



HAL
open science

Élasticité du squelette du globule rouge humain - une étude par pinces optiques -

Guillaume Lenormand

► **To cite this version:**

Guillaume Lenormand. Élasticité du squelette du globule rouge humain - une étude par pinces optiques -. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2001. Français. NNT : . tel-00001250

HAL Id: tel-00001250

<https://theses.hal.science/tel-00001250>

Submitted on 20 Mar 2002

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

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

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI

Spécialité :

Physique des Liquides

présentée par

Guillaume Lenormand

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet :

Élasticité du squelette du globule rouge humain

– une étude par pinces optiques –

soutenue le 10 octobre 2001 devant le jury composé de :

D. Barthès-Biesel

Présidente

P. Bassereau

Rapporteur

J. Ohayon

Rapporteur

F. Gallet

Directeur

R. Perzynski

F. Amblard

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI

Spécialité :

Physique des Liquides

présentée par

Guillaume Lenormand

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet :

Élasticité du squelette du globule rouge humain

– une étude par pinces optiques –

soutenue le 10 octobre 2001 devant le jury composé de :

D. Barthès-Biesel	Présidente
P. Bassereau	Rapporteur
J. Ohayon	Rapporteur
F. Gallet	Directeur
R. Perzynski	
F. Amblard	

Guillaume Lenormand

Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-chimique

Tour 33, 2^e étage, case courrier 7056

2, place Jussieu

F-75 251 Paris cedex 05, France

Tél : +33 (0)1 44 27 77 82

Fax : +33 (0)1 44 27 43 35

lenorman@ccr.jussieu.fr

guillaume.lenormand@free.fr

Remerciements

Ce travail, encadré par Sylvie Hénon et François Gallet, s'est déroulé au Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-Chimique.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Sylvie Hénon et à François Gallet pour leur encadrement. Ils ont toujours fait preuve d'une grande disponibilité et d'une infinie patience et cela malgré leurs nombreuses occupations. Je leur suis également très reconnaissant de m'avoir laissé une grande liberté dans le développement de ce sujet.

J'adresse mes sincères remerciements à Dominique Barthès-Biesel de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je remercie Patricia Bassereau et Jacques Ohayon d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, Régine Perzynski et François Amblard d'avoir fait partie du jury. L'intérêt qu'ils y ont porté à mon travail et les corrections qu'ils m'ont amenées à effectuer ont permis d'améliorer grandement ce manuscrit.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui ont rendu ce travail possible : Jacqueline Siméon et Alain Richert ont apporté le regard de biologiste qui me faisait défaut. Pierre Colinart a grandement contribué à résoudre mes problèmes quotidiens (chimie, eau Millipore...). Elsa Planterose a réalisé la partie électronique de la photodiode, et a toujours su répondre (et compatir) à mes problèmes informatiques. La chambre à écoulement a été conçue et réalisée par Jean-Louis Counord, Manuel Cuesta et Henri Del Gallo, que je remercie de leur aide précieuse.

Je remercie également tous ceux – et ils sont nombreux – qui m’ont autorisé à piller leur salle de manips, pour notamment y emprunter livres, pousse-seringues, générateurs de fonction, cartes d’acquisition vidéo, osmomètres, centrifugeuses, caméras, marqueurs fluorescents, ordinateurs, détections synchrones...et un raton laveur indispensables à mes expériences.

Je voudrais exprimer ma gratitude à tous les membres du LBHP : les étudiants, les chercheurs, les techniciens, le personnel administratif... qui ont rendu ces trois années de travail fortes agréables.

Merci à mes collègues enseignants de Créteil. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Jacques Moscovici et Christian Régnaut pour leur accueil, leurs conseils et leurs soutiens tout au long de ces trois années.

Je tiens ici à rendre hommage à mes anciens professeurs qui ont su me transmettre leur amour de la Physique. Je tiens à citer tout particulièrement Murat Boratav pour m’avoir fait préférer la Physique aux Mathématiques, et Anne-Marie Cazabat qui m’a fait découvrir le monde passionnant de la matière molle.

Je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ce travail.

Je dédie ce travail à mon père, pour m’avoir constamment montré que tout est possible.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES	7
INTRODUCTION	13
CHAPITRE 1 : LE GLOBULE ROUGE HUMAIN	17
INTRODUCTION.....	17
1. FONCTION ET FORME DU GLOBULE ROUGE	17
2. STRUCTURE DE LA MEMBRANE.....	21
2.1 <i>La bicouche lipidique</i>	22
2.2 <i>Le squelette du globule rouge</i>	24
2.3 <i>Les liaisons squelette/bicouche lipidique</i>	30
3. ASPECTS MECANIQUES DE LA MEMBRANE	31
3.1 <i>Quelques notions d'élasticité bidimensionnelle</i>	31
3.2 <i>Élasticité linéaire bidimensionnelle en petites déformations</i>	32
3.3 <i>Élasticité de réseaux bidimensionnels parfaits de ressorts</i>	34
3.4 <i>Élasticité entropique</i>	34
3.5 <i>Et l'élasticité enthalpique ?</i>	37
4. ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR L'ELASTICITE DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE HUMAIN.....	37
4.1 <i>Rôle supposé de la bicouche lipidique et du squelette</i>	38
4.2 <i>Les expériences d'aspiration par micropipette</i>	38
4.4 <i>Mesure du module de courbure B de la membrane</i>	42
5. ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR L'ELASTICITE DU SQUELETTE	43
5.1 <i>Élasticité du squelette</i>	43
5.2 <i>Observation du comportement élastique d'un squelette libre</i>	44
5.3 <i>Estimation du rapport K_C/μ_C</i>	45

5.4 Simulations numériques de réseaux de ressorts.....	46
6. ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LA RAIDEUR D'UN FILAMENT DE SPECTRINE	47
6.1 Évaluation de ξ d'après la longueur de contour et la longueur bout-à-bout d'un filament de spectrine.....	47
6.2 Mesure de la longueur de persistance de dimères de spectrine en solution	47
6.3 Expérience de dépliage des séquences de base de la spectrine.....	48
6.4 Expérience de Svoboda et al. [1992].....	49
6.5 Bilan sur la longueur de persistance	50
CONCLUSION	50
CHAPITRE 2 : LES PINCES OPTIQUES	53
INTRODUCTION.....	53
1. PRINCIPE DES PINCES OPTIQUES.....	54
1.1 Description électromagnétisme ou régime de Rayleigh.....	56
1.2 Description d'optique géométrique ou régime de Mie.....	58
1.3 Cas intermédiaire.....	59
1.4 Choix de la longueur d'onde.....	59
2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	61
2.1 Schéma du dispositif expérimental.....	62
2.2 Description des différents éléments	62
2.3 Obtention, positionnement et déplacement de pinces multiples.....	65
3. CALIBRATION DES FORCES	66
3.1 Principe de l'étalonnage.....	66
3.2 Mesure de la force maximale.....	67
3.3 Mesure de la raideur du piège.....	71
3.4 Et pour les pinces multiples ?	73
4. DETECTEUR DE POSITION PAR PHOTODIODE	74
4.1 Principe.....	74
4.2 Schéma du dispositif.....	75
4.3 Étalonnage des forces avec le miroir 50/50.....	76

4.4 Test de la photodiode avec une bille isolée.....	76
CONCLUSION	78
CHAPITRE 3 : MODULE DE CISAILLEMENT DE LA MEMBRANE DU GLOBULE ROUGE	79
INTRODUCTION.....	79
1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	80
1.1 Préparation des échantillons de sang.....	80
1.2 Déroulement d'une mesure	81
2. MODELISATION DE LA MEMBRANE	83
2.1 Élasticité linéaire bidimensionnelle en petites déformations.....	84
2.2 Globules rouges discoïdes	85
2.3 Globules rouges sphériques.....	85
3. RESULTATS ET DISCUSSION	86
3.1 Temps de relaxation.....	86
3.2 Mesure sur globules rouges discoïdes et sphériques	87
3.3 Pourquoi μ est-il plus faible que celui mesuré par micropipette ?	90
CONCLUSION	92
ANNEXES DU CHAPITRE 3	93
Annexe 1 : Silanisation des lames et des lamelles	93
Annexe 2 : Déformation d'un globule rouge discoïde	93
Annexe 3 : Déformation d'un globule rouge sphérique.....	96
CHAPITRE 4 :	
MODULES ELASTIQUES DU SQUELETTE DU GLOBULE ROUGE A 25 MOSM/KG.....	99
INTRODUCTION.....	99
1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....	100
1.1 Chambre à écoulement	100
1.2 Extraction du squelette	102
1.3 Déformation du squelette.....	104
1.4 Exploitation des résultats.....	105

2. ÉLASTICITE DU SQUELETTE	106
2.1 Tenseur des contraintes	107
2.2 Tenseur des déformations	110
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	111
3.1 Expériences de contrôle.....	111
3.2 Mesure des modules élastiques	113
3.3 Histogramme des mesures à 25 mOsm/kg	115
3.4 Origines de la dispersion	120
3.5 Longueur de persistance d'un filament de spectrine	121
CONCLUSION	123
ANNEXES DU CHAPITRE 4	125
<i>Annexe A : Généralités sur la mécanique du squelette</i>	125
<i>Annexe B : Contrainte d'extension pure</i>	126
<i>Annexe C : Contrainte de cisaillement pur</i>	129
<i>Annexe D : les forces générant un cisaillement pur sont concourantes en un point du cercle circonscrit au triangle ABC</i>	131
<i>Annexe E : Direction du repère principal</i>	134
<i>Annexe F : Silanisation des lentilles cylindriques</i>	136
<i>Annexe G : Marquage de la bicouche lipidique</i>	137
<i>Annexe H : Marquage de l'actine</i>	137

CHAPITRE 5 : INFLUENCE DE LA FORCE IONIQUE, DU VIEILLISSEMENT ET DE L'ATP SUR L'ÉLASTICITE DU SQUELETTE..... 139

INTRODUCTION.....	139
1. VARIATION DE LA FORCE IONIQUE.....	140
1.1 Principe.....	140
1.2 Résultats.....	141
1.3 Discussion.....	147
2. VARIATION DE L'OSMOLARITE SUR UN MEME SQUELETTE	151
2.1 Principe.....	152

2.2 Résultats et discussion	153
3. COMPORTEMENT AU COURS DU TEMPS	156
3.1 Principe.....	156
3.2 Résultats et discussion	156
4. DEPENDANCE AVEC LA CONCENTRATION EN ATP	159
4.1 Principe.....	160
4.2 Résultats et discussion	160
CONCLUSION	162
CONCLUSION	163
PERSPECTIVES.....	165
<i>Module de cisaillement de la membrane.....</i>	<i>165</i>
<i>Modules élastiques du squelette.....</i>	<i>165</i>
<i>Réponse dynamique du squelette</i>	<i>167</i>
PUBLICATIONS :	
[HENON ET AL., 1999].....	173
[LENORMAND ET AL., 2001].....	181
REFERENCES	195

Introduction

Les globules rouges sont les cellules sanguines chargées de transporter les gaz à travers l'organisme : le dioxygène vers les cellules et une partie du dioxyde de carbone vers les poumons. Pour cela, les globules rouges parcourent des centaines de kilomètres au cours des 120 jours de leur existence. Ils sont amenés à traverser des capillaires dont le diamètre peut être inférieur au leur (*cf.* Figure 1) et doivent supporter des taux de cisaillement élevés, pouvant aller jusqu'à $\sim 1000 \text{ s}^{-1}$ [Schmid-Schönbein *et al.*, 1979]. Ceci nécessite des propriétés élastiques remarquables, dont une très grande résistance aux contraintes de cisaillement. Cette résistance au cisaillement est possible grâce aux propriétés particulières de sa membrane.

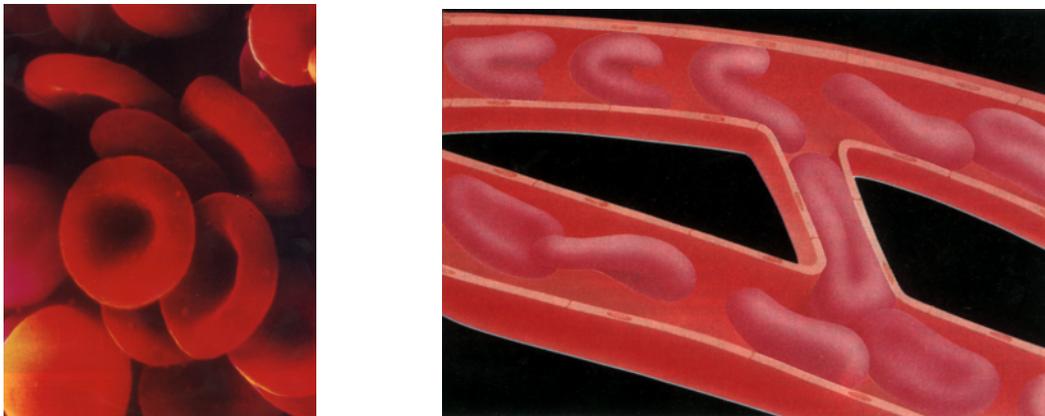


Figure 1 : Image de globules rouges humains par microscopie électronique et dessin de globules rouges dans un capillaire [Delaunay et Boivin, 1990]. Le globule rouge présente une très grande résistance au cisaillement, résistance due à une membrane ayant une structure particulière.

La *membrane* du globule rouge humain est composée d'une *bicouche lipidique* sous laquelle est ancré un réseau bidimensionnel de protéines, le *squelette*¹. Cette thèse porte sur le globule rouge *humain* : il est de forme discoïde (*cf.* Figure 1), et il ne contient qu'une solution d'hémoglobine. Les globules rouges d'autres espèces animales n'ont pas tous ces propriétés ; certains sont sphériques (cas du chien), d'autres ellipsoïdes (cas du chameau et du lama), certains encore ont un noyau (cas de la grenouille).

Le *squelette* est un élément essentiel dans la déformabilité du globule rouge : un défaut génétique empêchant sa mise en place correcte crée des globules rouges pathologiques (sphérocytose, elliptocytose) dont l'origine de la pathologie est l'absence de déformabilité [Delaunay et Boivin, 1990].

Le travail présenté ici porte sur les propriétés élastiques de la membrane et du *squelette*. Les propriétés élastiques de la membrane sont étudiées par diverses techniques depuis le début des années 1970. Plusieurs interrogations persistent, notamment sur le rôle respectif de la *bicouche lipidique* et du *squelette*. Nous tentons ici d'apporter une réponse à cette question.

Le premier chapitre présente l'état actuel des connaissances sur la structure de la membrane du globule rouge humain, et sur ses propriétés élastiques. Nous y faisons également des rappels de mécanique. Le deuxième chapitre présente l'outil qui a permis l'application de forces à un globule rouge et à son *squelette* : les pinces optiques. Nous en

¹ nous ferons systématiquement la distinction entre la membrane, la *bicouche lipidique* et le *squelette* : membrane = *bicouche lipidique* + *squelette*.

présentons le principe, ainsi que la procédure permettant de connaître avec précision l'intensité de la force appliquée.

Notre première étude porte sur la membrane du globule rouge (*cf.* Chapitre 3). Nous avons déterminé son module de cisaillement μ . La valeur trouvée est en assez bon accord avec celles mesurées par aspiration d'une portion de membrane dans une micropipette. À partir de ce résultat, nous nous sommes intéressé aux rôles respectifs, dans l'élasticité membranaire, de la bicouche lipidique et du squelette. Ceci nous a amené à étudier les propriétés élastiques du squelette seul (sans la bicouche lipidique).

Les chapitres 4 et 5 présentent les propriétés élastiques du squelette, après la dissolution de la bicouche lipidique par un détergent. L'absence de la bicouche permet la mesure de deux modules élastiques du squelette : le module d'extension K_C et le module de cisaillement μ_C . La modélisation du squelette permettant d'extraire de ces expériences les deux modules élastiques est présentée dans le chapitre 4. Le chapitre 5 expose l'influence de certains paramètres sur le squelette : l'osmolarité de la solution environnante, le vieillissement du squelette après son extraction, et la concentration en ATP de la solution environnante. De ces mesures « macroscopiques », nous avons extrait des données sur le comportement élastique d'un filament de spectrine, notamment sa raideur et sa longueur de persistance.

Chapitre 1

Le Globule Rouge Humain

Introduction

Ce chapitre présente un bilan de l'état actuel des connaissances sur le globule rouge humain.

Les deux premières parties de ce chapitre décrivent la fonction du globule rouge et la structure de sa membrane. La troisième partie expose les concepts utiles pour décrire l'élasticité des membranes et des polymères. Les trois dernières parties présentent l'état actuel des connaissances : l'élasticité de la membrane étudiée par aspiration par micropipette, le comportement du squelette et les propriétés mécaniques des filaments de spectrine.

L'essentiel des connaissances exposées dans les deux parties suivantes proviennent de deux revues : Bennett et Gilligan [1993] et Chien et Sung [1990].

1. Fonction et forme du globule rouge

Fonction

Une des multiples fonctions du sang est de transporter le dioxygène à travers l'organisme. Il faut un transporteur : l'hémoglobine. Se pose ensuite la question : comment transporter le transporteur ? L'évolution a retenu l'empaquetage de l'hémoglobine dans un « sac » : le globule rouge. Le globule rouge est un des composants essentiels du sang : il

représente 40 à 50 % de son volume et est présent à raison de 4 à 5 millions de globules par mm^3 de sang.

Forme

La figure 1.1 donne les dimensions moyennes du globule rouge [Evans *et al.*, 1972]. Le globule rouge est une cellule discoïde, biconcave, de 7 à 8 μm de diamètre et de 1.5 μm d'épaisseur. C'est une cellule sans noyau ni organelles. L'intérieur est principalement composé d'une solution d'hémoglobine. Cette solution est un fluide purement visqueux, de viscosité à concentration physiologique de l'ordre de 6 mPa.s [Caro *et al.*, 1978]. Le globule rouge ne possède pas de structure élastique tridimensionnelle telle que celle du cytosquelette d'une cellule eucaryote. Les propriétés mécaniques du globule rouge proviennent donc uniquement de sa membrane.

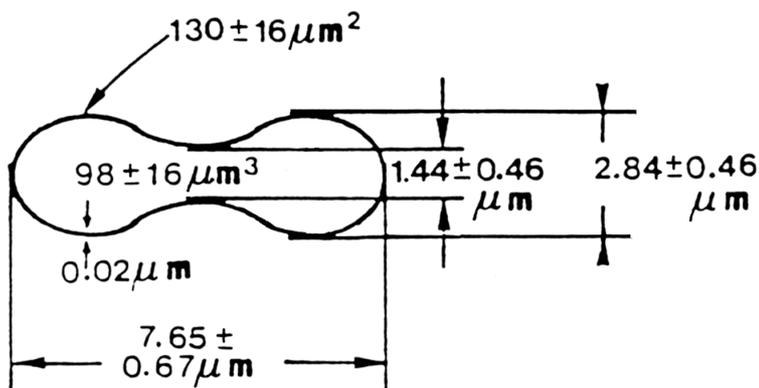


Figure 1.1 : Dimensions du globule rouge humain [Evans *et al.*, 1972].

Influence de l'osmolarité

Pourquoi le globule rouge humain a-t-il cette forme discoïde si reconnaissable ? Une réponse possible est la nécessité de se déformer à aire constante, ce qui lui permet de passer dans de petits capillaires en adoptant une forme en parapluie sans risquer de déchirer sa membrane. S'il était sphérique, il ne pourrait en effet pas se déformer sans changer son aire

(la forme sphérique correspond au maximum de volume pour une aire donnée). Une autre réponse est que cette forme lui confère « une réserve de volume », il peut en effet augmenter son volume (par entrée d'eau en milieu hypotonique, par exemple) sans changer l'aire de sa membrane. Ceci lui permet de supporter des milieux hypotoniques, notamment lorsqu'il traverse les reins de l'organisme. Notons également que la perte du noyau au cours de l'évolution est interprétée comme un moyen d'améliorer la faculté du globule de se déformer, ainsi que d'augmenter son stock d'hémoglobine.

L'osmolarité d'une solution

L'osmolarité [Osm] d'une solution est directement reliée à la pression osmotique π . Elle s'exprime en Osm/kg (ou en Osm/L) et est donnée par :

$$[\text{Osm}] = \frac{\pi}{RT},$$

où R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue. La pression osmotique π d'une solution faiblement diluée est donnée par la loi de Van't Hoff :

$$\pi = n_{\text{osm}} \frac{RT}{V},$$

où V est le volume de la solution et n_{osm} le nombre d'osmoles. Lorsqu'un sel est mis en solution, il ne se retrouve pas entièrement sous forme ionisée. Le coefficient osmotique ϕ , déterminé expérimentalement, permet de calculer le nombre réel de moles d'espèces (nombre d'osmoles : n_{osm}) présentes dans la solution :

$$n_{\text{osm}} = n_{\text{mol}} \cdot i \cdot \phi,$$

avec n_{mol} le nombre de moles initiales et i le nombre d'ions formés (Par exemple, pour le NaCl, $i = 2$ et $\phi = 0.93$). L'osmolarité d'une solution faiblement diluée est donc :

$$[\text{Osm}] = \frac{n_{\text{mol}} i \phi}{V} .$$

Dans la suite, l'osmolarité des différentes solutions utilisées a systématiquement été mesurée grâce à un osmomètre.

La force ionique

La force ionique FI d'une solution est fonction de la concentration en ions de la solution. Elle est donnée par :

$$FI = \frac{1}{2} \sum z_i^2 c_i ,$$

avec c_i la concentration en ions i de valence z_i . Elle s'exprime en mole par litre.

Forme du globule rouge suivant l'osmolarité

Le milieu physiologique correspond à une osmolarité de 300 mOsm/kg. La figure 1.2 présente les différentes formes du globule rouge en fonction de l'osmolarité du milieu environnant. À 300 mOsm/kg, le globule rouge est discoïde. Lorsque l'osmolarité baisse, il gonfle par entrée d'eau. Il est parfaitement sphérique à 150 mOsm/kg, avec une membrane sous tension. En dessous de 150 mOsm/kg, la membrane se déchire et l'hémoglobine s'échappe ; lorsque l'équilibre osmotique est atteint entre l'intérieur et l'extérieur, la membrane se referme. Seul le contour de la membrane est alors visible : cela s'appelle un fantôme. Lorsque l'osmolarité est supérieure à 300 mOsm/kg, le globule rouge se vide de son eau pour former un échinocyte.

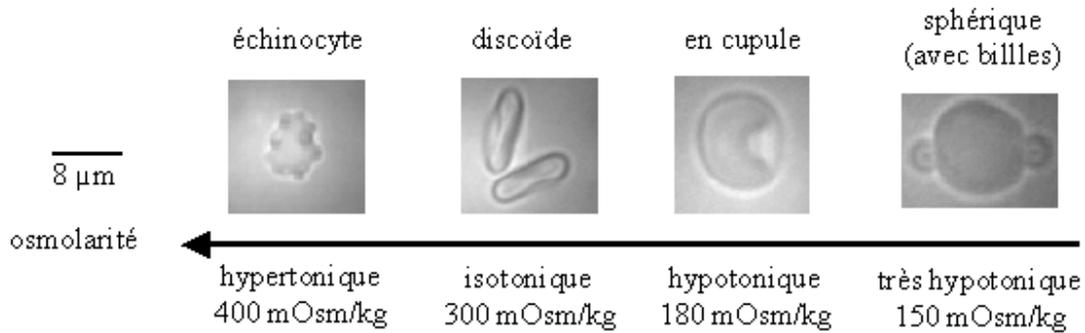


Figure 1.2 : Influence de l'osmolarité sur la forme du globule rouge. À 300 mOsm/kg (osmolarité physiologique), le globule rouge est discoïde ; à 150 mOsm/kg, il est sphérique avec sa membrane sous tension.

2. Structure de la membrane

La figure 1.3 montre un schéma de la membrane du globule rouge. La membrane est constituée d'une bicouche lipidique sous laquelle est ancré un réseau bidimensionnel hautement organisé de protéines : le squelette. Ce squelette tapisse la face interne de la bicouche lipidique. Il est constitué de longs filaments de spectrine reliés entre eux par des complexes de jonction. Ces complexes sont principalement composés d'actine filamenteuse, de protéines 4.1 et de tropomyosines (*cf.* Figure 1.7).

