluorescence of molecular rotors. *Macromolecules* **16**, 452-456 (1983).
89. ZHU, D., HAIDEKKER, M. A., LEE, J.-S., WON, Y.-Y. & LEE, J. C.-M. Application of molecular rotors to the determination of the molecular weight dependence of viscosity in polymer melts. *Macromolecules* **40**, 7730-7732 (2007).
90. FURUNO, T. *et al.* A fluorescent molecular rotor probes the kinetic process of degranulation of mast cells. *Immunology letters* **33**, 285-288 (1992).
91. VIRIOT, M. *et al.* Molecular rotors as fluorescent probes for biological studies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* **19**, 151-160 (1998).
92. HAIDEKKER, M. A., L'HEUREUX, N. & FRANGOS, J. A. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **278**, H1401-H1406 (2000).

93. HAWE, A., FILIPE, V. & JISKOOT, W. Fluorescent molecular rotors as dyes to characterize polysorbate-containing IgG formulations. *Pharmaceutical research* **27**, 314-326 (2010).
94. KUNG, C. E. & REED, J. K. Fluorescent molecular rotors: a new class of probes for tubulin structure and assembly. *Biochemistry* **28**, 6678-6686 (1989).
95. SAWADA, S., IIO, T., HAYASHI, Y. & TAKAHASHI, S. Fluorescent rotors and their applications to the study of GF transformation of Actin. *Analytical biochemistry* **204**, 110-117 (1992).
96. THOMPSON, A. J. *et al.* Molecular rotors provide insights into microscopic structural changes during protein aggregation. *The Journal of Physical Chemistry B* **119**, 10170-10179 (2015).
97. BAI, Y. & LIU, Y. Illuminating Protein Phase Separation: Reviewing Aggregation-Induced Emission, Fluorescent Molecular Rotor and Solvatochromic Fluorophore Based Probes. *Chemistry–A European Journal* **27**, 14564-14576 (2021).
98. GOH, W. L. *et al.* Molecular rotors as conditionally fluorescent labels for rapid detection of biomolecular interactions. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 6159-6162 (2014).
99. YU, W.-T., WU, T.-W., HUANG, C.-L., CHEN, I.-C. & TAN, K.-T. Protein sensing in living cells by molecular rotor-based fluorescence-switchable chemical probes. *Chemical science* **7**, 301-307 (2016).
100. GATZOGIANNIS, E. *et al.* Mapping protein-specific micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag. *Chemical Communications* **48**, 8694-8696 (2012).
101. LOUTFY, R. O. & LAW, K. Y. Electrochemistry and spectroscopy of intramolecular charge-transfer complexes. pN, N-dialkylaminobenzylidenemalononitriles. *The Journal of Physical Chemistry* **84**, 2803-2808 (1980).
102. KUIMOVA, M. K. Mapping viscosity in cells using molecular rotors. *Physical Chemistry Chemical Physics* **14**, 12671-12686 (2012).
103. SAVIN, T. & DOYLE, P. S. Static and Dynamic Errors in Particle Tracking Microrheology. en. *Biophysical Journal* **88**, 623-638 (2005).
104. WILHELM, S., GRÖBLER, G., GLUCH, M. & HEINZ, H. *Confocal Laser Scanning Microscopy* (Microscopy from Carl Zeiss Principles).
105. HUFF, J. The Airyscan detector from ZEISS: confocal imaging with improved signal-to-noise ratio and super-resolution. *Nature methods* **12**, i-ii (2015).
106. ZHU, R., AVSIEVICH, T., POPOV, A. & MEGLINSKI, I. Optical tweezers in studies of red blood cells. *Cells* **9**, 545 (2020).
107. CHOWDHURY, A., WAGHMARE, D., DASGUPTA, R. & MAJUMDER, S. K. Red blood cell membrane damage by light-induced thermal gradient under optical trap. *Journal of biophotonics* **11**, e201700222 (2018).
108. THEIS, J. *et al.* Effects of laser irradiation on human erythrocytes: Considerations concerning clinical laser angioplasty. *Clinical cardiology* **6**, 396-398 (1983).