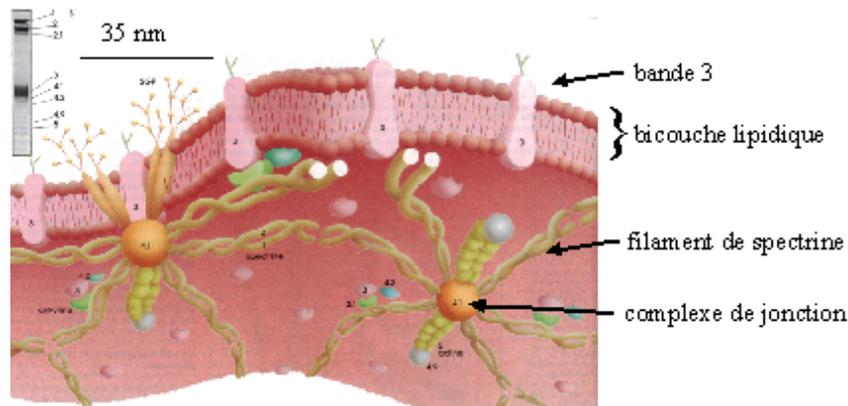


Figure 1.3 : La membrane du globule rouge est composée d'une bicouche lipidique sous laquelle est ancré un réseau bidimensionnel de protéine, le squelette. Ce squelette est composé de filaments de spectrine reliés entre eux par des complexes de jonction [Delaunay et Boivin, 1990].

2.1 La bicouche lipidique

La bicouche lipidique délimite l'intérieur et l'extérieur du globule rouge. Elle est constituée de deux feuillets de lipides, dans lesquels de nombreuses protéines sont incluses.

Les lipides de la bicouche

Les lipides membranaires sont pour l'essentiel amphiphiles (une tête hydrophile et une queue hydrophobe composée d'une double chaîne carbonée). La bicouche est composée de 55 % de phospholipides, de 25 % de cholestérols, de 18 % de glycolipides (aussi appelés sphingoglycolipides) et de 2 % d'acides gras. Ces glycolipides sont essentiellement localisés dans le feuillet externe de la bicouche.

Électrophorèse des protéines de la membrane

La figure 1.4 présente les résultats d'une électrophorèse sur les protéines de la membrane du globule rouge [Chien et Sung, 1990]. Les protéines sont dissociées puis soumises à un champ électrique dans un gel de polyacrylamide. Les protéines, qui possèdent

une charge électrique, migrent en fonction de leur poids moléculaire. Elles sont numérotées par ordre décroissant de poids moléculaire.

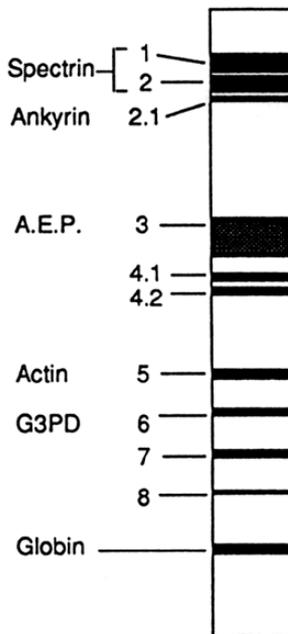


Figure 1.4 : Séparation par électrophorèse des protéines du squelette du globule rouge [Chien et Sung, 1990].

Le poids moléculaire des protéines s'exprime en Dalton (Dal). Le Dalton est l'unité de masse moléculaire, approximativement égale à la masse d'un atome d'hydrogène ($1.66 \cdot 10^{-24}$ g).

Les protéines de la bicouche lipidique, ou protéines intégrales

Ces protéines se caractérisent par leur position au sein de la bicouche lipidique. Elles sont dites transmembranaires, c'est-à-dire qu'elles traversent la bicouche lipidique de part en part. Elles possèdent donc une partie extracellulaire et une partie intracellulaire. Ces protéines intégrales, dont les deux plus importantes en nombre sont la protéine de la bande 3 et les sialoglycoprotéines, servent de point d'ancrage au squelette.

La protéine de la bande 3 est une protéine transporteuse d'anions permettant le passage des ions chlorures Cl^- et bicarbonates HCO_3^- à travers la bicouche lipidique. C'est

une protéine de grande taille (95 kDa) qui franchit la membrane plus de dix fois. Elle possède un domaine cytoplasmique de 43 kDa qui constitue un point d'ancrage majeur du squelette.

Un autre groupe important de protéines transmembranaires auxquelles le squelette est fixé, est constitué par les protéines sialoglycoprotéines α , β , γ et δ . Ces protéines exposent à l'extérieur de la cellule des antigènes caractéristiques du groupe sanguin.

2.2. Le squelette du globule rouge

Le squelette du globule rouge est constitué de long filaments de spectrine (200 nm de longueur de contour²) reliés entre eux par de l'actine (*cf.* Figures 1.3, 1.5 et 1.8). La faible épaisseur du squelette, de l'ordre de 10 nm, fait qu'il peut être considéré comme bidimensionnel.

Un réseau triangulaire

Le squelette du globule rouge a été visualisé par microscopie électronique [Liu *et al.*, 1987]. Les images obtenues (*cf.* Figure 1.5) ont révélé une structure en réseau grossièrement triangulaire. Chaque arête est constituée d'un ou plusieurs filaments de spectrine, et chaque sommet correspond à un complexe de jonction.

² longueur de contour : longueur totale d'un polymère définie comme la somme de la longueur de chacun des éléments le constituant.

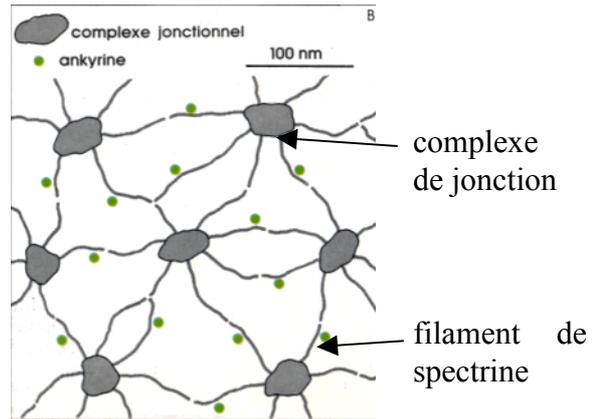
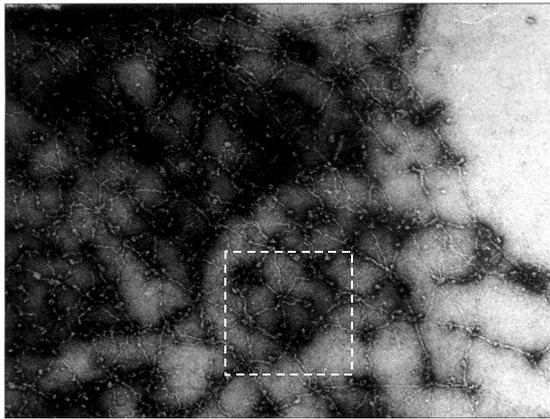


Figure 1.5 : Photographie en microscopie électronique du squelette [Liu *et al.*, 1987]. Cette image fait apparaître un réseau bidimensionnel avec une structure de base triangulaire.

La spectrine

La spectrine est le constituant principal du squelette. Elle représente 75 % de sa masse et ses propriétés élastiques en font un élément essentiel. La spectrine est une protéine hétérodimérique possédant deux chaînes α et β , enroulées l'une sur l'autre en hélice pour former un dimère α - β . Les brins α et β ont un poids moléculaire respectivement de 240 kDa et de 220 kDa. Ils sont formés par la répétition d'une sous-unité constituée de 106 acides aminés, répétée 22 fois dans la chaîne α et 17 fois dans la chaîne β (*cf.* Figure 1.6). Chaque sous-unité est formée de trois hélices α , antiparallèle surenroulée (triple-helical antiparallel coiled-coil). Un dimère a une longueur de contour d'environ 100 nm et un diamètre de 5 nm. De plus, la spectrine, au pH physiologique, est une protéine chargée négativement [Elgsaeter *et al.*, 1976].

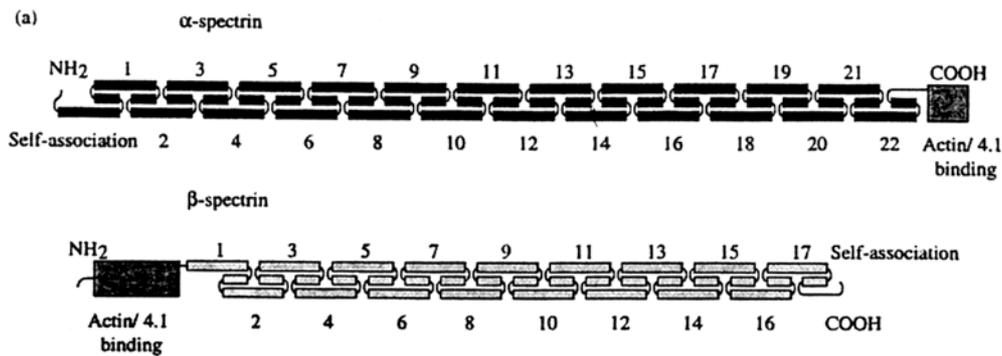


Figure 1.6 : Schéma des deux brins de spectrine. Le brin α est composé de la répétition de 22 séquences de base et le brin β de 17 [Winkelmann et Forget, 1993].

Dans le squelette, la spectrine est principalement sous la forme de tétramères. Un tétramère est formé par l'association tête-bêche de deux dimères. Sa longueur de contour est de 200 nm et sa longueur bout-à-bout³ *in situ* est comprise entre 50 et 80 nm [Shen *et al.*, 1986 ; Liu *et al.*, 1987]. Notons ici que la spectrine existe également sous forme d'hexamères (formés par association de trois dimères) et d'octamères (formés de quatre dimères), ces structures sont schématisées sur la figure 1.8.

Les complexes de jonction

Les filaments de spectrine sont reliés entre eux par des complexes de jonction (*cf.* Figure 1.7). Ces complexes sont principalement composés d'actine filamenteuse (F-actine), de la protéine 4.1 et de la tropomyosine. D'autres protéines semblent jouer un rôle dans les complexes de jonction : l'adducine, la dématine (protéine 4.9) et la tropomoduline.

³ longueur bout-à-bout : distance entre les deux extrémités d'un polymère.

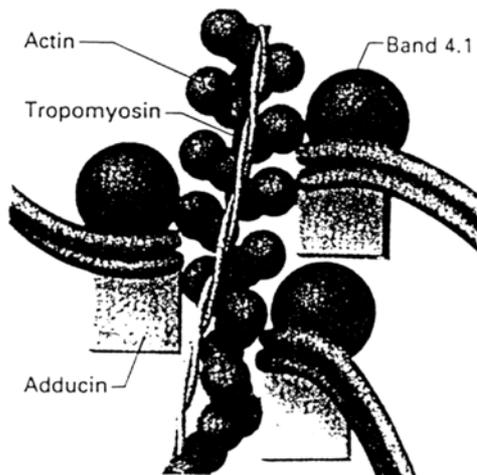


Figure 1.7 : Schéma d'un complexe de jonction. Les complexes de jonction sont formés d'un court filament d'actine, de protéines 4.1 et de tropomyosines [Lux, 1988].

L'actine est un des trois constituants du cytosquelette de toute cellule et un élément essentiel de la contraction musculaire. Il existe plusieurs isoformes de l'actine. L'actine érythrocytaire est de type β -non musculaire. Elle se présente sous forme de courts filaments (protofilaments) formés par polymérisation de 12 à 17 monomères d'actine. Ces filaments présentent une structure en double hélice et ont une longueur totale de 30 à 40 nm. La manière dont est régulée la longueur de ces filaments n'est pas comprise, mais la tropomyosine et la tropomoduline semblent y avoir un rôle. La F-actine est directement reliée aux filaments de spectrine, avec en moyenne six filaments de spectrine par complexe de jonction.

La protéine 4.1 ne se lie pas directement à la F-actine, mais sert de promoteur à l'association spectrine/actine. Son rôle serait de stabiliser cette liaison après sa formation.

La tropomyosine se lie au filament d'actine : deux tropomyosines s'associent à un filament d'actine. Son rôle semble être de stabiliser la F-actine et de réguler ainsi les interactions spectrine/actine. La liaison de la tropomyosine sur la F-actine est sensible à la concentration en ions Mg^{2+} .

La tropomoduline se fixe à la tropomyosine à raison d'une molécule par complexe de jonction. L'aducine a une grande affinité pour les complexes spectrine/actine. Cette protéine serait un promoteur de l'organisation du squelette.

Un réseau avec de nombreux défauts

Dans un réseau idéal, la maille serait parfaitement triangulaire : la spectrine ne s'associerait qu'en tétramère et chaque brin d'actine serait relié à six filaments de spectrine. Le squelette réel n'a bien entendu pas cette perfection. Les images obtenues par microscopie électronique [Liu *et al.*, 1987] (*cf.* Figure 1.5) ont mis en évidence deux sortes de défauts : la présence d'hexamères et d'octamères de spectrine dans des proportions non négligeables, et un nombre de filaments de spectrine par actine variant de trois à huit.

Les dimères de spectrine s'associent deux à deux pour former principalement des tétramères $\alpha_2\text{-}\beta_2$. Ils peuvent toutefois former des hexamères $\alpha_3\text{-}\beta_3$, des octamères $\alpha_4\text{-}\beta_4$ et même des structures d'ordre supérieur (*cf.* Figure 1.8).

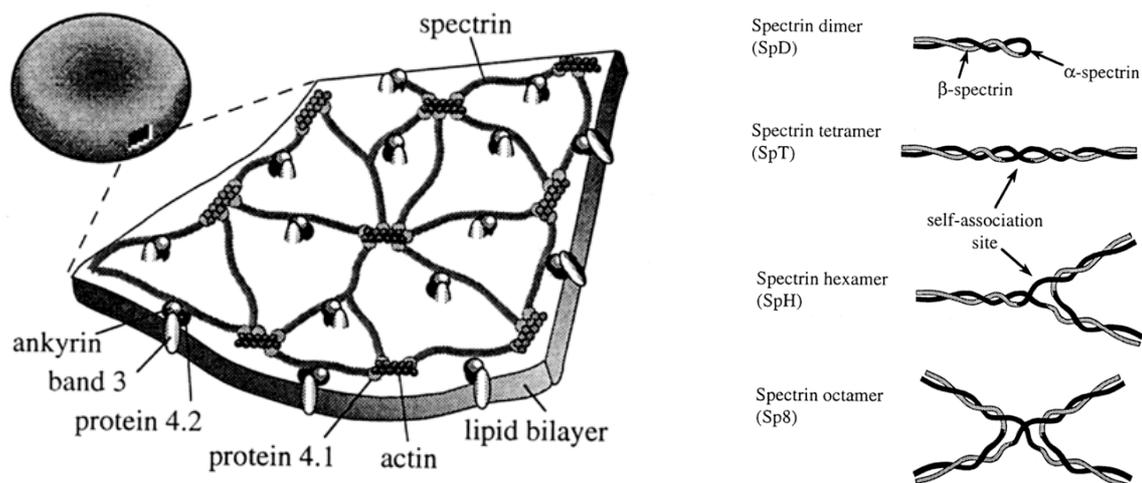


Figure 1.8 : Les dimères s'associent principalement en tétramère, mais ils peuvent également former des hexamères, des octamères et des structures d'ordre supérieur. Ceci crée des défauts dans la structure triangulaire du squelette [Hansen *et al.*, 1997]

Plusieurs études ont porté sur la proportion de chacune des différentes formes de filaments. Ces proportions varient en fonction de la manière dont est préparé l'échantillon avant l'observation. La table 1 présente un bilan des résultats obtenus. La proportion de tétramères varie de 52 à 76 % en masse, celle d'hexamères de 14 à 38 % et celle d'octamères et d'ordre supérieur de 3 à 15 %.

Méthode d'observation et de préparation :		Dimères	Tétramères	Hexamères	Octamères et supérieur
Densité de gel [Liu <i>et al.</i> , 1984]	% en masse	8	52	14	15
ME, entièrement étalé, marqué négativement, [Liu <i>et al.</i> , 1987]	% oligomères	–	84	11	5
	% masse	–	76	15	9
ME, partiellement étalé, méthode QFDERR, [Ursitti et Wade, 1993]	% oligomères	–	68	30	2
	% masse	–	58	38	3

Table 1 : Proportion des différentes formes de filaments de spectrine, suivant les différentes techniques d'observation et de préparation des squelettes. ME : microscopie électronique. QFDERR : refroidissement rapide par N₂ liquide.

La deuxième source de défauts vient de la coordinence des filaments de spectrine par actine. En moyenne, chaque filament d'actine est relié à six filaments de spectrine. Mais ce nombre varie de trois à huit [Ursitti *et al.*, 1991].

Le squelette du globule rouge est donc composé de filaments de spectrine relié entre eux par des complexes de jonction. Le réseau est grossièrement triangulaire avec des défauts.

2.3 Les liaisons squelette/bicouche lipidique

Le squelette du globule rouge est relié à la bicouche lipidique de deux manières différentes (*cf.* Figure 1.3).

La première met en jeu la spectrine du squelette, le fragment cytoplasmique de la protéine de la bande 3 et une troisième protéine, l'ankyrine (protéine de la bande 2.1). L'ankyrine est une protéine de 215 kDa. Elle se lie très fortement à la spectrine au niveau de du domaine β -II (domaine de la spectrine situé à environ 20 nm de son site d'auto-association). Il y a de l'ordre de cent mille molécules d'ankyrine par érythrocyte pour environ autant de tétramères de spectrine. Chaque tétramère, bien que possédant deux sites de liaison pour l'ankyrine, ne s'associe en moyenne qu'une fois à celle-ci. Un autre domaine de l'ankyrine se fixe au domaine cytoplasmique de la bande 3 avec une très forte affinité.

La deuxième interaction met en jeu la protéine 4.1, présente dans les complexes de jonction. Elle se fixe aussi au fragment cytoplasmique de la bande 3 et peut également se fixer à celui des sialoglycoprotéines.

La fixation du squelette à la bicouche lipidique est essentielle. Un défaut congénital d'ankyrine interdit la mise en place correcte du squelette et est responsable de sphérocytose

héréditaire. Dans cette pathologie, les globules rouges sont sphériques. L'absence également congénitale de la sialoglycoprotéine- β confère aux globules rouges la forme d'un ellipsoïde.

3. Aspects mécaniques de la membrane

3.1 Quelques notions d'élasticité bidimensionnelle

L'intérieur du squelette est composé d'un fluide purement visqueux. Les propriétés élastiques du globule rouge sont donc déterminées uniquement par sa membrane. D'un point de vue macroscopique et de par sa faible épaisseur, de 10 nm, la membrane apparaît comme un objet bidimensionnel. Comme le montre la Figure 1.9, une membrane élastique peut être déformée de trois manières différentes : par extension-compression, par cisaillement ou par courbure. Une déformation quelconque est une combinaison de ces trois types de déformations élémentaires.

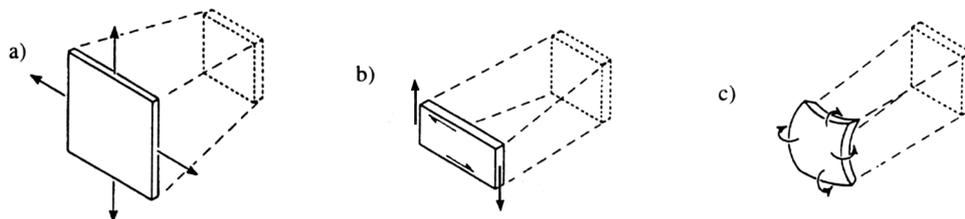


Figure 1.9 : Représentation schématique des trois modes de déformations. a) extension. b) cisaillement pur. c) courbure. Les flèches représentent le sens des déformations [Evans et Needham, 1987].

Une déformation d'extension pure correspond à une augmentation d'aire, sans changement de forme. Elle est caractérisée par un module d'extension K . Une déformation de cisaillement pur correspond à un changement de forme à aire constante, et est caractérisée par un module de cisaillement μ . Une déformation de courbure pure correspond à un changement

de la courbure moyenne à aire et forme constantes ; elle est associée à un module de courbure B .

En élasticité bidimensionnelle, les modules d'extension et de cisaillement ont la dimension d'une raideur (force sur une longueur), le module de courbure a la dimension d'une énergie.

Le module de courbure B est de l'ordre de quelques $k_B T$ à quelques dizaines de $k_B T$ pour la membrane du globule rouge (*cf.* partie 4.2 de ce chapitre). Il a de plus été montré que le module de courbure du squelette seul doit être plus faible que celui de la membrane [Svoboda *et al.*, 1992 ; Mohandas et Evans, 1994]. L'énergie de courbure est petite devant l'énergie élastique. Elle est donc constamment négligée aussi bien sur nos mesures d'élasticité de la membrane que sur celles portant sur le squelette seul.

3.2 Élasticité linéaire bidimensionnelle en petites déformations

Hypothèses

La membrane est considérée comme un milieu élastique plan et bidimensionnel. Ce milieu est supposé isotrope, linéaire et homogène. Le module de courbure est négligé. Sous ces hypothèses, les propriétés mécaniques sont décrites par deux modules élastiques : le module de cisaillement μ et le module d'extension K .

Tenseur des contraintes $[\boldsymbol{\sigma}]$ et tenseur des déformations $[\mathbf{e}]$

En élasticité bidimensionnel, le tenseur des contraintes et le tenseur des déformations ont une dimension 2×2 .

Le tenseur des contraintes $[\sigma]$ est défini en fonction de la force élémentaire $d\vec{F}$ appliquée sur un élément de longueur dl – \vec{n} étant le vecteur unitaire normale à cette longueur :

$$d\vec{F} = [\sigma] \cdot \vec{n} dl .$$

L'élément e_{ij} du tenseur des déformations est défini à partir du champ des déplacements u_i :

$$e_{ij} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) .$$

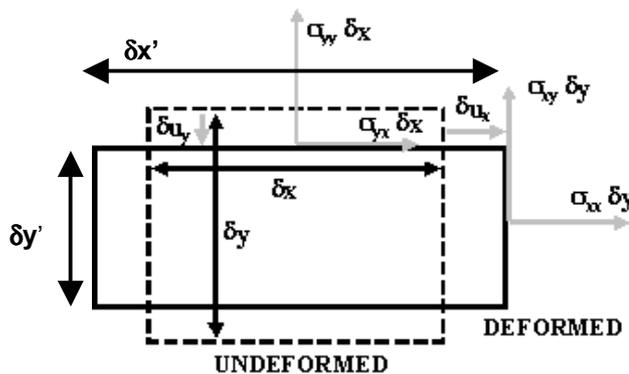


Figure 1.10 : Représentation des déplacements et des forces appliqués à un élément de surface.

Loi de Hooke

Pour de petites déformations, la loi constitutive du milieu est donnée par la loi de Hooke, écrite à deux dimensions. Il s'agit d'une relation linéaire entre le tenseur des déformations $[e]$ et le tenseur des contraintes $[\sigma]$ donnée par [Landau et Lifshitz, 1959] :

$$\begin{cases} e_{xx} = \frac{1}{4\mu} (\sigma_{xx} - \sigma_{yy}) + \frac{1}{4K} (\sigma_{xx} + \sigma_{yy}) \\ e_{yy} = \frac{1}{4\mu} (-\sigma_{xx} + \sigma_{yy}) + \frac{1}{4K} (\sigma_{xx} + \sigma_{yy}) \\ e_{xy} = \frac{1}{2\mu} \sigma_{xy} \end{cases}$$

3.3 Élasticité de réseaux bidimensionnels parfaits de ressorts

En première approximation, le squelette peut être modélisé par un réseau plan de ressorts, tous de même longueur, et formant un motif de base triangulaire parfait. Kantor et Nelson [1987] ont déterminé de manière analytique une relation entre le module d'extension et le module de cisaillement. Cette relation, valable pour des petites déformations, est :

$$K_C = 2 \mu_C.$$

Des simulations numériques ont permis de retrouver ce résultats [Boal *et al.*, 1993 ; Hansen *et al.*, 1996].

Dans le cas de ressorts de raideur k , il est possible de relier les modules élastiques à la raideur d'un seul ressort [Kantor et Nelson, 1987 ; Boal *et al.*, 1993] :

$$K_C = 2 \mu_C = \frac{\sqrt{3}}{2} k.$$

3.4 Élasticité entropique

Nous verrons dans la partie 5 de ce chapitre que les filaments de spectrine se comportent comme des ressorts entropiques. Nous allons présenter ici l'origine de cette élasticité. Les deux parties suivantes sont basées sur *Scaling concepts in polymer physics* [de Gennes, 1979] et sur la thèse de doctorat de J. F. Allemand [Allemand, 1997].

Modèle de la chaîne librement jointe

Dans ce modèle, un polymère est décrit par une succession de n maillons de longueur b . La longueur de contour du polymère est $L_0 = n b$. Sans contrainte extérieure, l'orientation des maillons est aléatoire, et la longueur bout-à-bout vaut $R_{bb} = \sqrt{n} b$. Ce polymère est

étiré en exerçant une force \vec{F} à chacune de ces extrémités (cf. Figure 1.11). L'énergie associée à chacun des maillons est $E_i = F b \cos \theta_i$ avec θ_i l'angle que fait le $i^{\text{ième}}$ maillon avec la force \vec{F} . En considérant les maillons indépendants les uns des autres, la fonction de partition de la chaîne est donnée par :

$$Z = \int \exp\left[\sum_{i=1}^n -\beta F b \cos \theta_i \right] \prod_{i=1}^n 2 \pi \sin \theta_i d\theta_i = \left[\int 2 \pi \exp[-\beta F b \cos \theta] \sin \theta d\theta \right]^n$$

avec $\beta = \frac{1}{k_B T}$, k_B est la constante de Boltzmann et T la température absolue. L'extension $\langle x \rangle$

du polymère due à la force \vec{F} est :

$$\frac{\langle x \rangle}{L_0} = \frac{1}{L_0} \frac{\partial Z}{\partial F} = \cot \text{an} \left[\frac{F b}{k_B T} \right] - \frac{k_B T}{F b}.$$

À faible force, l'extension est donnée par $\frac{\langle x \rangle}{L_0} = \frac{F b}{3 k_B T}$.

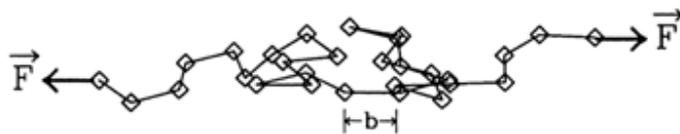


Figure 1.11 : Polymère étiré par une force \vec{F} exercée à chacune des extrémités [Allemand, 1997].

L'orientation aléatoire des maillons rend ce modèle peu réaliste. Il a cependant le mérite de faire comprendre l'origine de l'élasticité entropique. Il montre que pour étirer un

polymère, il faut exercer une force, alors que son énergie potentielle est nulle quelle que soit son extension. L'extension du polymère nécessite la réduction du nombre de configurations accessibles, ceci a un coût entropique qui s'oppose à la traction.

Modèle du ver ou Worm Like Chain (WLC)

Le modèle du ver, plus réaliste, fait intervenir la longueur de persistance ξ du polymère. La longueur de persistance ξ est la longueur au bout de laquelle les corrélations d'orientation du polymère sont perdues à cause des fluctuations thermiques. Cette longueur est une indication de la rigidité du polymère à petite échelle. Ce modèle fait intervenir un terme de courbure dans l'énergie E_{WLC} du polymère en plus du terme entropique. Cette énergie est donnée par :

$$E_{WLC} = \int_0^{L_0} \left(\frac{1}{2} \xi k_B T \left(\frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right)^2 - F \cos [\theta (s)] \right) ds,$$

avec \vec{t} le vecteur tangent au polymère, s l'abscisse curviligne, θ l'angle de \vec{t} avec la direction de la force et L_0 la longueur de contour du polymère.

Marko et Siggia ont été les premiers à obtenir la courbe de l'extension du polymère en fonction de la force pour ce modèle [Marko et Siggia, 1995]. Ils ont également donné une forme analytique approchée [Bustamante *et al.*, 1994] :

$$F = \frac{k_B T}{\xi} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{x}{L_0} \right)^2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{L_0} \right].$$

Le développement limité pour une faible extension donne le modèle de la chaîne librement jointe, en posant $b = 2 \xi$. Notons que pour une force F de l'ordre du piconewton, une longueur de contour de 200 nm et une longueur de persistance de 5 nm –ce sont les ordres de grandeur pour la spectrine –, l'extension x déduite de ce modèle est de 0.2 μm .

3.5 Et l'élasticité enthalpique ?

Lorsque la force appliquée à un filament de spectrine est de quelques dizaines de piconewtons, sa longueur correspond à sa longueur de contour. Il n'y a plus de contribution entropique et les liaisons chimiques du polymère commencent à être étirées. La déformation se fait dans le régime enthalpique de l'élasticité. Il devient alors possible de déplier les séquences de base de la spectrine [Rief *et al.*, 1999 ; Lenne *et al.*, 2000] (*cf.* § 6.3 de ce chapitre). Dans nos expériences, le régime enthalpique n'est jamais atteint car les forces appliquées par les pinces optiques sont trop faibles.

4. État des connaissances sur l'élasticité de la membrane du globule rouge humain

L'élasticité de la membrane du globule rouge a été étudiée par plusieurs techniques différentes : déformation par un écoulement [Hochmuth *et al.*, 1973], par un champ électrique [Engelhardt et Sackmann, 1988], mesure de la viscosité d'une suspension de globules rouges [Drochon *et al.*, 1990] et surtout aspiration d'une portion de la membrane dans une micropipette [citons entre autres, Evans, 1973 ; Hochmuth et Waugh, 1987 ; Lelièvre *et al.*, 1995]. Ces différentes techniques mesurent le module de cisaillement μ de la membrane. Les valeurs trouvées se situent entre 4 et 10 $\mu\text{N/m}$. La technique des micropipettes permet aussi de

mesurer le module d'extension, module compris entre 300 et 500 mN/m et donne une estimation du module de courbure B ($B \sim k_B T$).

4.1 Rôle supposé de la bicouche lipidique et du squelette

Une augmentation d'aire de la membrane n'est possible que si les lipides « s'écartent » les uns des autres. Cette opération est coûteuse en énergie. Ceci signifie que l'extension de la membrane est contrôlée par la bicouche lipidique (*cf.* § 4.2 de ce chapitre).

La bicouche lipidique est fluide à température ambiante. Elle n'offre donc pas de résistance au cisaillement. E. Evans [1973] émet l'hypothèse que la résistance au cisaillement peut être principalement attribuée au squelette. Une étude de Waugh *et al.* [1988] a permis d'étayer cette hypothèse en mesurant le module de cisaillement de globules rouges pathologiques en fonction de la densité de filaments de spectrine. Les auteurs ont ainsi montré que la résistance au cisaillement est directement reliée à la densité de spectrine, et donc au squelette.

4.2 Les expériences d'aspiration par micropipette

Principe

Le principe consiste à aspirer une portion de la membrane dans une pipette de verre de quelques microns de diamètre. L'aspiration se fait en créant une dépression contrôlée dans la pipette, ce qui induit une déformation locale de la membrane. Le module de cisaillement est mesuré sur un globule rouge discoïde afin de pouvoir modifier la forme sans changer l'aire de la membrane. Pour la mesure du module d'extension, la membrane doit être sous tension afin que toutes contraintes se traduisent par une augmentation d'aire. Il est alors nécessaire de travailler avec un globule rouge rendu sphérique en milieu hypotonique.

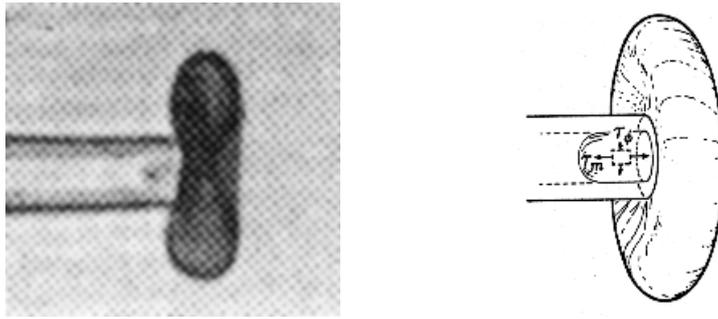


Figure 1.12 : Une portion de la membrane est aspirée dans une pipette de verre ayant un diamètre de quelques microns. Cette technique permet de mesurer les modules d'extension et de cisaillement de la membrane, et de donner une estimation du module de courbure.

Détermination du module d'extension K

La mesure du module d'extension K se fait sur un globule rouge rendu sphérique en abaissant l'osmolarité de la solution tampon environnante (*cf.* Figure 1.13).

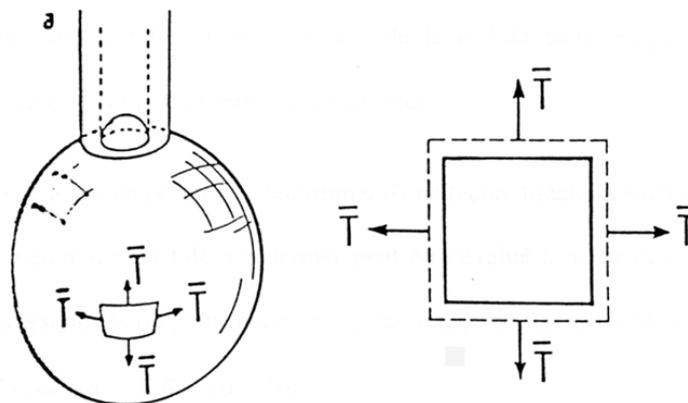


Figure 1.13 : Schéma d'un globule rouge sphérique avec la membrane sous tension (milieu hypotonique) aspiré par une pipette. Le module d'extension K ainsi mesuré est de l'ordre de 300 à 500 mN/m [Waugh et Evans, 1979].

L'aspiration d'une partie de la membrane dans la pipette crée une contrainte $[T]$, ce qui se traduit par une augmentation d'aire de la membrane. La contrainte $[T]$ appliquée sur un élément de surface est liée au module K et à la variation de surface relative :

$$T = K \frac{A - A_0}{A_0}$$

avec $A - A_0$ la variation de surface, A_0 la surface à contrainte nulle. L'intensité T de la contrainte est donnée par la relation de Laplace :

$$T = \frac{\Delta P R_p}{2 \left(1 - \frac{R_p}{R_c} \right)},$$

où ΔP est la pression d'aspiration, R_p le rayon interne de la pipette et R_c le rayon de la cellule à l'extérieur de la pipette. En reliant ces deux formules, le module d'extension K est déduit de la mesure du rayon du globule rouge en fonction de la pression d'aspiration, connaissant le rayon de la pipette.

La valeur obtenue pour le module d'extension K est de l'ordre de 300 à 500 mN/m [Evans *et al.*, 1976 ; Waugh et Evans, 1979 ; Hochmuth et Waugh, 1987 ; Bucherer *et al.*, 1991].

Détermination du module de cisaillement

E. Evans [1973] et Skalak *et al.* [1973] ont proposé un modèle permettant d'extraire le module de cisaillement μ des expériences d'aspiration sur des globules rouges discoïdes, à partir de la mesure de la longueur de la portion de membrane aspirée et de la différence de pression appliquée. La membrane est considérée comme un milieu homogène hyper-élastique bidimensionnel isotrope. Les auteurs choisissent d'écrire l'énergie de déformation W sous la forme :

$$W(I_1, I_2) = \frac{\mu}{2} \left(\frac{1}{2} I_1^2 + I_1 - I_2 \right) + \frac{K}{8} I_2^2,$$

K et μ sont respectivement les modules d'extension et de cisaillement, I_1 et I_2 sont deux invariants du tenseur des déformations de Green-Lagrange définis à partir des extensions λ_1 et λ_2 :

$$\lambda_1 = \frac{\delta x'}{\delta x} ; \lambda_2 = \frac{\delta y'}{\delta y} \text{ (cf. Figure 1.10)}$$

$$\text{et } I_1 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 - 2 ; I_2 = \lambda_1^2 \times \lambda_2^2 - 1.$$

La calotte de la membrane dans la pipette (cf. Figure 1.14) est supposée, dans le cas général, non-hémisphérique. La partie cylindrique transmet les tensions méridiennes et la partie extérieure à la pipette est modélisée par un plan infini.

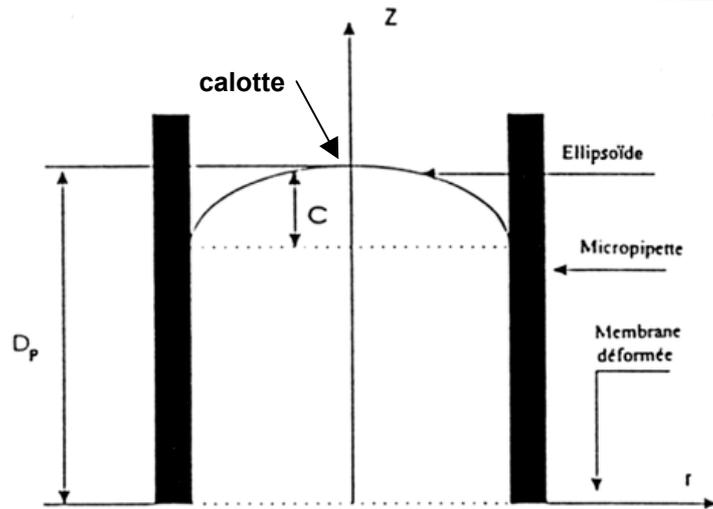


Figure 1.14 : Modélisation de la membrane aspirée dans une pipette [Evans, 1973].

Dans ce modèle, les contraintes appliquées sont insuffisantes pour augmenter l'aire de la membrane, celle-ci est donc supposée constante (cf. § 4.1 de ce chapitre). La loi de comportement hyper-élastique donne :

$$2 \frac{\Delta P R_p}{\mu} = \frac{A_p}{R_p^2} + \log \left[1 + \frac{A_p}{R_p^2} \right] \text{ où } A_p = \frac{A_{CAL} + A_{CYL} - \pi R_p^2}{\pi},$$

avec A_{CAL} l'aire de la calotte, A_{CYL} l'aire de la partie cylindrique et R_p le rayon interne de la pipette. La forme de la calotte dépend directement du module de cisaillement, et il n'est malheureusement pas possible de relever sa forme exacte en microscopie optique. Evans opte pour une forme ellipsoïde, Chen choisit lui une forme sphérique [Chen *et al.*, 1978], bien qu'Evans ait montré que la calotte n'était sphérique que pour des pressions importantes [Evans, 1973].

Dans le cas de la calotte sphérique, la relation donnant le module de cisaillement μ est :

$$\frac{\Delta P R_p}{2 \mu} = \frac{D_p}{R_p} - \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \log \left[2 \frac{D_p}{R_p} \right],$$

avec la condition $D_p \geq R_p$; D_p est la longueur totale de la partie aspirée dans la pipette (jusqu'au sommet de la calotte).

Cette formule est utilisée pour déduire le module de cisaillement μ de la mesure de D_p en fonction de ΔP . Les valeurs trouvées varient entre 4 et 10 $\mu\text{N/m}$ [Evans, 1973 ; Hochmuth et Waugh, 1987 ; Lelièvre *et al.*, 1995].

4.4 Mesure du module de courbure B de la membrane

Plusieurs techniques permettent la mesure du module de courbure, les valeurs mesurées varient de quelques $k_B T$ à quelques dizaines de $k_B T$. Dans les expériences de micropipette, E. Evans [1983] déduit le module de courbure de la pression nécessaire pour faire flamber un globule rouge discoïde. Le flambage du globule rouge correspond au passage de la forme discoïde à la forme en cupule. Le module ainsi estimé est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-19}$ N.m, soit $\sim 50 k_B T$. Une autre technique consiste à mesurer l'amplitude des fluctuations

de membrane. Le module de courbure ainsi mesuré varie de $5 k_B T$ à $150 k_B T$. [Peterson *et al.*, 1992 ; Sackmann, 1994].

En conclusion de cette section, il apparaît trois points importants : i) Le module d'extension de la membrane K est grand devant le module de cisaillement μ de la membrane. ii) à faible force, il n'y a pas d'augmentation d'aire, la déformation est une déformation de cisaillement pur. iii) L'énergie de courbure B est négligeable.

5. État des connaissances sur l'élasticité du squelette

5.1 Élasticité du squelette

Les propriétés élastiques du squelette proviennent d'une part, de l'élasticité intrinsèque des filaments de spectrine, et d'autre part, de la topologie du réseau.

Élasticité entropique des filaments de spectrine

Le premier facteur déterminant est l'élasticité de chacun des filaments de spectrine. Dans un certain nombre d'études [Liu *et al.*, 1984 ; Shen *et al.*, 1986], la spectrine apparaît comme une molécule flexible. Une étude de Stokkes *et al.* [1986] a permis de montrer que la distance bout-à-bout de dimères et de tétramères de spectrine en solution décroît quand la température augmente. Ces observations ont mené à l'hypothèse que la spectrine est un polymère flexible qui se comporte comme un ressort entropique.

Topologie du squelette

Le fait que le squelette ait une structure bidimensionnelle, avec un réseau à base triangulaire lui confère des propriétés élastiques spécifiques. Comme nous l'avons déjà vu dans la partie 3 de ce chapitre, cette topologie particulière permet de relier de manière simple les modules d'extension et de cisaillement du squelette ($K_C = 2 \mu_C$).

5.2 Observation du comportement élastique d'un squelette libre

Il n'existe à notre connaissance qu'une seule étude portant sur le comportement élastique d'un squelette fraîchement extrait d'un globule rouge [Svoboda *et al.*, 1992]. Les expériences de Svoboda consistent à isoler un globule rouge sous un microscope, à le maintenir à l'aide d'une bille collée à sa membrane et piégée dans une pince optique, puis à injecter un détergent afin de dissoudre la bicouche lipidique. La taille et la forme du squelette sont mesurées par microscopie DIC (differential interference contrast) en fonction de l'osmolarité ou du taux de cisaillement de l'écoulement.

Le diamètre des squelettes dépend fortement de la force ionique du milieu environnant (et donc de l'osmolarité), de 8.5 μm à 25 mOsm/kg jusqu'à 4.3 μm à 300 mOsm/kg. À force ionique élevée, les squelettes s'effondrent de manière irréversible. Ceci semble dû à l'adhésion des filaments de spectrine entre eux : les charges assurant les répulsions électrostatiques entre filaments sont écrantées par les ions de la solution. D'autre part, un squelette déformé par écoulement est beaucoup plus flexible que le globule rouge dont il est issu. Ceci laisse à supposer un module de courbure de squelette moindre que celui de la membrane intacte. Les auteurs présentent aussi une évaluation grossière de la longueur de persistance d'un filament de spectrine *in situ*, de l'ordre de 6 nm. Cette évaluation est détaillée dans la partie 6 de ce chapitre.

Cette publication est le point de départ de notre travail. Nous reprenons le protocole de dissolution de la bicouche lipidique. De plus, nous commençons par des mesures à 25 mOsm/kg afin de s'affranchir de l'effondrement du squelette à haute osmolarité observé dans cette publication.

5.3 Estimation du rapport K_C/μ_C

Discher et collaborateurs ont mesuré un rapport K_C/μ_C proche de 2 à partir d'images obtenues en marquant l'actine d'un squelette aspiré dans une pipette [Discher *et al.*, 1994 ; Mohandas et Evans, 1994]. Les images obtenues montrent que le squelette glisse le long de la bicouche lipidique lors de son aspiration dans la pipette. La densité du squelette varie dans la portion de membrane aspirée (*cf.* Figure 1.15) : importante à l'entrée de la pipette, la densité de squelette est faible au niveau de la calotte. Les auteurs ont utilisé cette différence de densité pour en déduire une estimation du rapport K_C/μ_C . En notant ρ_e la densité de squelette à l'entrée de la pipette et ρ_c celle au niveau de la calotte, L la longueur totale de la portion de membrane aspirée et R_p le diamètre de la pipette, ils estiment :

$$\frac{\mu_C}{K_C} \frac{L}{R_p} \approx \frac{3}{4} \left[1 - \left(\frac{\rho_c}{\rho_e} \right)^2 \right] + \left[\frac{\rho_e}{2\rho_c} + \frac{\mu_C}{K_C} \right] \ln \left(\frac{\rho_e}{\rho_c} \right).$$

En mesurant ρ_e et ρ_c , les auteurs donnent une estimation du rapport K_C/μ_C proche de deux.

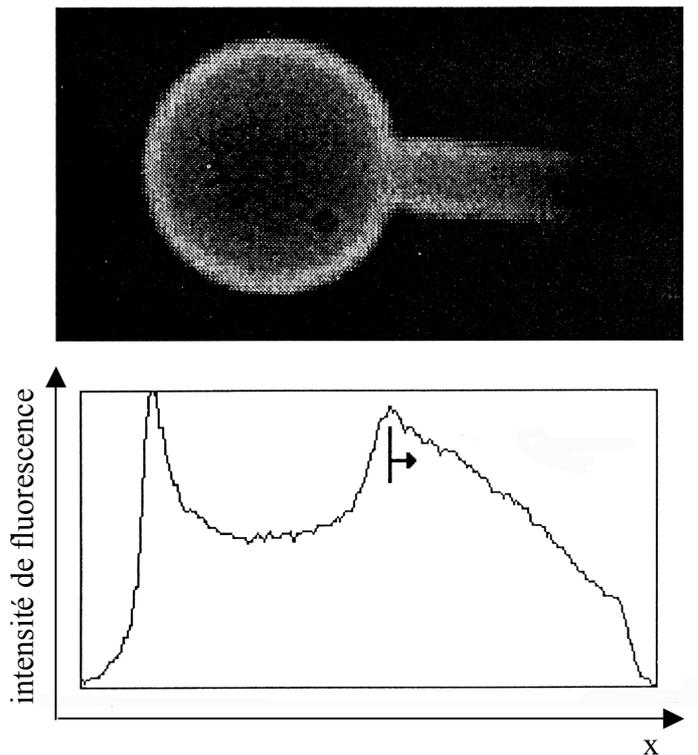


Figure 1.15 : L'actine des complexes de jonction est marquée par une sonde fluorescente. La variation d'intensité de fluorescence dans la pipette montre que le squelette glisse le long de la bicouche lipidique lors de l'aspiration [Discher *et al.*, 1994].

5.4 Simulations numériques de réseaux de ressorts

Boal [1994] a réalisé des simulations numériques en tenant compte du fait que la spectrine peut fluctuer en dehors du plan de la membrane. Il a réalisé des simulations de Monte Carlo sur un réseau triangulaire parfait de spectrine, celle-ci étant libre de fluctuer dans un demi-espace, les fluctuations dans l'autre demi-espace sont interdites par la présence de la bicouche lipidique. En entrant comme paramètres la température $T = 300 \text{ K}$, la longueur de contour ($L = 200 \text{ nm}$) et la longueur bout-à-bout *in situ* ($L_{bb} = 75 \text{ nm}$) des filaments de spectrine, il mesure $\mu_C = 10 \pm 2 \text{ }\mu\text{N/m}$ et $K_C = 17 \pm 2 \text{ }\mu\text{N/m}$. Il évalue donc le rapport du module d'extension K_C sur le module de cisaillement μ_C à 1.7.

Hansen *et al.* [1997] ont étudié le comportement mécanique d'un réseau bidimensionnel, triangulaire de ressorts, mais avec défauts topologiques. Les défauts sont créés en introduisant des hexamères et des octamères, ainsi qu'en faisant varier le nombre de

filaments de spectrine par actine de 3 à 8 de manière aléatoire. Ils ont montré que le module de cisaillement et le module d'extension pouvaient décroître jusqu'à un facteur deux lorsque le nombre de défauts du réseau augmente. En revanche, le rapport K_C/μ_C est de l'ordre de 2 lorsqu'il n'y a pas de défauts, et augmente avec la densité de défauts.