109. SCHOBER, P., BOER, C. & SCHWARTE, L. A. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia & Analgesia* **126**, 1763-1768 (2018).
110. BRIOLE, A., PODGORSKI, T. & ABOU, B. Molecular rotors as intracellular probes of red blood cell stiffness. *Soft Matter* **17**, 4525-4537 (2021).
111. SPIRO, T. G. Resonance Raman spectroscopic studies of heme proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics* **416**, 169-189 (1975).

112. WATERMAN, M. R. in *Methods in enzymology* 456-463 (Elsevier, 1978).
113. HOWELL, S., DAKANALI, M., THEODORAKIS, E. A. & HAIDEKKER, M. A. Intrinsic and extrinsic temperature-dependency of viscosity-sensitive fluorescent molecular rotors. *Journal of fluorescence* **22**, 457-465 (2012).
114. HAIDEKKER, M. A. & THEODORAKIS, E. A. Molecular rotors—fluorescent biosensors for viscosity and flow. *Organic & biomolecular chemistry* **5**, 1669-1678 (2007).
115. GARTING, T. & STRADNER, A. Optical microrheology of protein solutions using tailored nanoparticles. *Small* **14**, 1801548 (2018).
116. VALENTINE, M. *et al.* Colloid surface chemistry critically affects multiple particle tracking measurements of biomaterials. *Biophysical journal* **86**, 4004-4014 (2004).
117. MCGRATH, J. L., HARTWIG, J. H. & KUO, S. C. The mechanics of F-actin microenvironments depend on the chemistry of probing surfaces. *Biophysical Journal* **79**, 3258-3266 (2000).
118. JOSEPHSON, L. L., FURST, E. M. & GALUSH, W. J. Particle tracking microrheology of protein solutions. *Journal of Rheology* **60**, 531-540 (2016).
119. TU, R. S. & BREEDVELD, V. Microrheological detection of protein unfolding. *Physical Review E* **72**, 041914 (2005).
120. FRIEBEL, M. & MEINKE, M. Determination of the complex refractive index of highly concentrated hemoglobin solutions using transmittance and reflectance measurements. *Journal of Biomedical Optics* **10**, 064019 (2005).
121. BRIOLE, A. & ABOU, B. Molecular rotors in haemoglobin and bovine serum albumin proteins. *Journal of The Royal Society Interface* **19**, 20220709 (2022).
122. CHENG, Z., ZHU, J., CHAIKIN, P. M., PHAN, S.-E. & RUSSEL, W. B. Nature of the divergence in low shear viscosity of colloidal hard-sphere dispersions. *Physical Review E* **65**, 041405 (2002).
123. CHOI, G. & KRIEGER, I. Rheological studies on sterically stabilized model dispersions of uniform colloidal spheres: II. Steady-shear viscosity. *Journal of colloid and interface science* **113**, 101-113 (1986).
124. De KRUIF, C. d., van IERSEL, E., VRIJ, A. & RUSSEL, W. Hard sphere colloidal dispersions: Viscosity as a function of shear rate and volume fraction. *The Journal of chemical physics* **83**, 4717-4725 (1985).
125. PARKER, R., NOEL, T. R., BROWNSEY, G. J., LAOS, K. & RING, S. G. The nonequilibrium phase and glass transition behavior of β -lactoglobulin. *Biophysical Journal* **89**, 1227-1236 (2005).
126. BROWNSEY, G. J., NOEL, T. R., PARKER, R. & RING, S. G. The glass transition behavior of the globular protein bovine serum albumin. *Biophysical journal* **85**, 3943-3950 (2003).
127. SHARMA, V., JAISHANKAR, A., WANG, Y.-C. & MCKINLEY, G. H. Rheology of globular proteins: apparent yield stress, high shear rate viscosity and interfacial viscoelasticity of bovine serum albumin solutions. *Soft matter* **7**, 5150-5160 (2011).
128. FOFFI, G. *et al.* Hard sphere-like glass transition in eye lens α -crystallin solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 16748-16753 (2014).