6. État des connaissances sur la raideur d'un filament de spectrine

Chaque filament de spectrine peut être modélisé comme un ressort entropique, de raideur k . Plusieurs évaluations de la longueur de persistance de la spectrine existent.

6.1 Évaluation de ξ d'après la longueur de contour et la longueur bout-à-bout d'un filament de spectrine

Dans le modèle de ver, la longueur de persistance ξ à 300 mOsm/kg peut être déduite de la longueur de contour L_0 de la spectrine et de sa longueur bout-à-bout R_{bb} [Flory, 1988] :

$$R_{bb} = \sqrt{2 \xi (L_0 - \xi)} .$$

L_0 est de l'ordre de 200 nm. Une approximation de la longueur bout-à-bout est donnée par la longueur des filaments de spectrine *in situ* entre 50 et 80 nm (*cf.* § 2.2 de ce chapitre). La longueur de persistance ainsi mesurée varie de 6 à 17 nm.

6.2 Mesure de la longueur de persistance de dimères de spectrine en solution

Cette étude a été réalisée par Stokke *et al.* [1985]. La longueur de persistance est déduite de l'étude de la viscosité d'une solution de dimères de spectrine. Ces dimères sont

purifiés à partir de globules rouges humains. La longueur de persistance est évaluée à 20 nm. Dans cette expérience, l'osmolarité n'est pas connue avec précision.

6.3 Expérience de dépliement des séquences de base de la spectrine

Deux études sur molécule unique par AFM (Atomic Force Microscopy) ont permis une mesure directe de la longueur de persistance d'un monomère de spectrine (et non d'un filament de spectrine, composé de deux dimères) [Rief *et al.*, 1999 ; Lenne *et al.*, 2000]. Cette technique consiste à accrocher une extrémité d'un monomère de spectrine à un cantilever de raideur connue, l'autre extrémité étant absorbée sur une surface (verre ou mica) montée sur un dispositif de nano-déplacement piézo-électrique. Un dispositif laser couplé à une photodiode mesure le déplacement du cantilever, et donc la force, pendant que la surface est éloignée.

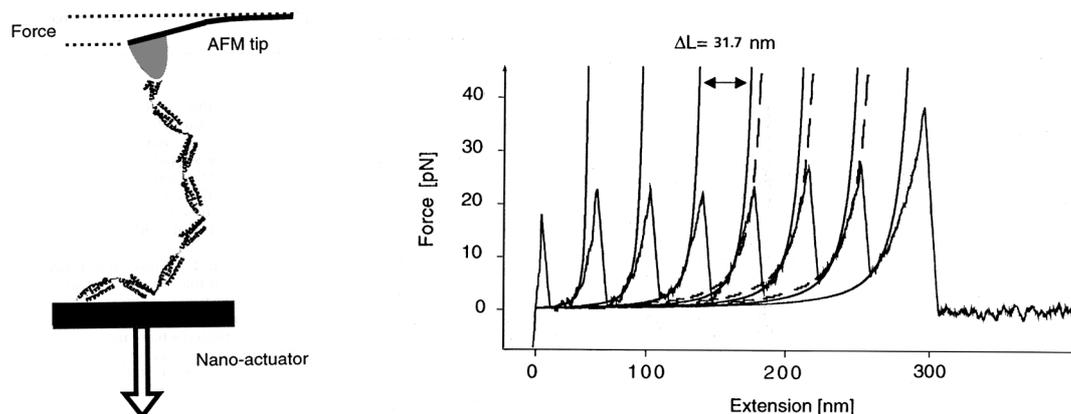


Figure 1.16 : Étirement d'un brin de spectrine par AFM. Un brin de spectrine est étiré en déplaçant la surface à l'aide d'un cristal piézo-électrique. Le diagramme Force/Extension montre le dépliement des séquences de base de la spectrine [Rief *et al.*, 1999].

La courbe donnant la force en fonction de l'extension est lissée par le modèle de Marko et Siggia. Ces mesures donnent une longueur de persistance de l'ordre de 0.8 nm pour un brin de spectrine à 300 mOsm/kg [Rief *et al.*, 1999] et de 0.6 nm à 150 mOsm/kg [Lenne

et al., 2000]. Notons toutefois que la longueur de persistance d'un filament de spectrine (association de dimères $\alpha\beta$) doit être plus importante que celle d'un seul monomère.

6.4 Expérience de Svoboda *et al.* [1992]

Les expériences sur le comportement de squelettes libres fraîchement extraits donnent une mesure indirecte et approximative de la longueur de persistance de filaments de spectrine *in situ* (inclus dans un réseau). C'est à notre connaissance la seule mesure existante réalisée sur un filament inclus dans le squelette du globule rouge. Ce dernier point est important car la spectrine en solution peut avoir des propriétés élastiques différentes de la spectrine *in situ*.

Svoboda et collaborateurs définissent la longueur de persistance ξ comme la somme d'une longueur ξ_{elec} due aux répulsions électrostatiques au sein de la protéine, et d'une longueur ξ_{ste} due aux répulsion stériques entre atomes. La première longueur dépend de l'osmolarité du milieu environnant, la deuxième non. La longueur de persistance est déduite de la courbe donnant le diamètre du squelette en fonction de l'osmolarité. Le diamètre diminue lorsque l'osmolarité augmente, jusqu'à une osmolarité de 215 mOsm/kg à partir de laquelle le diamètre ne varie plus. En ce point, les auteurs estiment que ξ_{elec} est égal à ξ_{ste} . Or, la valeur de ξ_{ste} évaluée par simulation numérique, est de l'ordre de 3 nm. Ils en déduisent ainsi une longueur de persistance de la spectrine *in situ* de 6 nm à 215 mOsm/kg.

6.5 Bilan sur la longueur de persistance

	Longueur de persistance ξ	Osmolarité (mOsm/kg)
D'après la longueur bout-à-bout de la spectrine <i>in situ</i>	6-17 nm	300
Dimère de spectrine en solution, par viscosimétrie, [Stokke <i>et al.</i> , 1985]	20 nm	?
Monomère de spectrine par AFM, [Rief <i>et al.</i> , 1999]	0.8 nm	300
Monomère de spectrine par AFM, [Lenne <i>et al.</i> , 2000]	0.6 nm	150
Spectrines incluses dans le squelette, [Svoboda <i>et al.</i> , 1992]	6 nm	215

Table 2 : Bilan des différentes mesures de la longueur de persistance de la spectrine.

Conclusion

Les propriétés élastiques remarquables du globule rouge humain sont dues à sa membrane. Celle-ci est composée d'une bicouche lipidique sous laquelle est ancré un réseau bidimensionnel de protéines : le squelette. Ce squelette est constitué de longs filaments de spectrine reliés entre eux par des complexes de jonction, le tout formant un réseau grossièrement triangulaire. La bicouche lipidique semble contrôler la résistance à l'extension de la membrane alors que le squelette semble contrôler la résistance au cisaillement. Les propriétés mécaniques du squelette proviennent à la fois de sa topologie (réseau bidimensionnel triangulaire) et de la raideur de chaque filament de spectrine. Ces derniers peuvent être modélisés par des ressorts entropiques.

Le module d'extension de la membrane, mesuré par micropipette, est de l'ordre de 300 à 500 mN/m. La même technique donne un module de cisaillement de la membrane compris entre 4 et 10 μ N/m. En ce qui concerne le squelette, sa structure bidimensionnelle triangulaire implique que le module d'extension doit être environ le double du module de cisaillement.

Enfin, la raideur de la spectrine est déterminée par sa longueur de persistance, qui est de l'ordre du nanomètre, voire de la dizaine de nanomètre.

Comme nous l'avons vu, l'étude de l'élasticité de la membrane du globule rouge se révèle être un problème complexe. Bien que les premières études sur l'élasticité datent du début des années 1970, plusieurs questions restent en suspens. Une de ces questions est de comprendre le rôle respectif de la bicouche lipidique et du squelette. Il est nécessaire pour cela de réaliser des mesures d'élasticité de la membrane et de les comparer à des mesures similaires sur le squelette seul. Ceci est un des objectifs de cette thèse. D'autre part, il n'existe pas de mesures précises de la longueur de persistance ξ de la spectrine *in situ*. Or, il apparaît possible de déduire ξ des modules élastiques macroscopiques du squelette seul. La mesure de ξ est un deuxième objectif de cette thèse.

Chapitre 2

Les Pincés Optiques

Introduction

Les forces radiatives – ou exercées par la lumière – n’ont que peu d’effet à l’échelle macroscopique. Un des rares exemples macroscopiques de ces forces est donné par l’orientation de la queue des comètes, comme l’a découvert l’astronome Johannes Kepler au début du XVII^e siècle. Celle-ci est toujours orientée dans la direction opposée au soleil parce que les particules la composant sont poussées par les forces radiatives. En 1873, James Clerk Maxwell démontre théoriquement que la lumière peut exercer des forces. De par leurs très faibles valeurs, il faut attendre le début des années 1960 et le développement des lasers pour que ces forces soient étudiées.

Un pionnier dans ces études a été Arthur Ashkin. En focalisant un faisceau laser, il a pu déplacer et même faire léviter des particules de quelques microns de diamètre. Ces recherches sont à la base du piégeage et du refroidissement d’atomes, ainsi que du développement des pincés optiques [Ashkin, 1970 ; Ashkin *et al.*, 1987].

Selon la puissance du faisceau laser, les pincés optiques exercent des forces allant de quelques piconewtons à quelques centaines de piconewtons sur des objets de taille micronique. Cette gamme de force est bien adaptée à l’étude des cellules et des macromolécules.

Nous présentons dans la première partie de ce chapitre le principe des pinces optiques. Le dispositif expérimental utilisé dans ce travail est ensuite décrit. La troisième partie présente les étalonnages donnant la force exercée par une pince sur une bille. Enfin, nous présentons un dispositif de mesure de déplacement d'une bille piégée à l'aide d'une photodiode à quadrants.

Ce chapitre est en partie inspiré de l'article de Svoboda et Block [1994], du livre *Laser tweezers in cell biology* [1998] et de la thèse de doctorat de A. J. Simon [1992].

1. Principe des pinces optiques

Comment créer une pince optique

Une pince optique est obtenue en focalisant un puissant faisceau laser à profil d'intensité gaussien, par un objectif de microscope de grande ouverture numérique. Le gradient d'intensité lumineuse ainsi créé a la propriété de piéger de manière stable des petits objets diélectriques d'indice optique supérieur à celui du milieu environnant. Le piégeage s'effectue au point de plus forte intensité, à savoir le point de focalisation.

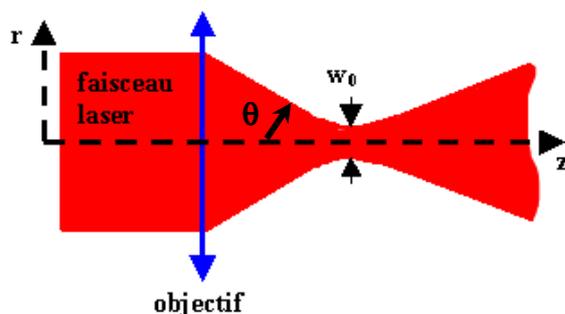


Figure 2.1 : Une pince optique est créée en focalisant un puissant faisceau laser par un objectif de microscope.

Focalisation du faisceau laser

Le laser émet dans le mode fondamental TEM_{00} . L'intensité lumineuse de ce mode a un profil gaussien. Lorsqu'un tel faisceau est focalisé par un objectif de microscope, il reste gaussien, mais sa largeur varie suivant l'axe z (*cf.* Figure 2.1). Le gradient d'intensité dans le plan transverse au faisceau est créé par le profil gaussien. En revanche, le gradient suivant l'axe z est dû à la focalisation du faisceau par l'objectif du microscope.

L'intensité lumineuse est donnée par [Simon, 1992] :

$$I(r, z) = \frac{2 P_{\infty}}{\pi w(z)^2} \exp\left[-\frac{2 r^2}{w(z)^2}\right] \text{ avec } w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2} \text{ et } z_0 = \frac{\pi w_0^2 n_{\text{mil}}}{\lambda}.$$

P_{∞} est la puissance totale du laser, λ sa longueur d'onde et n_{mil} l'indice optique du milieu. La largeur w_0 de la tache de diffraction au point de convergence est fonction de l'ouverture numérique ON de l'objectif :

$$w_0 = \frac{1.22 \lambda}{2 \text{ ON}}.$$

L'ouverture numérique est définie par $\text{ON} = n_{\text{mil}} \sin \theta$ où θ est le demi-angle du cône émergent (*cf.* Figure 2.1).

Forces radiatives

Il y a deux types de forces radiatives en compétition. La première est la force de gradient qui tend à amener la particule dans la région de plus haute intensité lumineuse. Elle agit suivant la direction du gradient d'intensité. La seconde est due à la pression de radiation qui agit suivant le sens de propagation du faisceau et tend à pousser la particule hors du piège.

Pourquoi y a-t-il piégeage ? Pour répondre à cette question, nous considérerons deux cas suivant la taille de la particule piégée. Le premier est le cas où la particule est petite devant la longueur d'onde λ du laser. Dans ce cas, le champ électrique est considéré comme uniforme sur la particule et les relations de l'électromagnétisme s'appliquent simplement. Le deuxième cas concerne les particules grandes devant la longueur d'onde. Un raisonnement d'optique géométrique explique alors le piégeage.

1.1 Description électromagnétisme ou régime de Rayleigh

Le champ électrique est supposé uniforme sur la particule sphérique diélectrique. Sous l'action du champ électrique, la particule acquiert un moment dipolaire induit \vec{p} . La particule est alors considérée comme un dipôle induit ponctuel. L'expression de \vec{p} est :

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \text{ avec } \alpha = 4 \pi \epsilon_0 n_{\text{mil}}^2 \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) a^3, \text{ la constante de polarisation.}$$

\vec{E} est le champ électrique, n_{mil} l'indice optique du milieu environnant la particule, n_{par} l'indice optique de la particule, $m = n_{\text{par}}/n_{\text{mil}}$, et a le rayon de la particule piégée.

Force de gradient

La force de gradient est donnée par :

$$\vec{F}_{\text{grad}} = (\vec{p} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E} = \frac{1}{2} \alpha \vec{\nabla} E^2 = \frac{4 \pi a^3}{c} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \vec{\nabla} I.$$

L'intensité lumineuse est $I = \frac{1}{2} \epsilon_0 n_{\text{mil}}^2 c E^2$, c la célérité de la lumière dans le vide.

Cette expression montre que i) la force de gradient est orientée suivant le gradient d'intensité lumineuse, et que ii) le piégeage n'est possible que si m est supérieur à 1, autrement dit que si l'indice optique de la particule est supérieur à celui du milieu environnant. Cette expression explique l'origine du piégeage et montre que la particule diélectrique est attirée vers le point de plus forte intensité lumineuse, à savoir le point de focalisation du laser.

Force de pression radiative

La force \vec{F}_{scat} de pression radiative exercée sur une sphère est donnée par

$$\vec{F}_{\text{scat}} = \frac{c}{n_{\text{mil}}} P_{\text{scat}} \vec{u}, \text{ avec } \vec{u} \text{ un vecteur unitaire orienté suivant le sens de propagation de la}$$

lumière, et P_{scat} la puissance diffusée par la sphère. La puissance diffusée par un dipôle est :

$$P_{\text{scat}} = \frac{\omega k^3}{12 \pi \epsilon_0 n_{\text{mil}}^2} \|\vec{p}\|^2 \text{ d'où } \vec{F}_{\text{scat}} = \frac{128 \pi^5 a^6}{3 \lambda^4 c} n_{\text{mil}} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 I \vec{u}.$$

k est le nombre d'onde et ω la pulsation. Nous retrouvons le terme en $1/\lambda^4$ responsable du rouge des couchers de soleil.

La pression de radiation dépend linéairement de l'intensité lumineuse et varie en $1/\lambda^4$. L'utilisation d'une grande longueur d'onde (proche infrarouge) minimise cette force. Pour faire léviter une particule, il faut lutter contre la pression de radiation et contre le poids apparent de la particule. Ceci signifie que le gradient d'intensité suivant l'axe z du faisceau doit être important, d'où l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique (supérieure à 1, donc à immersion).

1.2 Description d'optique géométrique ou régime de Mie

Étudions maintenant le cas où la particule est grande devant la longueur d'onde. Une solution à ce problème est donnée par Ashkin [1992]. Nous ne présentons ici qu'une explication qualitative. Le faisceau laser est considéré comme une somme de i rayons lumineux. Tous ces rayons sont focalisés en un même point. Dans ce modèle, les effets de diffraction sont négligés, puisque l'objet est grand devant la tache de diffraction.

Un rayon traversant la sphère change de direction. Chaque rayon i a une impulsion \vec{p}_i différente : $\vec{p}_i = n_i \hbar \vec{k}$, où n_i est le nombre de photons dans le rayon i , \hbar est la constante de Planck et \vec{k} le vecteur d'onde. La conservation de l'impulsion montre qu'une impulsion est transmise à la sphère. La somme de toutes les impulsions transmises par unité de temps produit une force sur la bille qui est en position d'équilibre stable lorsqu'elle se trouve au point de convergence du faisceau.

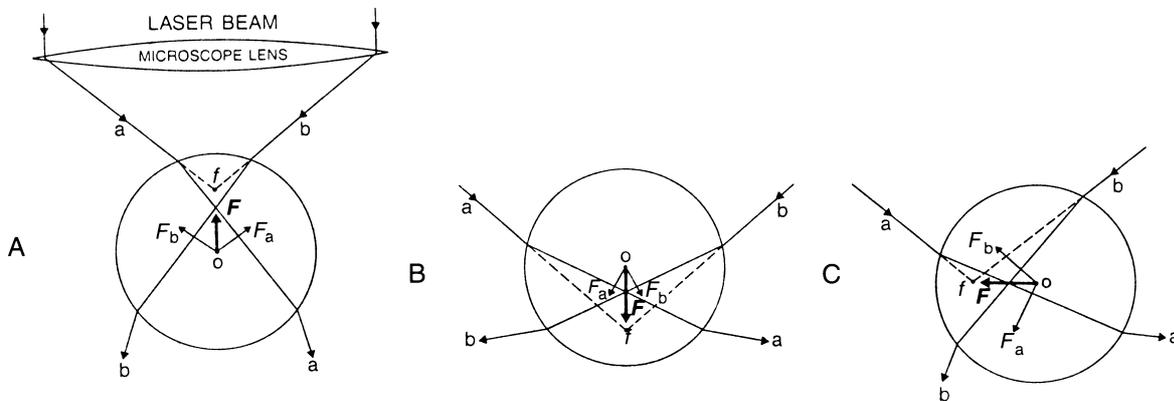


Figure 2.2 : Dans le cas où la bille est grande devant la longueur d'onde, le faisceau est décrit comme une somme de i rayons lumineux. A) et B) représentent le piégeage selon l'axe du faisceau ; C) celui dans le plan transverse [Ashkin, 1992].

1.3 Cas intermédiaire

Le piégeage est optimal lorsque la taille de la particule piégée est de l'ordre de grandeur de la taille du piège w_0 . Dans ce cas, il n'est pas possible de calculer la force exercée par le faisceau sur une bille piégée. La connaissance de l'intensité de la force nécessite un étalonnage. Cet étalonnage est décrit dans la section 3 de ce chapitre.

1.4 Choix de la longueur d'onde

Un des inconvénients des pinces optiques est l'élévation locale de la température et les éventuels dommages qui pourraient en résulter. Ce problème est primordial parce que le laser utilisé est de grande puissance (jusqu'à plusieurs centaines de mW).

Il y a deux moyens complémentaires de minimiser l'échauffement. Le premier est de ne pas piéger directement l'objet biologique étudié mais de piéger un objet intermédiaire, par exemple des billes de silice ou de latex qui adhèrent à l'objet biologique. Le deuxième moyen consiste à optimiser la longueur d'onde du laser afin de minimiser l'absorption par l'objet biologique.

Minimiser l'absorption de l'eau et de l'hémoglobine

Dans le globule rouge, l'absorption se fait essentiellement par l'eau et l'hémoglobine. La figure 2.3 présente le spectre d'absorption de l'hémoglobine (à la concentration physiologique) et de l'eau en fonction de la longueur d'onde. Aux environs de 1100 nm, les deux courbes présentent un minimum. Ceci est une des raisons pour lesquelles nous utilisons un laser Nd:YAG de longueur d'onde d'émission 1064 nm.

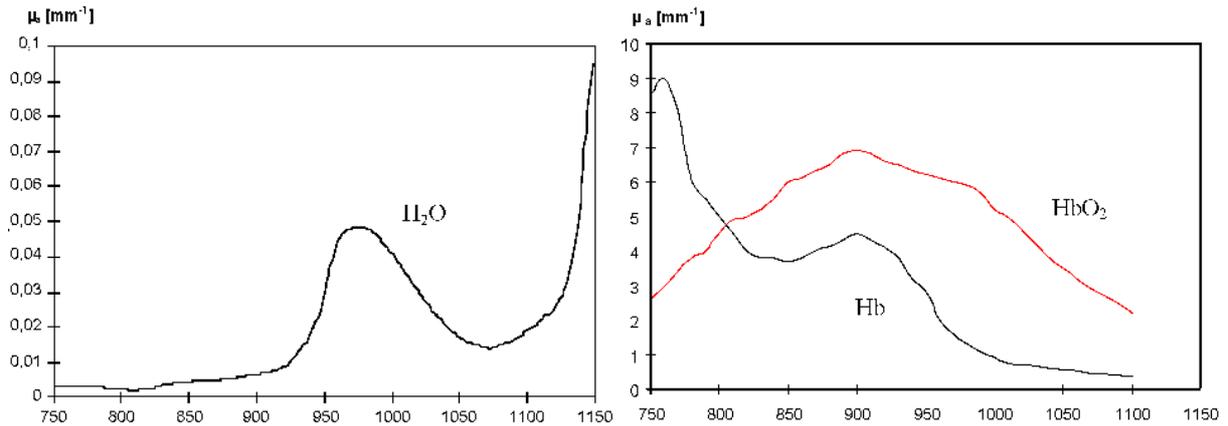


Figure 2.3 : Absorption de l'eau et de l'hémoglobine (à la concentration physiologique) en fonction de la longueur d'onde (les deux graphiques n'ont pas la même échelle en ordonnée).

Évaluation de l'échauffement local

Nous cherchons l'élévation de température due au laser focalisé directement sur un globule rouge. Nous ne considérons que l'absorption de l'hémoglobine sur une sphère de rayon R égal à la taille du piège ($R \sim 1 \mu\text{m}$). L'énergie est dissipée par conductivité thermique dans l'eau ($k_{\text{eau}} = 0.6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$).

En régime permanent, la distribution de température en dehors de la sphère est donnée par :

$$\Delta T = 0.$$

La relation donnant la température T en fonction de la température T_0 à l'infini et de la distance r au centre de la sphère est :

$$T(r) = T_0 + \frac{A}{r}, \text{ pour } r > R.$$

Nous voulons déterminer la température $T(R)$. Le coefficient A est obtenu à partir du flux de chaleur :

$$\frac{k_{\text{eau}} A}{r^2} \approx \frac{P_{\text{abs}}}{r^2} ; \text{ d'où } A = \frac{P_{\text{abs}}}{k_{\text{eau}}}.$$

La puissance absorbée P_{abs} par l'hémoglobine est donnée par : $P_{\text{abs}} = P (1 - e^{-\alpha R})$, où α est l'absorption d'une solution physiologique d'hémoglobine, à $1064 \mu\text{m}$ (20 cm^{-1}) et P la puissance du faisceau laser sur le globule rouge (100 mW).

Finalement, l'élévation de température est de l'ordre de A/R et vaut environ 3 K.