129. SARANGAPANI, P. S., HUDSON, S. D., MIGLER, K. B. & PATHAK, J. A. The limitations of an exclusively colloidal view of protein solution hydrodynamics and rheology. *Biophysical journal* **105**, 2418-2426 (2013).
130. STRADNER, A. & SCHURTENBERGER, P. Potential and limits of a colloid approach to protein solutions. *Soft Matter* **16**, 307-323 (2020).

131. BATCHELOR, G. The effect of Brownian motion on the bulk stress in a suspension of spherical particles. *Journal of fluid mechanics* **83**, 97-117 (1977).
132. JACHIMSKA, B., WASILEWSKA, M. & ADAMCZYK, Z. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. *Langmuir* **24**, 6866-6872 (2008).
133. STADLER, A. M. *et al.* Hemoglobin dynamics in red blood cells: correlation to body temperature. *Biophysical journal* **95**, 5449-5461 (2008).
134. DIGEL, I. *et al.* Body temperature-related structural transitions of monotremal and human hemoglobin. *Biophysical journal* **91**, 3014-3021 (2006).
135. AROSIO, D., KWANSA, H. E., GERING, H., PISZCZEK, G. & BUCCI, E. Static and dynamic light scattering approach to the hydration of hemoglobin and its supertetramers in the presence of osmolites. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **63**, 1-11 (2002).
136. EVANS, E. & FUNG, Y.-C. Improved measurements of the erythrocyte geometry. *Microvascular research* **4**, 335-347 (1972).
137. HEINRICH, V., RITCHIE, K., MOHANDAS, N. & EVANS, E. Elastic thickness compressibility of the red cell membrane. *Biophysical Journal* **81**, 1452-1463 (2001).
138. BENNETT, V. & LORENZO, D. N. An adaptable spectrin/ankyrin-based mechanism for long-range organization of plasma membranes in vertebrate tissues. *Current topics in membranes* **77**, 143-184 (2016).
139. LUX IV, S. E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* **127**, 187-199 (2016).
140. SCHMID, M., VETTERLI, M. & WEGENER, K. *Polymer powders for laser-sintering: Powder production and performance qualification* in *AIP Conference Proceedings* **2065** (2019), 020008.
141. WAUGH, R. & EVANS, E. A. Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophysical journal* **26**, 115-131 (1979).
142. ABAY, A. *et al.* Glutaraldehyde—a subtle tool in the investigation of healthy and pathologic red blood cells. *Frontiers in physiology* **10**, 514 (2019).
143. JAFERZADEH, K., SIM, M., KIM, N. & MOON, I. Quantitative analysis of three-dimensional morphology and membrane dynamics of red blood cells during temperature elevation. *Scientific Reports* **9**, 1-9 (2019).
144. BOGDANOVA, A., KAESTNER, L., SIMIONATO, G., WICKREMA, A. & MAKHRO, A. Heterogeneity of red blood cells: causes and consequences. *Frontiers in Physiology* **11**, 392 (2020).
145. DEAN, L. & DEAN, L. *Blood groups and red cell antigens* (NCBI Bethesda, 2005).
146. BEREZINA, T. L. *et al.* Influence of storage on red blood cell rheological properties. *Journal of surgical research* **102**, 6-12 (2002).
147. KIRKPATRICK, U., ADAMS, R., LARDI, A. & MCCOLLUM, C. Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *British journal of haematology* **101**, 364-368 (1998).
148. SOLLBERGER, T. *et al.* Influence of prestorage leucocyte depletion and storage time on rheologic properties of erythrocyte concentrates. *Vox sanguinis* **82**, 191-197 (2002).
149. RAAT, N. J. *et al.* The effect of storage time of human red cells on intestinal microcirculatory oxygenation in a rat isovolemic exchange model. *Critical care medicine* **33**, 39-45 (2005).
150. RAAT, N. & INCE, C. Oxygenating the microcirculation: the perspective from blood transfusion and blood storage. *Vox sanguinis* **93**, 12-18 (2007).

151. OFFNER, P. J. Age of blood: does it make a difference? *Critical Care* **8**, 1-3 (2004).
152. TINMOUTH, A. *et al.* Clinical consequences of red cell storage in the critically ill. *Transfusion* **46**, 2014-2027 (2006).