Ceci est en accord avec certaines évaluations et mesures [Liu *et al.*, 1995 ; Kuo, 1995]. Ces auteurs évaluent l'élévation de température dans l'eau de l'ordre de 1 à 1.5°C pour une émission de 100 mW.

2. Dispositif expérimental

Nous allons maintenant décrire le dispositif expérimental. Il est comparable à celui utilisé par Simmons *et al.*, [1996]. Les pinces optiques sont construites autour d'un microscope droit de marque Reichert. Le dispositif peut être séparé en deux parties : les pinces optiques et l'observation. Un détecteur de position est utilisé dans les expériences présentées au chapitre 6. Les modifications au montage de base sont présentées dans la partie 4 de ce chapitre.

2.1 Schéma du dispositif expérimental

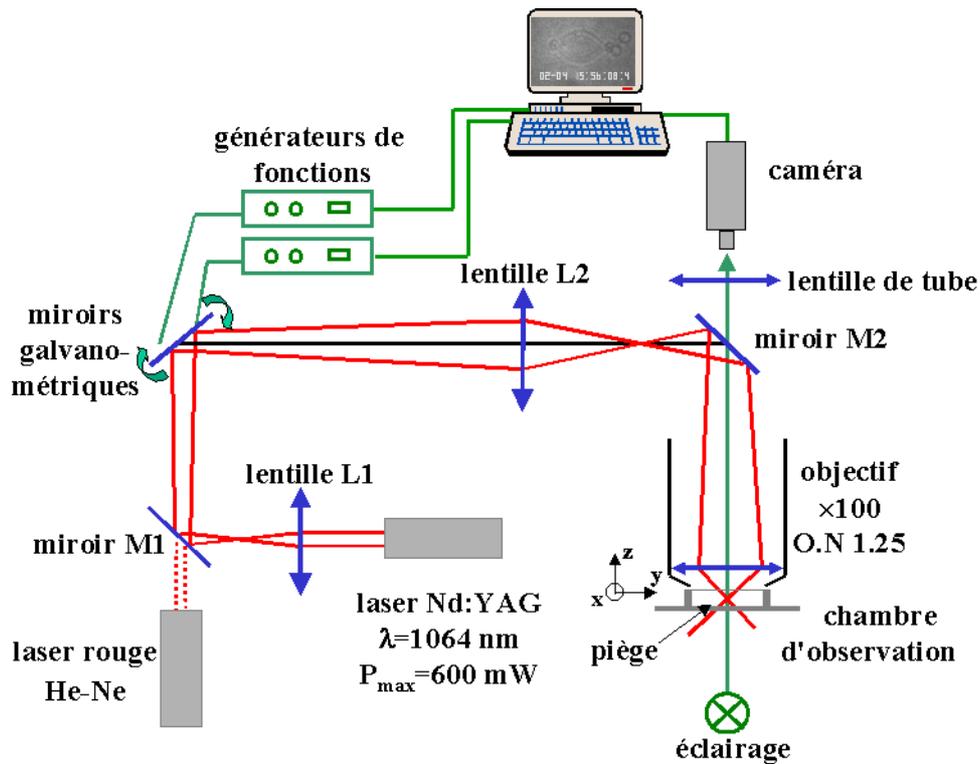


Figure 2.4 : Schéma du dispositif expérimental. Le faisceau laser est focalisé par un objectif à immersion. Le piège se situe au point de focalisation. Deux miroirs galvanométriques permettent de déplacer le piège dans le plan de focalisation, ou de créer plusieurs pinces simultanément.

2.2 Description des différents éléments

Les lasers

Le piégeage est réalisé par un laser infrarouge continu Nd:YAG (modèle R2-E-106C, Spectra Physics) dont la puissance en émission est ajustable de 50 à 600 mW. La longueur d'onde d'émission est de 1064 nm et la divergence du faisceau est estimée à $\Delta\theta \sim 2.10^{-3}$ rad. Ce laser émet dans le mode fondamental TEM_{00} : le profil en intensité est gaussien. Ce type de laser a été choisi pour trois raisons. Il est puissant, le faisceau a un profil gaussien et son émission dans le proche infrarouge minimise l'absorption par les cellules.

Nd:YAG est l'abréviation de « neodymium:yttrium aluminum garnet ». La source de photons est le cristal YAG, l'élément actif est le néodyme. Ce dernier se désexcite en émettant un photon à 1064 nm. L'inversion de population est réalisée par deux diodes lasers, de puissance ajustable jusqu'à 2 W. Ce type de pompage crée un faisceau très stable et ne nécessite pas de refroidissement particulier.

Un laser rouge Hélium-Néon est superposé au laser infrarouge de manière à effectuer les réglages optiques et à visualiser la position du piège à l'écran. Sa faible puissance, de l'ordre de 1 mW, est sans effet sur les globules rouges, ni sur les objets piégés. Il est de plus systématiquement éteint pendant l'utilisation des pinces optiques afin de ne pas détériorer la qualité des images enregistrées.

Les miroirs galvanométriques

Un dispositif de deux miroirs galvanométriques (modèle 6800 HP, Cambridge Technology), d'axes perpendiculaires l'un à l'autre permet i) de déplacer la pince optique dans le plan transverse au faisceau, et ii) de commuter le faisceau entre deux, trois ou quatre positions différentes afin de créer plusieurs pinces simultanément. L'obtention et l'utilisation de pinces multiples sont détaillées dans la partie 2.3 de ce chapitre.

Chacun des miroirs est alimenté par un générateur de puissance (non représenté sur la Figure 2.4). Le positionnement et le déplacement de chacun des miroirs sont contrôlés par un générateur de fonction qui module le signal d'alimentation des miroirs.

Les miroirs et les lentilles

Le miroir dichroïque M1 permet la superposition des deux faisceaux lasers. Il laisse passer la lumière visible mais réfléchit l'infrarouge. Le miroir dichroïque M2, dans le

microscope, réfléchit la totalité de la lumière infrarouge vers l'objectif, mais laisse passer la lumière visible vers l'oculaire et la caméra.

La lentille L1 convergente, de focale +200 mm, réduit la divergence de faisceau et assure que la totalité du faisceau soit réfléchi par les deux (petits) miroirs galvanométriques. La lentille L2 convergente, de focale +500 mm, a deux fonctions. La première est d'ajuster le diamètre du faisceau à la pupille d'entrée du microscope, ce qui maximise le gradient d'intensité lors de la focalisation. La deuxième est de faire l'image des miroirs galvanométriques sur la pupille d'entrée du microscope. Lorsque plusieurs pièges sont utilisés, le faisceau oscille entre plusieurs positions, et la lentille évite que le faisceau ne sorte du microscope.

Le faisceau laser est divergent lorsqu'il arrive sur l'objectif du microscope. Ceci signifie que le point de focalisation du laser est légèrement décalé par rapport au plan de visualisation. Cet effet est aggravé par les aberrations chromatiques axiales ; l'objectif n'est pas optimisé pour la lumière infra-rouge. Ces deux effets sont toutefois négligeables car une bille piégée apparaît nette.

L'objectif à immersion

Un objectif à immersion est utilisé à la fois pour le piégeage et pour l'observation. L'objectif a une ouverture numérique de 1.25 et un grossissement $\times 100$. Une huile adaptatrice, d'indice optique 1.5, est utilisée afin de supprimer les interfaces verre-air entre l'objectif et la lamelle.

L'observation

Lors de l'utilisation des pinces optiques, l'observation se fait à l'aide d'une caméra (SIT 68, Dage-MTI Inc.) reliée à un moniteur de contrôle. Cette caméra n'est pas sensible à l'infrarouge, les pièges n'apparaissent pas sur les images. Les images sont enregistrées sur un Macintosh équipé d'une carte d'acquisition d'images (ScionQuest) et sur un magnétoscope S-VHS.

2.3 Obtention, positionnement et déplacement de pinces multiples

Obtention de pinces multiples

Les manipulations sur le globule rouge ont nécessité l'utilisation de deux pinces optiques simultanément, celles sur le squelette de trois. Plusieurs pinces sont obtenues sur le principe du partage en temps du faisceau [Visscher, 1993]. Le faisceau commute entre différentes positions à une certaine fréquence f_C . Une fréquence f_C trop faible (inférieur à 50 Hz) permet à un objet de s'éloigner du centre de la pince entre deux passages du laser. Une fréquence trop grande (\sim kHz) augmente considérablement le temps de transit entre chaque piège et une partie importante de la puissance est perdue entre les pièges. La durée de commutation des miroirs d'une position à l'autre est de l'ordre de 200 μ s. Nous avons évalué la fréquence f_C optimale à 200 Hz pour notre dispositif. Naturellement, la force exercée par une pince dépend du nombre de pinces utilisées. Il a donc été nécessaire de réaliser un étalonnage en fonction du nombre de pinces.

Positionnement et déplacement

Nous avons modifié le logiciel d'acquisition et de traitement d'image NIH Image afin de contrôler le nombre de pièges, leur position et leur déplacement. Le choix du nombre de

pièges, ainsi que leur position se fait directement sur l'image acquise depuis la camera. Ceci permet de positionner les pièges directement sur les billes avec une grande précision. Il est ensuite possible de déplacer les pièges les uns par rapport aux autres. Ce programme gère jusqu'à quatre pièges simultanément.

Les pièges ne sont que partiellement indépendants les uns des autres. Il n'est pas possible de modifier leur disposition générale sans interrompre l'alimentation des miroirs (cela permettrait au globule rouge de s'échapper). En revanche, la distance relative entre chaque piège peut être modifiée dans deux directions perpendiculaires.

3. Calibration des forces

Un étalonnage est nécessaire pour déterminer la force exercée par une pince sur une bille piégée. Nous avons réalisé deux types d'étalonnages. Le premier consiste à déterminer la force maximale exercée par le piège, avant que la bille ne sorte du piège. Le deuxième mesure la raideur du piège, c'est à dire la force exercée sur la bille suivant la position de celle-ci dans le piège. Nous avons enfin évalué la raideur d'un piège lorsque plusieurs pièges sont utilisés simultanément.

3.1 Principe de l'étalonnage

La focalisation du laser crée un puits de potentiel (*cf.* Figure 2.5). Réaliser un étalonnage des forces revient à déterminer la forme de ce potentiel. La force exercée sur la bille par le piège dépend de la position r de la bille dans le piège (r est la distance dans le plan transverse au faisceau). Le point d'inflexion de la courbe donnant l'énergie en fonction de la position r correspond à la force maximale exercée par la pince. À faible r , typiquement

inférieur au micron, le potentiel est harmonique et nous pouvons déterminer la raideur du piège.

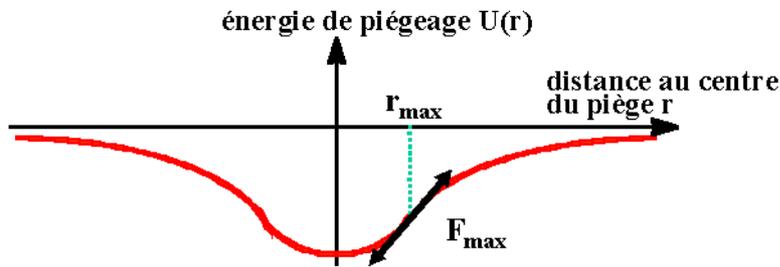


Figure 2.5 : Forme du puits de potentiel créé par la focalisation du laser.

3.2 Mesure de la force maximale

Principe de l'étalonnage

Une suspension de billes de $2.1 \mu\text{m}$ de diamètre à 2.5% en volume est préparée puis déposée dans une chambre d'observation. La chambre d'observation se compose d'une lame et d'une lamelle dont la distance de séparation est fixée par un film plastique à une centaine de microns. Une bille est piégée dans une pince optique (cf. Figure 2.6) et un signal sinusoïdal à basse fréquence est appliqué à un des miroirs. Le piège se déplace alors dans le champ d'observation. L'amplitude des oscillations est fixée arbitrairement à $23.8 \mu\text{m}$ et la fréquence varie de 10 à 100 Hz . La bille suit le piège. Elle est soumise à la force de piégeage et à la force de frottement visqueux exercée par l'eau sur la bille. Le nombre de Reynolds est petit devant 1 , l'inertie est donc négligeable et la force de frottement visqueux est donnée par la force de Stokes :

$$\vec{F}_s = -6 \pi \eta a \vec{V}.$$

où η est la viscosité de l'eau prise à 25°C ($\eta = 0.9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$), a est le rayon de la bille ($a = 1.05 \mu\text{m}$) et \vec{V} sa vitesse. La vitesse maximale de la bille est $V_{\text{max}} = 2 x_0 \pi \nu$, où x_0 est

l'amplitude ($2x_0 = 23.8 \mu\text{m}$), ν la fréquence des oscillations. La fréquence d'oscillation ν est progressivement augmentée. À tout moment, la force de piégeage est égale à la force de Stokes. À l'échappement de la bille, la force maximale est donnée par $F_{\text{pince}} = 6\pi\eta aV_{\text{max}}$. La force de piégeage maximale est mesurée en fonction de la puissance d'émission du laser et de la distance h du piège à la lamelle. Cette distance h est mesurée en déplaçant la platine du microscope verticalement à l'aide d'une vis micrométrique, tandis qu'une bille est piégée. L'erreur sur cette mesure est de $\pm 1 \mu\text{m}$.

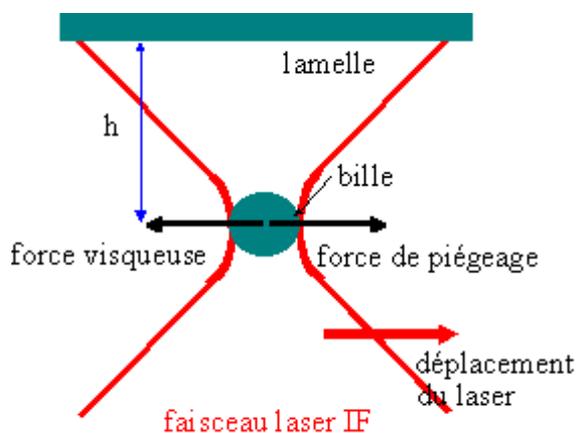


Figure 2.6 : Le piège oscille, la bille est alors soumise à la force de la pince et à une force de frottement visqueux. La fréquence d'oscillation est augmentée progressivement. La force de piégeage maximale est déterminée lorsque la bille sort du piège.

Force de Stokes près d'une paroi plane

L'expression de la force de Stokes n'est valable que dans un fluide infini. Une correction est apportée pour tenir compte de l'influence d'une des parois. Un facteur multiplicatif β vient corriger la force de Stokes afin de prendre en compte l'annulation du champ de vitesse à la paroi. Son expression d'après Happel et Brenner [1991] est :

$$\vec{F}_s = -6\pi\eta a \vec{V} \beta, \text{ avec } \beta = \frac{1}{1 - \frac{9}{16}\left(\frac{a}{h'}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{a}{h'}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{a}{h'}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{a}{h'}\right)^5},$$

où a est le rayon de la bille et h' la distance de la bille à la paroi la plus proche – notons que $h' = h$ pour $h < e/2$ avec e la hauteur de la chambre d'observation et $h' = e - h$, quand $h > e/2$. Pour une bille de diamètre $2.1 \mu\text{m}$, la correction est inférieure à 1% au-delà de $50 \mu\text{m}$. Les chambres d'observation font une centaine de microns de hauteur ; nous ne prenons en compte l'influence que d'une seule paroi.

Étalonnage à un piège

Nous avons réalisé une série de mesures suivant la puissance du laser et la distance entre le piège et la lamelle. La figure 2.7 montre la variation de la force maximale en fonction de la puissance d'émission du laser.

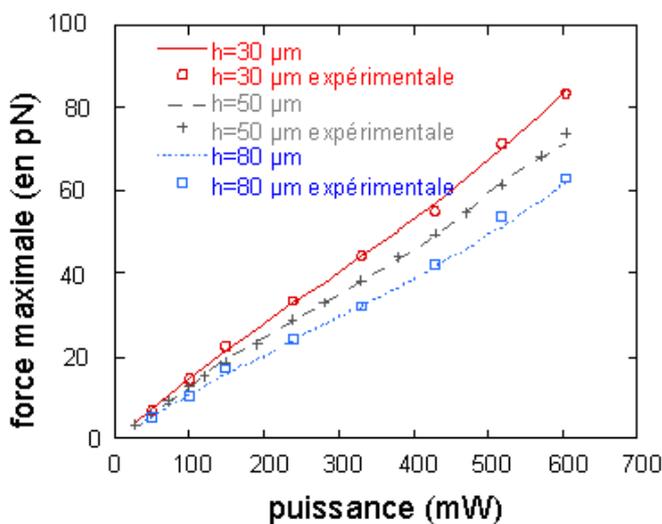


Figure 2.7 : Variation de la force maximale de piégeage en fonction de la puissance du laser pour $h = 30 \mu\text{m}$, $h = 50 \mu\text{m}$ et $h = 80 \mu\text{m}$. Les points expérimentaux sont superposés à la courbe obtenue par l'équation 2.1 (en trait plein).

En première approximation, la force maximale est proportionnelle à la puissance du laser, comme prévu par la théorie. Un écart à la linéarité est cependant observé au-delà de 300 mW . Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène est que le mode TEM_{00} soit pollué par un autre mode non gaussien. De plus, la force décroît lorsque la distance à la lamelle h augmente. Ceci est dû à l'interface verre-eau, au voisinage de la lamelle, qui n'est pas un dioptre parfaitement stigmatique, puisqu'il est plan. La forme du piège dépend alors de h .

Par commodité, nous avons déterminé la loi empirique donnant la force maximale en fonction de la puissance P d'émission du laser et de la distance h du piège à la lamelle. La dépendance en puissance est modélisée par un polynôme du 3^e degré afin de tenir compte de l'écart à la linéarité. Nous avons obtenu :

$$F(P, h) = \frac{a + b P + c P^2 + d P^3}{h + h_0}, \quad \text{Eq. 2.1}$$

avec $a = -79.9 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}$, $b = 21.9 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}/\text{mW}$, $c = -0.02 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}/\text{mW}^2$, $d = 2.4 \cdot 10^{-5} \text{ pN}\cdot\mu\text{m}/\text{mW}^3$ et $h_0 = 104.5 \mu\text{m}$. La figure 2.7 représente trois courbes types obtenues à 30, 50 et 80 μm de la lamelle. Les points expérimentaux sont superposés à la courbe obtenue par l'équation 2.1.

Nous avons estimé la précision sur l'intensité de la force de l'ordre de 5%. La principale source d'incertitude vient de la dispersion dans le diamètre des billes. Cette dispersion est de l'ordre de $\pm 0.1 \mu\text{m}$. La force maximale mesurée sur deux billes différentes dans les mêmes conditions diffère de quelques pour-cent. Une deuxième source d'erreur peut provenir d'un mauvais alignement des lasers ou de poussières sur le matériel optique. C'est pour cela que l'alignement est réalisé minutieusement au début de chaque manipulation et nous vérifions par un test que la force obtenue est en accord avec l'étalonnage.

Force maximale avec deux pinces

La force maximale lorsque deux pinces sont utilisées simultanément est mesurée par la même méthode. Deux pièges sont créés en faisant commuter un miroir à la fréquence f_C égale à 300 Hz. Nous avons trouvé :

$$F_2(P, h) = \alpha F_1(P, h)$$

où F_2 est l'intensité de la force maximale exercée par une des pinces lorsque deux pinces sont présentes, et F_1 est celle lorsque seulement une pince est présente. α vaut 0.44 pour $h = 30 \mu\text{m}$, 0.42 pour $h = 50 \mu\text{m}$ et 0.40 pour $h = 80 \mu\text{m}$. Le paramètre α ne dépend pas de la puissance du laser mais dépend légèrement de la distance à la lamelle h .

En ce qui concerne la dépendance en fonction de f_c , α est constant pour $50 < f_c < 300 \text{ Hz}$; mais il décroît rapidement lorsque f_c est supérieur à 400 Hz. Ceci est dû à la durée de commutation des miroirs, de l'ordre de 200 μs . À des fréquences plus élevées, le temps passé par le faisceau entre deux pièges devient important et une grande partie de la puissance est ainsi perdue.

3.3 Mesure de la raideur du piège

Principe

Le principe est le même que décrit précédemment, hormis la chambre d'observation qui est disposée sur un cristal piézo électrique (model P-180, PolytecPI). La force de frottement visqueux n'est plus appliquée en déplaçant le faisceau mais en déplaçant la chambre entière. Un signal triangulaire est appliqué au piézo, l'amplitude est fixée à 20 μm et nous augmentons la fréquence (de 10 à 100 Hz) afin d'accroître la force de Stokes. La bille adopte alternativement deux positions d'équilibre (séparées d'une distance $2r$) en fonction du sens de déplacement de la chambre d'observation. Pour chaque position d'équilibre, la force de piégeage est l'opposé de la force de Stokes. Pour chaque force appliquée, nous mesurons la distance r du centre de la bille au centre du piège et la force de piégeage correspondante est calculée à partir de la force de Stokes.

Résultats

La figure représente la variation de la force de piégeage en fonction de la distance r du centre de la bille au centre du piège. Une relation linéaire est observée, ce qui signifie que le piège est harmonique pour des distances r inférieures à $1\ \mu\text{m}$.

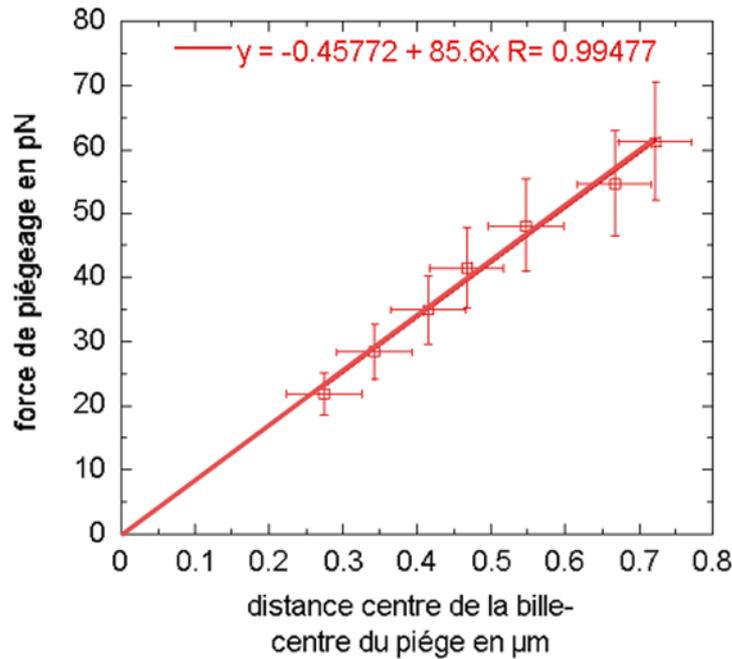


Figure 2.8 : La force de piégeage est représentée en fonction de la distance r de la bille au centre du piège, à la puissance $P = 330\ \text{mW}$. Le piège est harmonique pour des distances r inférieures à $1\ \mu\text{m}$.

L'étalonnage est réalisé pour des distances h à la lamelle comprise entre 10 et $50\ \mu\text{m}$, et sur toute la gamme de puissance (50 à $600\ \text{mW}$). La force de piégeage ne dépend pas de la hauteur lorsque h est inférieure à $50\ \mu\text{m}$; l'interface verre-eau a une influence négligeable dans cette gamme de distance h . La variation en fonction de la puissance est linéaire. Nous obtenons pour un piège :

$$F = A P r, \text{ pour } 10\ \mu\text{m} < h < 50\ \mu\text{m} \text{ et } r < 1\ \mu\text{m}$$

où A est égal à $0.26 \text{ pN.mW}^{-1}.\mu\text{m}^{-1}$, P est la puissance d'émission du laser (en mW), r est la distance du centre de la bille au centre du piège.

Corrélation entre la force maximale et la raideur du piège

Lors des mesures de la force maximale, il n'a pas été possible de mesurer la distance r maximale à laquelle la bille s'échappe. Cette distance est toutefois de l'ordre de grandeur de la taille du piège ($\sim 1 \mu\text{m}$) [Svoboda et Block, 1994]. Cette estimation permet de comparer les deux types d'étalonnages. L'ordre de grandeur de la force maximale est compatible avec la raideur correspondante. La comparaison n'est toutefois pas possible puisque le montage a été modifié entre les deux étalonnages, par l'ajout de la lentille 1 (*cf.* Figure 2.4). Cette lentille accroît la force de l'ordre de $\sim 30 \%$. L'étalonnage donnant la force maximale est utilisé pour les mesures d'élasticité de la membrane du globule rouge (*cf.* Chapitre 3). Le montage a ensuite été modifié et nous avons réalisé l'étalonnage de la raideur du piège. Nous avons alors entrepris les mesures sur le squelette (*cf.* Chapitres 4 et suivant).

3.4 Et pour les pinces multiples ?

Nous avons également mesuré la raideur d'un piège lorsque deux, trois ou quatre pinces optiques sont utilisées. Le principe de l'étalonnage est identique à celui décrit dans la section précédente. La force exercée par un piège est alors donnée par :

$$F = \alpha_n A P r \text{ pour } 10 \mu\text{m} < h < 50 \mu\text{m} \text{ et } r < 1 \mu\text{m}$$

où α_n est une constante qui dépend du nombre n de pièges présents. Par définition, $\alpha_1 = 1$, et nous avons mesuré : $\alpha_2 = 0.40$, $\alpha_3 = 0.25$ et $\alpha_4 = 0.18$. Ces mesures sont obtenues pour une fréquence de commutation f_c de 214 Hz. Nous n'avons pas noté d'influence de f_c sur le

coefficient A dans la gamme $150 \text{ Hz} < f_c < 300 \text{ Hz}$. L'influence de la fréquence de coupure f_c sur la raideur des pièges est discutée dans Visscher *et al.* [1996].

4. Détecteur de position par photodiode

Les expériences portant sur les mesures en dynamique ont nécessité de suivre le déplacement d'une bille piégée avec une résolution temporelle supérieure à 25 Hz. Un dispositif basé sur une photodiode à quadrants a été mis en place.

4.1 Principe

Le principe consiste à diriger le faisceau laser réfléchi par la bille sur une photodiode à quadrants (Hamamatsu, S 1557-03). Chacun des quatre quadrants convertit l'intensité lumineuse en un signal électrique. En notant V_i la tension du $i^{\text{ème}}$ quadrant, le déplacement de la bille suivant les axes x et y, noté respectivement Δx et Δy , est donné par :

$$\Delta x = Q[(V_2+V_4) - (V_1+V_3)] \text{ et } \Delta y = Q[(V_1+V_2)-(V_3+V_4)],$$

où Q est une constante de proportionnalité.

Un circuit électronique, construit d'après Simmons *et al.* [1996], réalise ces opérations, et donne en signal de sortie deux tensions, une proportionnelle au déplacement suivant x et l'autre proportionnelle au déplacement suivant y.

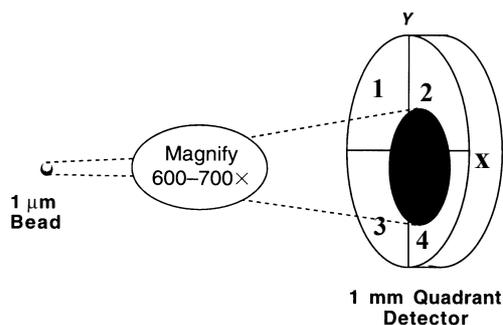


Figure 2.9: Principe de la détection de position par une photodiode à quadrants [Mehta *et al.*, 1998].

4.2 Schéma du dispositif

Le dispositif expérimental initial a été modifié (cf. Figure 2.10). La diode à quadrants se trouve sur la sortie appareil photo du microscope. Le miroir M3 envoie 50 % de l'intensité lumineuse sur cette sortie. Le faisceau laser infrarouge réfléchi par la bille est envoyé sur la photodiode. Pour cela, le miroir dichroïque M2 a été remplacé par un miroir dichroïque 50/50. Ce dernier laisse passer la lumière visible, mais l'infrarouge est réfléchi à 50 % et transmis à 50 %. La lentille 3 divergente ajuste la taille de l'image de la bille à la taille de la photodiode.

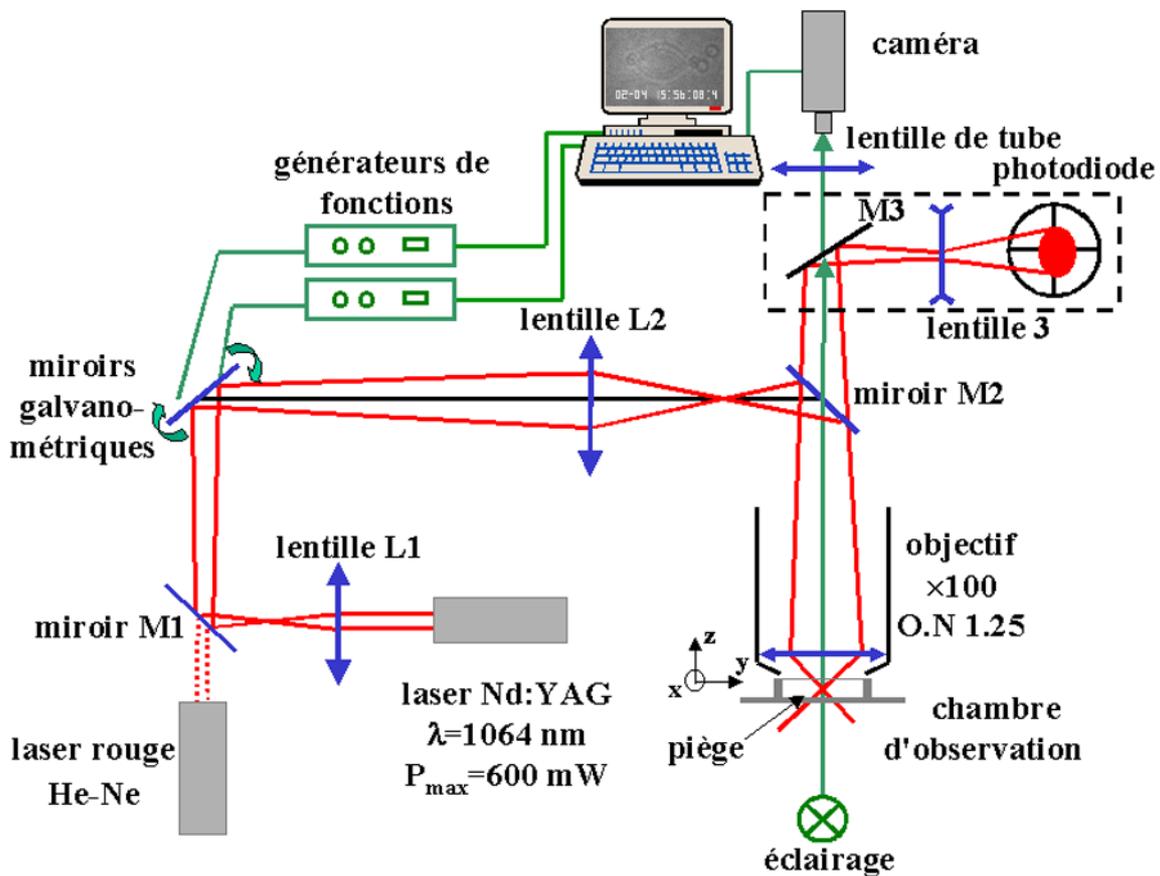


Figure 2.10 : Modification du dispositif expérimental. Le faisceau infrarouge réfléchi par la bille piégée est envoyé sur une photodiode à quadrants. Pour cela, le miroir M2 a été changé.

Le fait d'avoir changé le miroir dichroïque M2 signifie que l'intensité de piégeage est modifiée, il a donc fallu réaliser un nouvel étalonnage.

4.3 Étalonnage des forces avec le miroir 50/50

Un nouvel étalonnage a permis de déterminer la raideur des pièges. Nous avons trouvé $F = \alpha_n A' P r$, avec $A' = 0.11 \text{ pN.mW}^{-1}.\mu\text{m}^{-1}$. Les coefficients α_n ne sont pas modifiés. Cette relation est valable pour $10 \mu\text{m} < h < 50 \mu\text{m}$ et $r < 1 \mu\text{m}$.

4.4 Test de la photodiode avec une bille isolée

Nous avons réalisé cette expérience afin de vérifier le fonctionnement de la photodiode à quadrants et de valider le principe de mesures utilisé dans l'étude du squelette en dynamique.

Principe de la mesure

Trois pièges sont créés, et une bille de silice de $2.1 \mu\text{m}$ de diamètre est piégée dans un des pièges mobiles. La position des pièges dans la direction Ox (*cf.* Figure 2.10) est ensuite modulée par un signal sinusoïdal de faible amplitude ($A_0 \sim 0.5 \mu\text{m}$) et de fréquence variable par un générateur de fonction. Le faisceau laser réfléchi par la bille est envoyé sur la photodiode à quadrants, et le signal de la position de la bille est traité par une détection synchrone. Nous faisons varier la fréquence d'excitation de 0.5 à 50 Hz, et la détection synchrone mesure le déphasage du mouvement de la bille par rapport au signal d'excitation.

Équation du mouvement

Appelons x le centre de la bille en fonction du temps t . Celle-ci est soumise à deux forces : la force de rappel élastique de la pince optique et la force de frottement visqueux de Stokes. Le principe fondamental de la dynamique s'écrit, en négligeant l'inertie de la bille :

$$-k_{po} (x - A_0 \cos(\omega t)) - \zeta_s \frac{dx}{dt} = 0,$$

où k_{po} est la raideur de la pince optique, ω est la pulsation à laquelle se déplace le piège et $\zeta_s = 6\pi\eta a\beta$.

Nous cherchons la solution stationnaire de la forme : $x(t) = X_0 \cos(\omega t - \varphi)$ avec X_0 l'amplitude des déplacements et φ le déphasage. Le déphasage est donné par :

$$\varphi = \arctan\left[\frac{\zeta_s}{k_{po}} \omega\right] = \arctan\left[\frac{12 \pi^2 \eta a \beta}{k_{po}} \nu\right], \nu \text{ est la fréquence.}$$

Un paramètre m_2 est introduit afin de tenir compte d'un déphasage résiduel dans la chaîne de modulation et de détection. Le déphasage total est alors donné par :

$$\varphi_{\text{total}} = m_2 + \varphi.$$

Cette méthode permet la mesure de la raideur du piège et peut être considérée comme une autre méthode d'étalonnage.

Mesures expérimentales

Nous avons mesuré le coefficient A'' donnant la raideur du piège : $k_{po} = \alpha_3 A'' P$, α_3 vaut ici 0.25, P est la puissance émise en mW et A'' une constante. La figure 2.11 présente un résultat typique réalisé à $P = 330$ mW. Le logiciel KaleidaGraph utilise la méthode des moindres carrés pour déterminer le coefficient A'' , ainsi que le paramètre m_2 . La valeur de A'' trouvée est égale à $0.11 \text{ pN.mW}^{-1}.\mu\text{m}^{-1}$. Nous retrouvons une raideur égale à celle mesurée précédemment (*cf.* § 4.3 de ce chapitre). Ceci permet de plus de mesurer le terme de déphasage résiduel m_2 . Cette mesure valide également le protocole expérimental utilisé dans l'étude de la réponse dynamique du squelette.

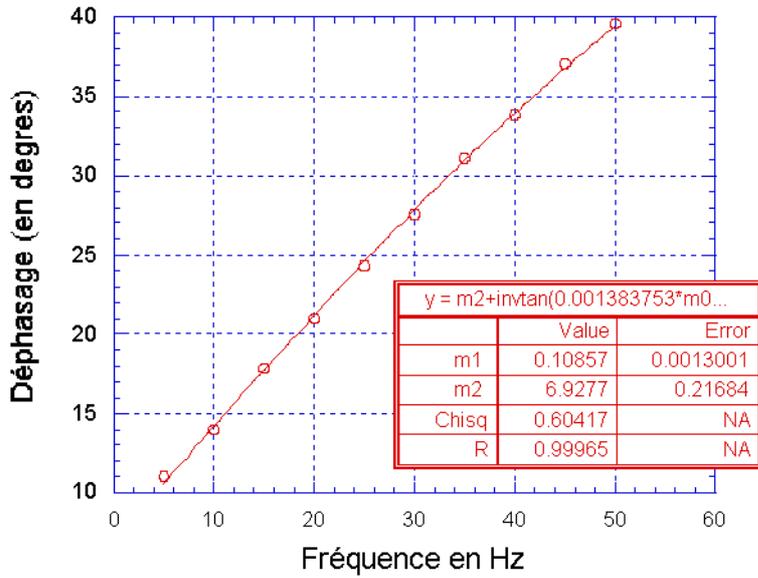


Figure 2.11 : Mesure du déphasage en degré en fonction de la fréquence du déplacement sinusoïdal du piège. Nous retrouvons une raideur du piège égale à celle mesurée précédemment (cf. § 4.3 de ce chapitre).

Conclusion

Nous avons décrit dans ce chapitre le principe des pinces optiques, et les méthodes utilisées pour mesurer l'intensité la force exercée par un piège sur une bille. La gamme de force mesurée s'étend de 1 à 150 pN pour une seule pince. Deux ou trois pinces sont créées simultanément en faisant commuter la position du faisceau entre deux ou trois points. Lorsque trois pinces sont utilisées, la force d'une pince varie de 1 à 35 pN. Nous avons également présenté le dispositif de la photodiode permettant le suivi de déplacement d'une bille dans un piège à des fréquences supérieures à 25 Hz.

Nous avons montré dans ce chapitre que les pinces optiques exercent des forces dans une gamme parfaitement bien adaptée à l'étude des cellules biologiques. Cette méthode, moyennant quelques précautions, est peu invasive. Les forces appliquées sont parfaitement déterminées après un étalonnage et sont reproductibles. L'incertitude sur la force est faible (de l'ordre de quelques pour-cent), et permet une étude quantitative précise.

Chapitre 3

Module de cisaillement de la membrane du globule rouge

Introduction

Nous présentons ici la première mesure du module de cisaillement μ de la membrane du globule rouge réalisée par pinces optiques. Deux billes de silice, collées à la membrane du globule rouge, sont utilisées comme poignées pour le déformer. La membrane est considérée comme un milieu élastique linéaire, homogène et isotrope. Pour des forces inférieures à 15 pN, la déformation est petite et la loi de Hooke s'applique. Nous mesurons simultanément la force appliquée et la déformation résultante, et nous en déduisons le module de cisaillement de la membrane. Nous avons réalisé des mesures sur des globules rouges discoïdes et sur des globules rouges sphériques. Le module de cisaillement μ mesuré est égal à $2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$. Cette valeur, quoique du même ordre de grandeur, est inférieure à celle mesurée par aspiration avec une micropipette.

La première partie de ce chapitre expose le protocole expérimental. La deuxième partie présente les modélisations du globule rouge discoïde et du globule rouge sphérique. Les résultats sont présentés et discutés dans la dernière partie. Le détail de certains calculs se trouvent en annexe de ce chapitre. Ce travail a fait l'objet d'une publication [Hénon *et al.*, 1999] présente à la fin de cette thèse.

1. Protocole expérimental

1.1 Préparation des échantillons de sang

Solutions tampons

Nous avons utilisé deux solutions tampons d'osmolarités différentes suivant la forme de globules rouges que nous voulons déformer.

Les globules rouges discoïdes sont manipulés dans une solution tampon isotonique (300 mOsm/kg). Il s'agit d'une solution dite PBS (phosphate-buffered saline, Sigma P 4417) : 8.1 mM de Na_2HPO_4 , 1.5 mM de KHPO_4 , 2.7 mM de KCl et 137 mM de NaCl. Le pH est fixé à 7.4.

Pour obtenir des globules rouges sphériques dont la membrane n'est pas tendue, nous avons utilisé une solution tampon hypotonique à 170 mOsm/kg : 10 mM de KHPO_4 et 75 mM de NaCl. Le pH est égal à 7.4.

Prélèvement de sang et adhérence des billes

Les prélèvements de sang sont réalisés sur des donneurs sains le matin même de la manipulation. Nous prélevons 40 μL de sang à l'aide d'un autopiqueur. Le sang est ensuite dilué dans 0.960 mL d'une solution tampon isotonique (PBS). Cette suspension est rincée trois fois par centrifugation, à $500\times g$.

Une suspension à 10 % en volume de billes de silice de 2.1 μm de diamètre (Bangs Lab.) est rincée 8 à 10 fois par centrifugation dans de l'eau pure (Millipore, 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$). 40 μL de cette suspension sont ajoutés à la suspension de globules rouges, ce qui correspond à environ deux billes par globule rouge. Une incubation d'une heure minimum à 4°C permet

l'adhérence des billes à la membrane de manière spontanée, irréversible et non spécifique. La suspension est ensuite diluée à 50000 globules par μL et 50 μL d'une solution d'albumine bovine (1 mg/mL ; Sigma A 4503) sont ajoutés afin de limiter l'adhérence des globules rouges et des billes sur la lame de la chambre d'observation.

Les mesures se font à température ambiante (25°C).

Chambre d'observation et silanisation

La chambre d'observation est composée d'une lame et d'une lamelle séparées par un film plastique. La profondeur totale de la chambre est de l'ordre de la centaine de microns et le volume totale d'environ 25 μL . La chambre, une fois remplie, est scellée par de la graisse à vide et est disposée sous l'objectif du microscope.

Afin d'éviter que les globules rouges et les billes n'adhèrent au verre, la lame et la lamelle de la chambre d'observation sont traitées. Dans un premier temps, nous faisons adsorber à la surface du verre des protéines d'albumine bovine. De meilleurs résultats sont obtenus par silanisation de la surface. La silanisation consiste à greffer par liaison covalente des chaînes carbonées à la surface du verre. Nous utilisons ici des chaînes courtes $\{(\text{CH}_3)_2\}$. L'encombrement stérique des chaînes carbonées évite le contact membrane/verre. Le mode opératoire de la silanisation est exposé en annexe de ce chapitre.

1.2 Déroulement d'une mesure

La suspension finale de globules rouges est injectée dans la chambre d'observation, et celle-ci est placée sous l'objectif de microscope. Un globule rouge avec deux billes de part et d'autre d'un diamètre est sélectionné (*cf.* Figure 3.1). Chacune des billes est piégée dans une pince optique. À puissance P du laser donnée, le globule rouge est déformé en augmentant la

distance entre les deux pièges pas à pas, chaque pas correspondant à un déplacement des pièges d'environ $0.1 \mu\text{m}$. Lorsque la silanisation n'est pas parfaite, il arrive qu'une des billes adhère à la lame. Dans ce cas, nous ne piégeons que la bille libre et le globule rouge est déformé en déplaçant le piège. Le diamètre dans la direction perpendiculaire aux forces diminue lorsque la force augmente. À chaque pas, une image est enregistrée. La dernière image avant que le globule rouge ne se dépiège correspond à la déformation à force maximale. Sur cette image, la force appliquée par les billes est connue et nous mesurons la variation de diamètre ΔD . Nous réalisons cette mesure plusieurs fois sur le même globule en faisant varier la puissance du laser.

Le globule rouge repose toujours sur la lame afin de pouvoir mesurer le diamètre. La variation du diamètre ΔD est mesurée à l'aide du logiciel d'analyse d'image NIH Image, avec une précision de ± 1 pixels, soit $\pm 50 \text{ nm}$.

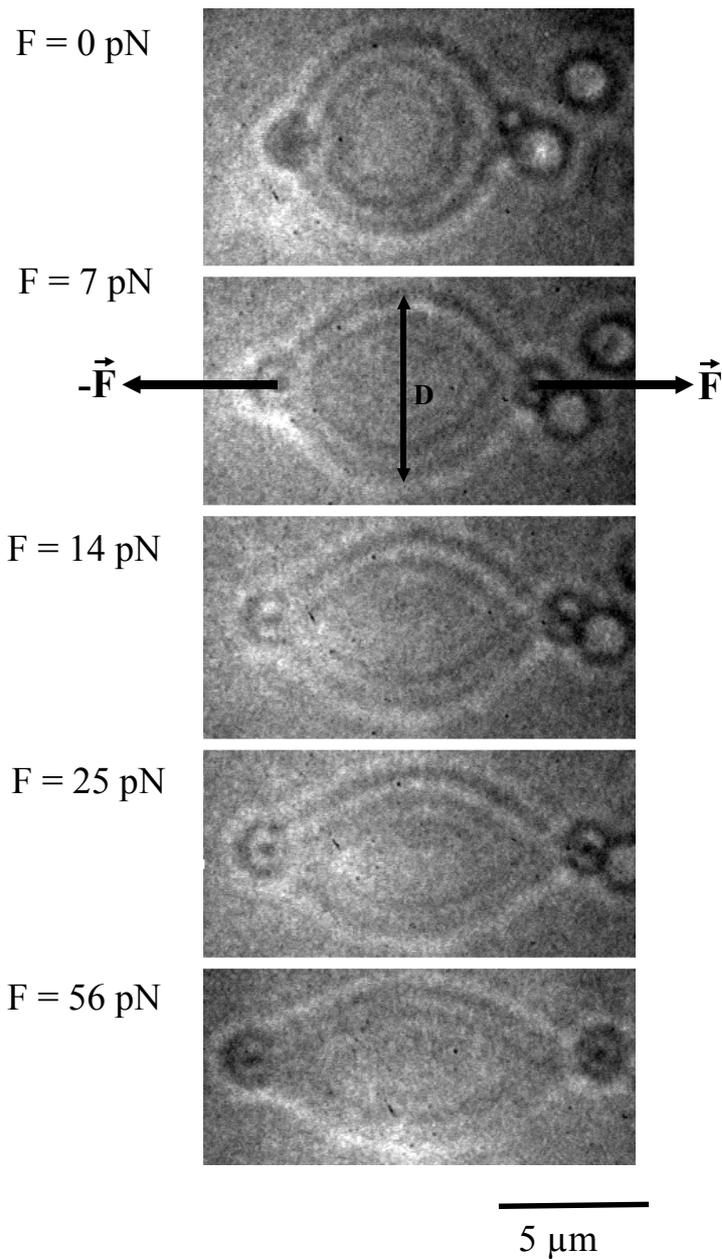


Figure 3.1 : Un globule avec deux billes en position diamétralement opposée est déformé en augmentant la distance entre les pièges. Chacune de ces images correspond à la force maximale (avant dépiégeage). La variation de diamètre ΔD est mesurée en fonction de la force F .

2. Modélisation de la membrane

La forme d'un globule rouge est complexe et il a fallu la modéliser afin de pouvoir extraire le module de cisaillement. Le globule rouge discoïde est modélisé par deux disques plans parallèles, chacun soumis à deux forces d'intensité $F/2$. La contrainte est supposée nulle

sur les bords des disques. Cette hypothèse, invérifiable, est sûrement très approximative. Ceci nous a amené, dans un deuxième temps, à déformer des globules rouges rendus sphériques en abaissant l'osmolarité du milieu environnant (*cf.* Figure 1.2). Ces derniers sont représentés par une sphère. Dans cette géométrie particulière, le calcul peut être entièrement réalisé sans hypothèse particulière.

2.1 Élasticité linéaire bidimensionnelle en petites déformations

La représentation élastique de la membrane est exposée au chapitre 1, partie 3. Rappelons que la membrane est considérée comme un milieu élastique bidimensionnel plan. Ce milieu est supposé isotrope, homogène et linéaire. Sous ces hypothèses, les propriétés mécaniques sont décrites par deux modules élastiques : le module de cisaillement μ et le module d'extension K . Pour de petites déformations, une relation linéaire entre le tenseur des déformations $[\mathbf{e}]$ et le tenseur des contraintes $[\boldsymbol{\sigma}]$ est donnée par la loi de Hooke (*cf.* Chapitre 1, § 3.2).