153. BASRAN, S. *et al.* The association between duration of storage of transfused red blood cells and morbidity and mortality after reoperative cardiac surgery. *Anesthesia and analgesia* **103**, 15-20 (2006).
154. KOCH, C. G. *et al.* Red cell transfusion is associated with an increased risk for postoperative atrial fibrillation. *The Annals of thoracic surgery* **82**, 1747-1756 (2006).
155. KOCH, C. G. *et al.* Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *New England Journal of Medicine* **358**, 1229-1239 (2008).
156. PARK, H. *et al.* Measuring cell surface area and deformability of individual human red blood cells over blood storage using quantitative phase imaging. *Scientific reports* **6**, 1-10 (2016).
157. CLARK, M. R., MOHANDAS, N. & SHOHET, S. B. Osmotic gradient ektacytometry: comprehensive characterization of red cell volume and surface maintenance (1983).
158. PIEL, F. B., STEINBERG, M. H. & REES, D. C. Sick cell disease. *New England Journal of Medicine* **376**, 1561-1573 (2017).
159. NGO, D. A. *et al.* Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. *British journal of haematology* **156**, 259-264 (2012).
160. SEBASTIANI, P. *et al.* Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Bayesian modeling of genetic associations. *American journal of hematology* **83**, 189-195 (2008).
161. BALLAS, S. K. Pain management of sickle cell disease. *Hematology/Oncology Clinics* **19**, 785-802 (2005).
162. DEBAUN, M. R. Hydroxyurea therapy contributes to infertility in adult men with sickle cell disease: a review. *Expert review of hematology* **7**, 767-773 (2014).
163. SADAF, A. *et al.* Automated oxygen gradient ektacytometry: a novel biomarker in sickle cell anemia. *Frontiers in Physiology* **12**, 636609 (2021).
164. BANERJEE, R., NAGESHWARI, K. & PUNIYANI, R. The diagnostic relevance of red cell rigidity. *Clinical hemorheology and microcirculation* **19**, 21-24 (1998).
165. DU, E., DIEZ-SILVA, M., KATO, G. J., DAO, M. & SURESH, S. Kinetics of sickle cell biorheology and implications for painful vasoocclusive crisis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 1422-1427 (2015).
166. RAB, M. A. *et al.* Rapid and reproducible characterization of sickling during automated deoxygenation in sickle cell disease patients. *American journal of hematology* **94**, 575-584 (2019).
167. BEGAM, N. *et al.* Packing and dynamics of a protein solution approaching the jammed state. *Soft Matter* **16**, 7751-7759 (2020).
168. BRIOLE, A. & ABOU, B. Slow and fluctuating dynamics of concentrated solutions of BSA proteins. *in revision* (2023).
169. EINSTEIN, A. Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen. *Annalen der Physik* **324**, 289-306 (1906).
170. BATCHELOR, G. Brownian diffusion of particles with hydrodynamic interaction. *Journal of Fluid Mechanics* **74**, 1-29 (1976).

-
171. KRIEGER, I. M. & DOUGHERTY, T. J. A mechanism for non-Newtonian flow in suspensions of rigid spheres. *Transactions of the Society of Rheology* **3**, 137-152 (1959).
 172. KRIEGER, I. M. Rheology of monodisperse lattices. *Advances in Colloid and Interface science* **3**, 111-136 (1972).
 173. MOONEY, M. The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles. *Journal of colloid science* **6**, 162-170 (1951).
 174. FINSY, R. Particle sizing by quasi-elastic light scattering. *Advances in colloid and interface science* **52**, 79-143 (1994).
 175. BERNE, B. J. & PECORA, R. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics* (Courier Corporation, 2000).
 176. PROVENCHER, S. W. & ŠTĚPÁNEK, P. Global analysis of dynamic light scattering autocorrelation functions. *Particle & particle systems characterization* **13**, 291-294 (1996).
 177. KLEIN, R. & NÄGELE, G. Static and dynamic scattering by concentrated systems: theory. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **1**, 4-10 (1996).