Les expériences d'aspiration par micropipette ont permis de déterminer les modules K et μ (*cf.* Chapitre 1, § 4). Le module d'extension K est de l'ordre de 300 à 500 mN/m, et le module de cisaillement de l'ordre de 4 à 10 μ N/m. Il existe un facteur 10^5 entre les modules K et μ . Ceci signifie que les déformations d'extension sont négligeables devant les déformations de cisaillement. Avec les pinces optiques, la membrane ne subit que des déformations de cisaillement pur. La loi de Hooke s'écrit alors :

$$\begin{cases} e_{xx} = \frac{1}{4\mu} (\sigma_{xx} - \sigma_{yy}) \\ e_{yy} = \frac{1}{4\mu} (-\sigma_{xx} + \sigma_{yy}) \\ e_{xy} = \frac{1}{2\mu} \sigma_{xy} \end{cases}$$

2.2 Globules rouges discoïdes

Le globule rouge discoïde est modélisé par la superposition de deux disques parallèles plans (cf. Figure 3.2). Chacun de ces disques est soumis à deux forces diamétralement opposées d'intensité égale à la moitié de l'intensité de la force totale. La contrainte est calculable en tout point du disque [Landau et Lifshitz, 1959] en faisant l'hypothèse que la contrainte est nulle sur ses bords. Il est alors possible de relier la variation du diamètre ΔD (cf. Figure 3.2) à l'intensité de la force F appliquée et au module de cisaillement de la membrane μ . Le détail de ce calcul se trouve en annexe de ce chapitre. Nous avons trouvé :

$$\Delta D = \frac{F}{2\pi\mu}.$$

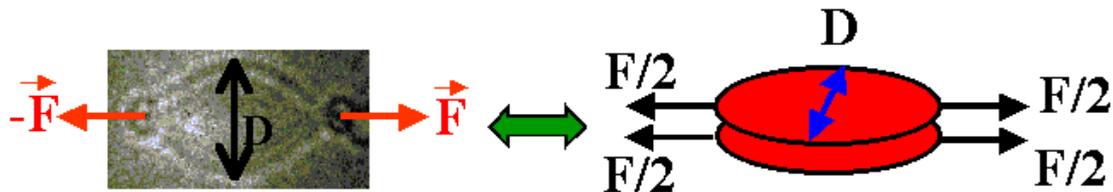


Figure 3.2 : Le globule rouge discoïde est modélisé par la superposition de deux disques plans parallèles.

2.3 Globules rouges sphériques

Le globule rouge est modélisé par une sphère, déformée par deux forces diamétralement opposées. La contrainte est calculée sans aucune hypothèse particulière.

Nous avons pris soin de travailler avec des globules quasi-sphériques dont la membrane n'est pas sous tension. La variation de diamètre s'écrit alors simplement – le détail du calcul se trouve en annexe de ce chapitre. Nous retrouvons la même relation que dans le cas d'un globule rouge discoïde :

$$\Delta D = \frac{F}{2 \pi \mu} .$$

3. Résultats et discussion

3.1 Temps de relaxation

Nous avons réalisé une dizaine de mesures de temps de relaxation afin de vérifier que le protocole opératoire ainsi que l'utilisation des pinces optiques ne modifiaient pas les propriétés élastiques de la membrane.

Un globule rouge est étiré puis relâché. Le retour à l'équilibre est enregistré, et la distance entre les deux billes L est mesurée en fonction du temps t . La distance L est supposée suivre une loi exponentielle : $\exp[-t/\tau]$, avec τ le temps caractéristique de relaxation. La valeur moyenne de τ sur l'ensemble des 7 mesures, est $\tau = 216 \pm 88$ ms. La figure 3.3 présente un résultat type. Notons de plus que le globule rouge reprend sa forme initiale.

Plusieurs mesures de temps de relaxation sont reportées dans la littérature : Bronkhorst *et al.* [1995], Linderkamp *et al.* [1982], Sutura *et al.* [1985]. Le temps de relaxation τ est de l'ordre de 100 ms pour les cellules jeunes, et de 300 ms pour les cellules âgées.

Le fait que nos résultats soient en accord avec ceux existants dans la littérature montre que le protocole opératoire – adhérence des billes et utilisation des pinces optiques – ne doit pas modifier de manière notable les propriétés élastiques de la membrane.

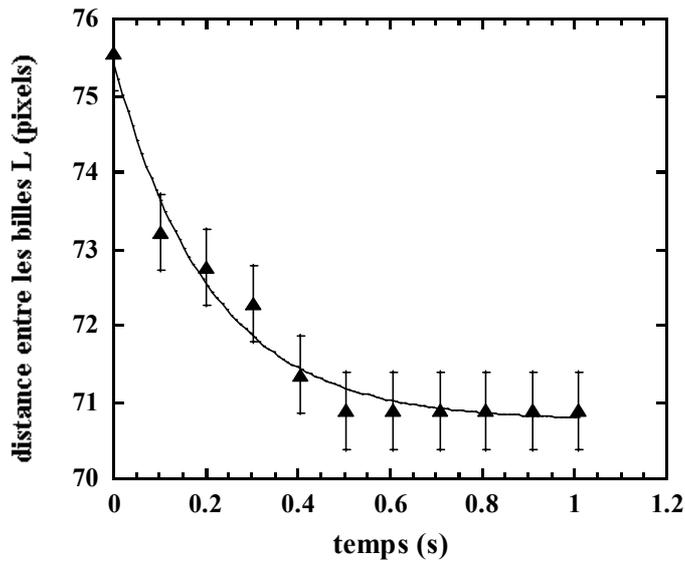


Figure 3.3 : Relaxation vers la forme d'équilibre d'un globule rouge étiré. Le temps caractéristique de relaxation τ , vaut ici $\tau = 206$ ms.

3.2 Mesure sur globules rouges discoïdes et sphériques

Mesure sur un globule rouge

La figure 3.4 représente la variation du diamètre ΔD en fonction de la force appliquée mesurée sur un globule rouge discoïde (symboles ronds) et sur un globule rouge sphérique (symboles carrés). Dans les deux cas, une relation linéaire est observée tant que la force est inférieure à 15 pN. Ceci correspond au régime des petites déformations, et nous déduisons de la pente le module de cisaillement de la membrane. Dans les exemples présentés, le module de cisaillement est égal à $2.05 \pm 0.3 \mu\text{N/m}$ pour le globule rouge discoïde et à $1.9 \pm 0.3 \mu\text{N/m}$ pour le globule rouge sphérique.

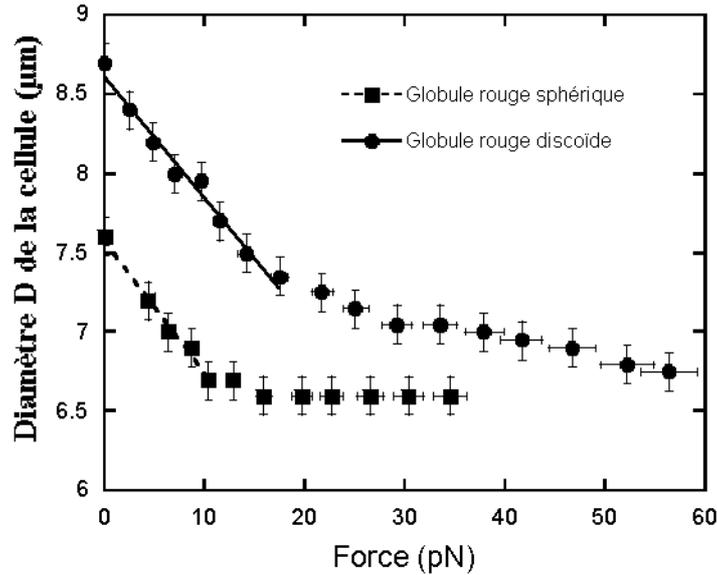


Figure 3.4 : Variation du diamètre d'un globule rouge discoïde et d'un globule rouge sphérique en fonction de l'intensité de la force.

Pour les forces supérieures à 15 pN, nous constatons un écart à la linéarité. Dans le cas des globules discoïdes, cette écart est expliqué par le changement de régime, c'est à dire le passage en grandes déformations, et la loi de Hooke ne s'applique plus. Le phénomène est différent pour les globules sphériques : au-delà de 15 pN, le diamètre est constant. Ceci est dû au fait que la cellule, quasi-sphérique, ne peut plus se déformer sans augmenter l'aire de sa membrane. La membrane se met sous tension et les forces appliquées ne sont pas suffisamment grandes pour l'étendre.

Ensemble des résultats

La figure 3.5 représente un histogramme des mesures obtenues sur 30 globules rouges discoïdes et sur 6 sphériques. Le module de cisaillement varie de 1.4 à 3.7 $\mu\text{N}/\text{m}$ pour les cellules discoïdes et de 1.7 à 3.3 $\mu\text{N}/\text{m}$ pour les cellules sphériques. Cette dispersion s'explique par la dispersion naturelle. Au cours de ses 120 jours de vie, des protéines s'adsorbent à la surface du globule rouge, ce qui induit une perte d'élasticité. De plus, le

nombre de défauts du squelette augmente avec l'âge du globule [Danon et Marikovsky, 1988]. Lorsque le globule rouge est devenu trop rigide, il ne peut plus traverser la rate, y reste bloqué et est détruit.

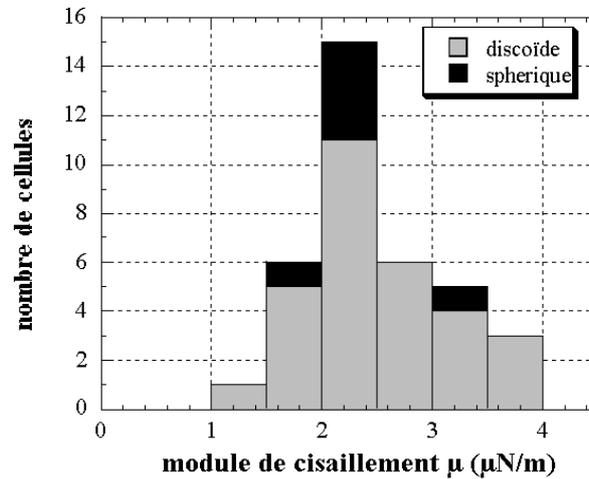


Figure 3.5 : Histogramme des mesures du module de cisaillement sur 30 globules rouges discoïdes et 6 sphériques. La valeur moyenne du module de cisaillement pour les cellules discoïdes est $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$.

La valeur moyenne du module de cisaillement pour les cellules discoïdes est $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$ et $\mu = 2.35 \pm 0.5 \mu\text{N/m}$ pour les cellules sphériques. Étant donné les incertitudes et le faible nombre de mesures dans le cas des globules rouges sphériques, la différence entre ces deux résultats n'est pas significative.

Le module de cisaillement de la membrane du globule rouge en milieu isotonique est de $2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle mesurée par aspiration dans une micropipette ($4 < \mu < 10 \mu\text{N/m}$), mais elle est inférieure. La différence est trop importante pour être attribuée à des incertitudes expérimentales.

3.3 Pourquoi μ est-il plus faible que celui mesuré par micropipette ?

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette différence.

Différence de régime élastique

La première de ces hypothèses tient à un régime élastique différent. Avec les pinces optiques, la déformation du globule peut être localement importante, surtout dans la région où les billes adhèrent à la membrane. Mais la mesure de la déformation est toujours effectuée dans la région équatoriale, où la déformation reste petite et où la loi de Hooke s'applique. Les mesures par micropipette se font au contraire en grandes déformations, et nécessitent par conséquent une modélisation plus complexe que la loi de Hooke. Le modèle nécessite de choisir la forme de l'énergie de déformation en régime hyper-élastique (*cf.* Chapitre 1, § 4.2), et la valeur de μ dépend de la forme choisie.

D'autre part, des simulations numériques réalisées par Boal [1992] montrent que le squelette peut avoir une réponse élastique non linéaire. Les modules élastiques du squelette peuvent augmenter d'un facteur dix entre le régime des petites déformations et celui des grandes déformations. Le fait que notre valeur de μ soit plus petite est donc en accord avec le résultat présenté par Boal.

Modification de la membrane pendant l'aspiration dans la micropipette

Discher et Mohandas [1994] ont montré que le squelette glisse le long de la membrane lors de son aspiration dans la pipette. La densité du squelette varie dans la portion de membrane aspirée (*cf.* Chapitre 1, § 5.3) : importante à l'entrée de la pipette, la densité de squelette est faible au niveau de la calotte. Ceci signifie que la structure de la membrane est modifiée pendant l'aspiration – ce qui rend toute comparaison avec notre mesure.

Il n'est pas possible d'évaluer simplement l'influence du glissement sur la mesure de μ et il n'existe pas, à notre connaissance, de modèle prenant en compte cet effet. Comme nous l'avons vu au chapitre 1, § 4.2, le module de cisaillement μ mesuré par micropipette est donné par :

$$\mu \approx \frac{R_p^2 \Delta P}{2 D_p},$$

avec R_p le rayon de la pipette, D_p la longueur totale aspirée, et ΔP la pression d'aspiration. Le glissement du squelette peut avoir plusieurs effets. Le premier est que la longueur D_p d'aspiration de la membrane mesurée est plus importante que la longueur de la portion de squelette effectivement aspirée. Un autre effet possible est un changement dans la forme de la calotte. Cette formule n'est valable que lorsque la calotte est sphérique. Le terme R_p provient de cette hypothèse et doit être modifié lors du glissement de la membrane ; mais il semble difficile de prévoir dans quel sens a lieu cette modification.

Chaque technique peut sélectionner une catégorie de cellules différente

La dernière hypothèse expliquant la différence entre les modules de cisaillement provient des techniques elles-mêmes. Chaque technique peut sélectionner, du moins en moyenne, une catégorie de globules rouges différente.

Les pinces optiques nécessitent l'adhérence de deux billes de verre sur la membrane. Ces billes vont adhérer spontanément. Cette technique sélectionne ainsi une catégorie de globules rouges qui ont une grande affinité avec le verre. Les expériences d'aspiration dans une micropipette – en verre – ne marchent pas si la membrane adhère à la pipette. La mesure se fait donc sur des globules rouges qui n'adhèrent pas au verre. L'affinité au verre peut dépendre de l'état de surface de la membrane, qui est relié à la densité de protéines adsorbées

sur la membrane. Or, la densité de protéines croît avec l'âge du globule [Alderman *et al.*, 1981] et les propriétés élastiques dépendent de l'âge. Il est donc possible avec les pinces optiques que nous sélectionnons, du moins en moyenne, des globules rouges jeunes ayant une forte affinité pour le verre, et avec un module de cisaillement plus faible.

Conclusion

Nous avons présenté ici la première mesure par pinces optiques du module de cisaillement μ de la membrane du globule rouge. La valeur trouvée, $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$, est du même ordre de grandeur que celle mesurée par micropipette, mais inférieure. Nous avons expliqué cette différence par trois hypothèses : i) les deux techniques n'opèrent pas dans le même régime élastique, ii) la structure de la membrane est modifiée lors de l'aspiration dans la pipette, à cause du glissement du squelette, et iii) chaque technique peut sélectionner une population de globules rouges différente, suivant leur affinité au verre.

Le problème est maintenant de comprendre dans quelle mesure le module de cisaillement de la membrane peut être relié aux modules élastiques du squelette. Les mesures présentées dans les deux chapitres suivants apportent une réponse à cette question.

Annexes du chapitre 3

Annexe 1 : Silanisation des lames et des lamelles

La silanisation consiste à greffer des chaînes carbonées à la surface du verre, afin d'éviter le contact direct du verre et de la membrane des cellules. Les silanes utilisés ont des chaînes carbonées courtes ($\text{SiCl}_2(\text{CH}_3)_2$).

La première étape consiste en un nettoyage soigneux des lames et des lamelles. D'abord, un pré-nettoyage est réalisé au détergent Decon 90 pendant 20 min à 60°C dans une cuve à ultrasons. Elles sont ensuite lavées par un mélange « Piranha », composé d'un tiers d'eau oxygénée à 30 % en masse et de deux tiers d'acide sulfurique concentré, pendant 10 min. Cette solution est très oxydante et elle dégrade toutes matières organiques.

Les lames et les lamelles sont séchées à l'étuve à 90°C pendant 30 min. Le séchage est suivi d'un retour à température ambiante afin qu'un fin film d'eau se dépose. L'eau est en effet nécessaire à la réaction de silanisation.

Les lames et les lamelles sont ensuite trempées dans une solution de $\text{SiCl}_2(\text{CH}_3)_2$ diluée à 5 % dans du chloroforme pendant une dizaine de minutes ; puis rincées trois fois dans du chloroforme.

Annexe 2 : Déformation d'un globule rouge discoïde

Nous présentons ici le détail des calculs donnant la variation du diamètre d'un disque plan déformé par deux forces diamétralement opposées d'intensité $F/2$.

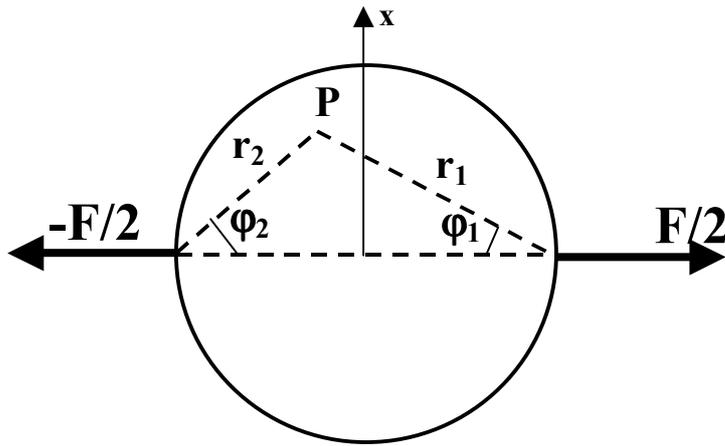


Figure 3.6 : Disque plan déformé par deux forces diamétralement opposées. Nous étudions la variation du diamètre du disque suivant l'axe x.

Le problème consiste à exprimer la contrainte $[\sigma]$ en tout point du disque, puis d'en déduire la déformation $[e]$ en utilisant la loi de Hooke (dans la limite où K est infini) :

$$\begin{cases} e_{xx} = \frac{1}{4\mu} (\sigma_{xx} - \sigma_{yy}) \\ e_{yy} = \frac{1}{4\mu} (-\sigma_{xx} + \sigma_{yy}) \\ e_{xy} = \frac{1}{2\mu} \sigma_{xy} \end{cases}$$

Expression de la contrainte

L'expression de la contrainte en tout point du plan est donnée par Landau et Lifshitz [1959]. Elle est obtenue par la superposition de trois distributions de contraintes. Les deux premières distributions sont les contraintes qui seraient produites par une force $F/2$ appliquée à un point de la frontière d'un demi-plan. Elles ont pour expression (cf. Figure 3.6 pour la définition des paramètres) :

$$\begin{aligned} \sigma_{r_1 r_1} &= \frac{F \cos \varphi_1}{\pi r_1} & \text{et} & \quad \sigma_{r_1 \varphi_1} = \sigma_{r_2 \varphi_2} = 0 \\ \sigma_{r_2 r_2} &= \frac{F \cos \varphi_2}{\pi r_2} & \text{et} & \quad \sigma_{r_2 \varphi_2} = \sigma_{r_2 \varphi_2} = 0. \end{aligned}$$

La troisième distribution représente une traction uniforme. Elle impose à la contrainte totale d'être nulle au bord du disque. Elle est donnée par :

$$\sigma_{ik} = -\frac{F}{2\pi R} \delta_{ik}.$$

Il faut ensuite écrire les trois distributions en coordonnées cartésiennes :

$$\left\{ \begin{array}{l} \sigma_{xx} = \frac{F \cos \varphi_1 \sin^2 \varphi_1}{\pi r_1} \\ \sigma_{yy} = \frac{F \cos^3 \varphi_1}{\pi r_1} \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \sigma_{xx} = \frac{F \cos \varphi_2 \sin^2 \varphi_2}{\pi r_2} \\ \sigma_{yy} = \frac{F \cos^3 \varphi_2}{\pi r_2} \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} \sigma_{xx} = -\frac{F}{2\pi R} \\ \sigma_{yy} = -\frac{F}{2\pi R} \end{array} \right.$$

L'expression de la loi de Hooke devient :

$$\left\{ \begin{array}{l} e_{xx} = -\frac{F}{\mu \pi} \left(\frac{\cos \varphi_1 \cos (2 \varphi_1)}{r_1} + \frac{\cos \varphi_2 \cos (2 \varphi_2)}{r_2} \right) \\ e_{yy} = +\frac{F}{\mu \pi} \left(\frac{\cos \varphi_1 \cos (2 \varphi_1)}{r_1} + \frac{\cos \varphi_2 \cos (2 \varphi_2)}{r_2} \right) \\ e_{xy} = 0 \end{array} \right.$$

L'expression de e_{xx} permet de calculer la variation du diamètre $\Delta D = D_0 - D$ du disque, où D_0 est le diamètre au repos et D le diamètre dans la direction x lorsque le disque est soumis à la force $F/2$. Nous avons en tout point du diamètre D :

$$\varphi_1 = \varphi_2 = \varphi \text{ et } r_1 = r_2 = r = \frac{D_0}{2 \cos \varphi}.$$

D'autre part, $e_{xx} = \frac{du_x}{dx}$ et $du_x = \frac{F}{2\pi\mu} \cos(2\varphi) d\varphi$ avec $x = \frac{D_0}{2} \sin \varphi$.

Finalement :

$$\Delta D = \frac{F}{2 \pi \mu}$$

où ΔD est la variation du diamètre perpendiculaire à la direction d'application de la force F et μ le module de cisaillement de la membrane.

Annexe 3 : Déformation d'un globule rouge sphérique

Le globule rouge sphérique est modélisé par une coque bidimensionnelle sphérique.

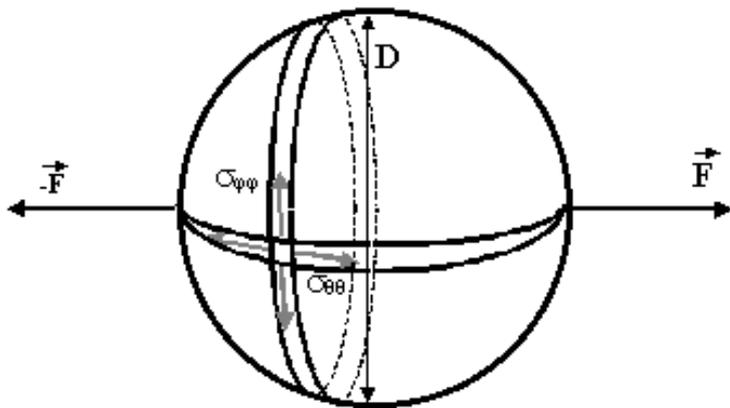


Figure 3.7 : Le globule rouge sphérique déformé par deux forces diamétralement opposées.

Expression de la contrainte

Le système est à symétrie de révolution autour de l'axe z , direction d'application des forces. Les deux seules composantes non nulles du champ de contrainte sont donc $\sigma_{\theta\theta}$ et $\sigma_{\varphi\varphi}$, avec θ la colatitude et φ l'azimut.

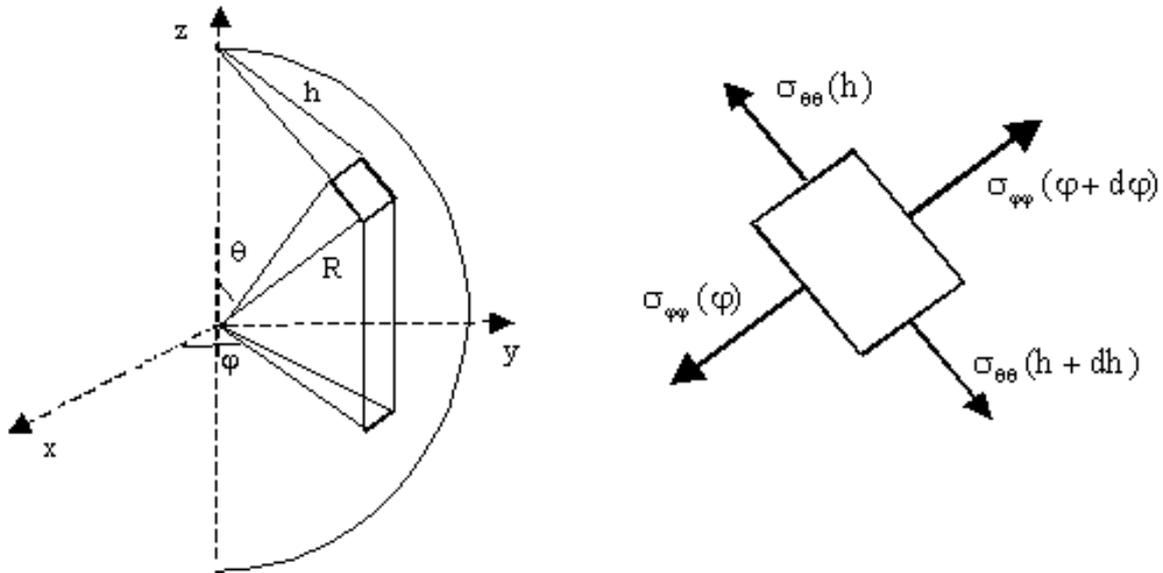


Figure 3.8 : L'équilibre d'un élément de surface permet d'exprimer la contrainte $\sigma_{\phi\phi}$.

La contrainte $\sigma_{\theta\theta}$ est constante suivant le long d'une bande mince parallèle à l'équateur de longueur $2\pi R \sin\theta$. La contrainte projetée suivant l'axe z est $\sigma_{\theta\theta} \sin\theta$. L'équilibre de la sphère donne $F = 2\pi R \sin\theta \times \sigma_{\theta\theta} \sin\theta$, d'où :

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{F}{2\pi R \sin^2\theta}.$$

La contrainte $\sigma_{\phi\phi}$ s'obtient en écrivant l'équilibre d'un élément de surface élémentaire en coordonnées polaires (cf. Figure 3.8). Le bilan des forces suivant l'axe R donne :

$$\sigma_{\theta\theta}(h + dh) \times (h + dh) d\phi - \sigma_{\theta\theta}(h) d\phi - 2\sigma_{\phi\phi} \frac{d\phi}{2} dh = 0.$$

Nous en déduisons : $\sigma_{\phi\phi} = \sigma_{\theta\theta} + h \frac{\partial\sigma_{\theta\theta}}{\partial h}$ avec $h = R \tan\theta$.

En remplaçant h et $\sigma_{\theta\theta}$, il vient : $\sigma_{\theta\theta} = -\sigma_{\phi\phi}$.

Utilisation de la loi de Hooke

La loi de Hooke exprimée en coordonnées sphériques est :

$$\begin{cases} e_{\theta\theta} = \frac{1}{4\mu} (\sigma_{\theta\theta} - \sigma_{\varphi\varphi}) \\ e_{\varphi\varphi} = \frac{1}{4\mu} (-\sigma_{\theta\theta} + \sigma_{\varphi\varphi}) \end{cases} .$$

Les termes non nuls du tenseurs des déformations sont : $e_{\varphi\varphi} = -e_{\theta\theta} = \frac{F}{4\pi\mu R \sin^2 \theta}$. La

variation du périmètre P et du diamètre D à l'équateur ($\theta = \pi/2$) est donné par

$$e_{\varphi\varphi} = \frac{\Delta P}{P} = \frac{\Delta D}{D} = \frac{F}{4\pi\mu R} \text{ d'où :}$$

$$\boxed{\Delta D = \frac{F}{2\pi\mu}}$$

Nous obtenons la même relation que dans le cas du le globule rouge discoïde.

Chapitre 4

Modules élastiques du squelette du globule rouge à 25 mOsm/kg

Introduction

Nous présentons dans ce chapitre la mesure des modules élastiques du squelette du globule rouge humain, après dissolution de la bicouche lipidique. Notre objectif est de définir les rôles respectifs de la bicouche lipidique et du squelette. Nous avons, dans le chapitre précédent, mesuré le module de cisaillement de la membrane intacte du globule rouge. L'hypothèse, généralement admise, est d'imputer la résistance au cisaillement de la membrane à son squelette (*cf.* Chapitre 1, § 4.1). Nous proposons ici une expérience permettant de vérifier cette hypothèse sans ambiguïté.

D'après les études présentées dans le chapitre 1 (*cf.* § 4, 5 et 6), les modules d'extension et de cisaillement du squelette doivent être du même ordre de grandeur que le module de cisaillement de la membrane. La topologie du squelette implique que son module d'extension soit de l'ordre du double du module de cisaillement du squelette. À partir de ces modules élastiques macroscopiques, nous pouvons déduire la longueur de persistance de la spectrine.

La mesure des modules élastiques du squelette nécessite trois pinces optiques. Un globule rouge avec trois billes est piégé. La bicouche lipidique est dissoute par injection d'une solution de détergent et la force ionique du milieu environnant est fixée par une injection

d'une solution tampon hypotonique à 25 mOsm/kg. Nous nous sommes appuyés sur l'étude de Svoboda *et al.* [1992] (*cf.* Chapitre 1, § 5.2) pour le protocole de dissolution ainsi que pour le choix de la force ionique. Le squelette est déformé en déplaçant les pièges les uns par rapport aux autres. Les modules d'extension K_C et de cisaillement μ_C sont déduits de la mesure des déformations en fonction des forces appliquées. Nous avons mesuré à 25 mOsm/kg, un module d'extension $K_C = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$ et un module de cisaillement $\mu_C = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$. Le rapport K_C/μ_C mesuré sur un même squelette et pour un même cycle de déformations donne $K_C/\mu_C = 1.9 \pm 1.0 \mu\text{N/m}$. Nous avons déduit de ces mesures la longueur de persistance ξ d'un filament de spectrine *in situ* : $\xi \sim 5 \text{ nm}$. Ces résultats sont en bon accord avec ceux attendus.

La première partie de ce chapitre présente en détail le protocole expérimental. La deuxième partie porte sur la modélisation du squelette qui relie la déformation et la contrainte aux modules élastiques. Deux expériences de contrôle ainsi que les résultats sont présentés et discutés dans la dernière partie. Les calculs du modèle mécanique ainsi que certains modes opératoires se trouvent en annexe de ce chapitre.

1. Protocole expérimental

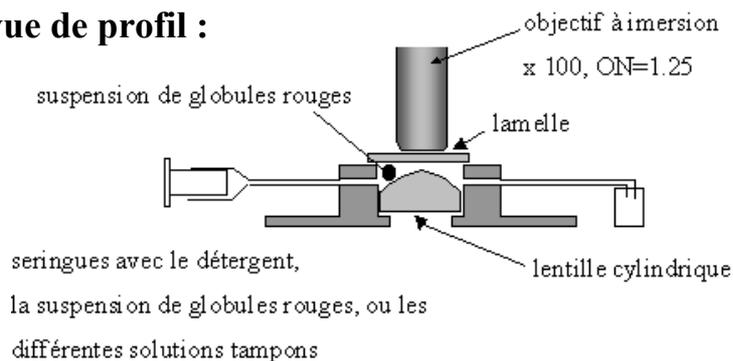
1.1 Chambre à écoulement

Ces expériences nécessitent de pouvoir piéger un globule rouge et injecter des solutions simultanément. Ceci est rendu possible grâce à une chambre à écoulement usinée au L.B.H.P, dont la hauteur utile est de l'ordre de 50 μm , ce qui permet le piégeage des globules rouges.

Schéma et fonctionnement

La chambre à écoulement, qui prend place sous l'objectif du microscope, est composée d'un corps en acier inoxydable dans lequel est collée une lentille cylindrique (*cf.* Figure 4.1). Cette lentille n'a pas d'influence sur le trajet de la lumière, elle permet d'obtenir une zone où la distance entre le haut de cette lentille et la lamelle est comprise entre 50 et 80 μm . Le collage, réversible, est réalisé avec une colle basse température (température de fusion $\sim 45^\circ\text{C}$). L'ensemble est fermé par une lamelle de microscope collée (colle époxyde Araldite) sur un film plastique de 25 μm d'épaisseur. Le volume total de la chambre est de 0.7 mL. Six trous percés de part et d'autre de la chambre permettent l'injection de solutions à l'aide de cathéters en polyéthylène (Biotrol Diagnostic) de 1.27 mm de diamètre. Afin d'avoir une injection au plus près de la zone de piégeage, nous avons collé à leur extrémité des cathéters plus fins, de 300 μm de diamètre (*cf.* Figure 4.1). La distance entre l'extrémité du cathéter de 300 μm et la zone de piégeage est de l'ordre du millimètre. La sonde d'un thermocouple cuivre-constantan est introduite par une des ouvertures et mesure la température moyenne dans la chambre. Les injections pendant le piégeage sont réalisées à l'aide de pousse-seringues.

vue de profil :



vue de dessus :

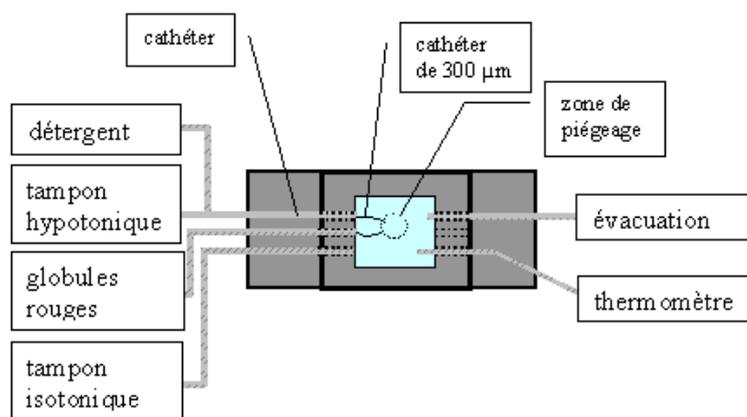


Figure 4.1 : Schémas de la chambre d'écoulement placée sous l'objectif du microscope.

Silanisation de la lentille cylindrique

La lentille cylindrique est silanisée avec des octadécyl-trichlorosilanes afin d'éviter l'adhésion des globules rouges sur le verre. Le protocole de la silanisation est exposé en annexe de ce chapitre (*cf.* Annexe F). Pour la même raison, 2 mL d'une solution de sérum d'albumine bovine à 50 mg/mL sont injectés dans la chambre à écoulement avant toutes les manipulations.

1.2 Extraction du squelette

Le sang est prélevé sur un donneur sain le jour de la mesure par une piqûre au bout du doigt. 40 µL de sang ainsi prélevé sont mis en suspension dans une solution tampon isotonique (PBS) et les globules rouges sont rincés trois fois par centrifugation, à 500×g. Des billes de silice de 2.1 µm de diamètre sont ensuite ajoutées à la suspension dans la proportion

moyenne d'une bille par globule. Une incubation d'une heure minimum à 4°C permet l'adhésion des billes à la membrane des globules rouges. Le nombre de billes par globule varie de zéro à 5 billes. La suspension est diluée jusqu'à environ 20 000 globules par mL et 1 mg/mL de sérum d'albumine bovine est ajouté. Cette suspension est ensuite injectée lentement dans la chambre à écoulement.

Nous sélectionnons un globule rouge avec trois billes collées à sa périphérie et nous piégeons chacune des billes dans une pince optique. L'ensemble est alors amené à quelques micromètres de la lamelle. Le piégeage se fait généralement sur un fantôme (globule rouge qui a perdu son hémoglobine) : sur un globule, l'hémoglobine est attirée par les pièges, ce qui rend le piégeage plus délicat. Aucun traitement particulier n'est réalisé pour obtenir des fantômes et nous pensons que la lésion de la membrane est due aux contraintes de cisaillement exercées par les billes sur la membrane lors de l'injection.

La solution tampon hypotonique à 25 mOsm/kg est composée de 5 mM de NaCl et de 5 mM de K_2HPO_4 pour un pH de 7.4. La force ionique correspondante est d'environ 20 mM. Une mesure débute par l'injection de ce tampon pendant 5 min à un débit de 2.54 mL/h afin d'abaisser l'osmolarité du milieu environnant le globule. Nous injectons ensuite une solution de détergent Triton X-100 à 1-3 ‰ en volume dilué dans la solution tampon hypotonique jusqu'à dissolution de la bicouche. La dissolution de la bicouche a lieu généralement dans les deux minutes qui suivent le début de l'injection du détergent et elle se traduit par la disparition du globule à l'écran. En effet, le squelette n'est pas visible en microscopie à fond clair.

La méthode de dissolution est reprise des expériences de Svoboda *et al.* [1992]. En observant les squelettes ainsi dissous en microscopie DIC, ils ont montré que la concentration

en détergent était suffisante pour dissoudre la totalité de la bicouche lipidique. Nous avons réalisé une expérience de contrôle afin de s'en assurer également (*cf.* § 3.1 de ce chapitre).

Après cela, le détergent est rincé par une injection de solution tampon hypotonique pendant 10 min. Le volume total de solution injecté est environ égal à celui de la chambre à injection, l'osmolarité du milieu est donc abaissée à 25 mOsm/kg pendant toute la durée des manipulations qui suivent.

Après la dissolution de la membrane, les billes ne peuvent pas être déplacées de manière indépendante. Ceci signifie qu'elles sont liées entre elles par le squelette, et que l'adhérence des billes sur le globule se fait *via* les protéines transmembranaires, elles-mêmes reliées au squelette (*cf.* Chapitre 1, § 2). Nous avons de plus réalisé un marquage en fluorescence de l'actine du squelette afin de s'assurer que l'intégrité du squelette est conservée après la dissolution (*cf.* § 3.1 de ce chapitre).

1.3 Déformation du squelette

Le squelette est déformé en variant la distance entre les trois pièges. Chacun de ces déplacements est contrôlé par le logiciel NIH Image (*cf.* Chapitre 2, § 2.3). Le déplacement des pièges se fait pas à pas selon deux directions perpendiculaires X ou Y, un pas faisant environ 0.1 μm .

Chaque squelette subit un cycle de trois séries de déformations. En augmentant la distance entre les pièges dans les deux directions X et Y (*cf.* Figure 4.2), nous obtenons une déformation proche d'une déformation d'extension pure. Lorsque la distance entre les pièges est augmentée dans une direction et diminuée dans l'autre, la déformation est proche d'une déformation de cisaillement pur. Lorsqu'une distance est augmentée alors que l'autre est maintenue constante, la déformation obtenue est une somme d'une déformation de

cisaillement et d'une déformation d'extension. En moins de deux minutes, trois cycles de déformations sont réalisés, chaque cycle étant composé d'une augmentation de 5 à 8 pas, suivi de la diminution inverse.

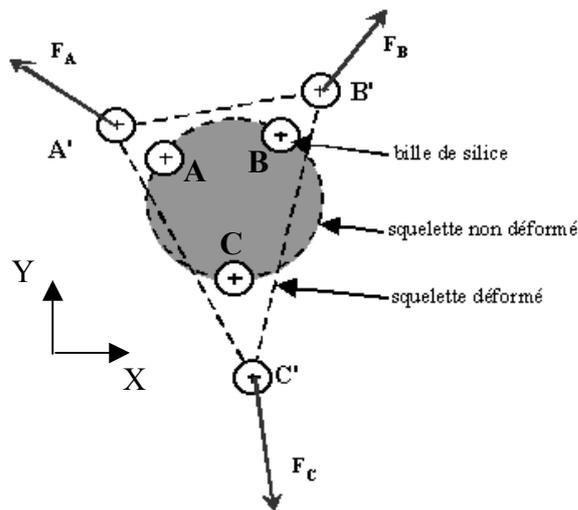


Figure 4.2 : Principe d'une mesure (échelle non respectée). Un globule rouge avec trois bille est piégé. La bicouche lipidique est dissoute et le squelette est déformé en augmentant la distance entre les pièges.

Toutes les mesures sont réalisées à 25°C, mesurée par le thermocouple dans la chambre à écoulement. L'échauffement local dû aux pinces optiques ne peut pas être mesuré. L'augmentation de température est de l'ordre de 1-2°C pour une puissance de 100 mW [Liu *et al.*, 1995 ; Kuo, 1995]. Lors de l'injection des solutions, la puissance d'émission du laser est maximale (600 mW) – ceci afin d'éviter que le globule rouge ne se dépiège. Une partie non négligeable de la puissance est absorbée par les différentes lentilles et surtout par l'objectif – Svoboda et Block [1994] rapportent que la moitié de la puissance peut y être absorbée. Ceci signifie que l'élévation de température locale n'excède pas 10°C.

1.4 Exploitation des résultats

Pour chaque position des pièges, une image est enregistrée. Afin de déterminer la direction et l'intensité des forces, il faut relever la position exacte des pièges. Pour cela, nous piégeons une bille libre dans chaque piège. La position du centre de la bille correspond alors au centre du piège et nous lui faisons subir le même cycle de déplacement. La position du

centre de chaque bille est mesurée à l'aide du logiciel d'analyse d'image NIH Image avec une précision estimée à ± 50 nm. La direction de la force est donnée par la droite passant par le centre de la bille et celui du piège et sa norme est calculée en utilisant la formule de calibration obtenue au chapitre 2 (*cf.* § 3.3 du chapitre 2). La déformation du squelette est déduite de la position des billes (*cf.* § 2 de ce chapitre). La puissance d'émission du laser est fixée à 150 mW pour l'ensemble de ces mesures, et la force appliquée varie de 1 à 8 pN par piège.

L'incertitude sur la force vient de l'incertitude dans la détermination de la position de la bille et de celle du piège, ainsi que dans l'erreur sur la calibration. L'erreur totale sur la force a ainsi été évaluée à 15 %. De la même manière, l'erreur sur la déformation provient de la détermination de la position des billes. L'erreur moyenne est de l'ordre de 10 %.

Le calcul de la déformation, des contraintes appliquées et la mesure des modules élastiques sont réalisés à l'aide du logiciel d'analyse de données KaleidaGraph.

2. Élasticité du squelette

Dans cette partie, nous présentons les relations permettant la mesure des modules élastiques K_C et μ_C . Le détail des calculs se trouvent en annexe de ce chapitre.

Hypothèses

Le squelette est considéré comme un milieu bidimensionnel élastique continu, homogène et isotrope. Nous considérons de plus que le squelette est plan en moyenne, et cela bien que la spectrine ait la possibilité de fluctuer dans les trois dimensions. Le module de courbure est négligé (*cf.* Chapitre 1, § 3.1 et § 4.4). Nous ne considérons de plus que les

petites déformations de manière à pouvoir appliquer la loi de Hooke. Sous ces hypothèses, les propriétés élastiques sont alors déterminées par deux modules élastiques : le module d'extension K_C et le module de cisaillement μ_C .

Nous considérons que les forces \vec{F}_A , \vec{F}_B et \vec{F}_C (cf. Figure 4.2) s'appliquent aux centres A, B et C des billes. Nous limitons l'étude des déformations à la partie du squelette comprise entre les trois billes. Nous faisons l'hypothèse que la déformation et la contrainte sont homogènes dans la région triangulaire ABC. Ceci signifie que cette région reste triangulaire pendant la déformation. Le squelette étant invisible en microscopie à fond clair, la déformation est déduite de la position des billes. Nous sommes conscient que cette hypothèse est grossière, notamment dans la région où le squelette adhère aux billes. Toutefois, des images en fluorescence du squelette sous tension ont été réalisées et montrent que cette hypothèse est raisonnable (cf. § 3.1 de ce chapitre).

Procédure d'exploitation des résultats

Il s'agit d'une part de relier le triplet de forces \vec{F}_A , \vec{F}_B et \vec{F}_C aux contraintes d'extension σ_e et de cisaillement σ_c , et d'autre part de relier la déformation du triangle ABC en A'B'C' aux composantes du tenseur des déformations e_{xx} et e_{yy} .

2.1 Tenseur des contraintes

Contrainte d'extension pure et contrainte de cisaillement pur

Nous montrons en annexe de ce chapitre qu'une contrainte d'extension pure est générée lorsque les trois forces (\vec{F}_A , \vec{F}_B , \vec{F}_C) sont orientées suivant les hauteurs du triangle ABC et que leur somme est nulle. De même, nous montrons que les forces générant une

contrainte de cisaillement pur sont concourantes en un point du cercle circonscrit au triangle ABC et telles que leur somme est nulle.

Cas général

Dans le cas général, les trois forces exercées aux trois sommets du triangle ABC sont quelconques, c'est-à-dire qu'elles génèrent des contraintes d'extension et de cisaillement. Il s'agit donc de décomposer le triplet de forces $(\vec{F}_A, \vec{F}_B, \vec{F}_C)$ en deux triplets : un triplet $(\vec{F}_{eA}, \vec{F}_{eB}, \vec{F}_{eC})$ générant une contrainte d'extension pure et un triplet $(\vec{F}_{cA}, \vec{F}_{cB}, \vec{F}_{cC})$ générant une contrainte de cisaillement pur.

Pour réaliser cette décomposition, chaque force est projetée sur les deux normales aux cotés adjacents le sommet. Par exemple, la force \vec{F}_A est projetée sur \vec{n}_C et \vec{n}_B , normales aux côtés AB et AC : $\vec{F}_A = \vec{F}_{AB} + \vec{F}_{AC}$ (cf. Figure 4.3). Les relations équivalentes sont obtenues pour les deux autres forces.

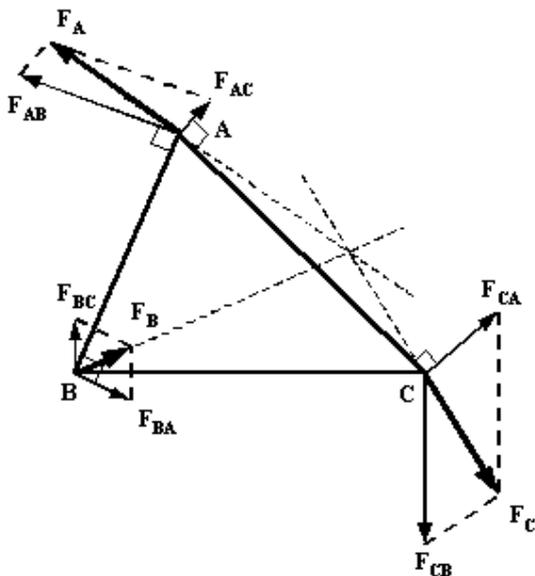


Figure 4.3 : Dans le cas général, le triplet de forces $(\vec{F}_A, \vec{F}_B, \vec{F}_C)$ est décomposé en deux triplets : un triplet générant une contrainte d'extension pure et un triplet générant une contrainte de cisaillement pur.

Il faut ensuite écrire chacune des deux forces ($\vec{F}_{AB}, \vec{F}_{BA}$) comme une paire de forces ($-\vec{F}_{eC}, -\vec{F}_{eC}$) appliquée en A et B et deux forces ($\vec{F}_{cAB}, \vec{F}_{cBA} = -\vec{F}_{cAB}$) :

$$\begin{cases} \vec{F}_{AB} = -\vec{F}_{eC} + \vec{F}_{cAB} \\ \vec{F}_{BA} = -\vec{F}_{eC} + \vec{F}_{cBA} = -\vec{F}_{eC} - \vec{F}_{cAB} \end{cases}$$

Par permutation circulaire, nous obtenons :

$$\begin{cases} \vec{F}_{AC} = -\vec{F}_{eB} + \vec{F}_{cAC} \\ \vec{F}_{CA} = -\vec{F}_{eB} + \vec{F}_{cCA} = -\vec{F}_{eB} - \vec{F}_{cCA} \end{cases} \quad \text{et} \quad \begin{cases} \vec{F}_{BC} = -\vec{F}_{eA} + \vec{F}_{cBC} \\ \vec{F}_{CB} = -\vec{F}_{eA} + \vec{F}_{cCB} = -\vec{F}_{eA} - \vec{F}_{cBC} \end{cases}$$

Le triplet donnant la contrainte d'extension pure et celui donnant la contrainte de cisaillement pur sont :

$$\begin{cases} \vec{F}_{eA} = -\frac{\vec{F}_{BC} + \vec{F}_{CB}}{2} \\ \vec{F}_{eB} = -\frac{\vec{F}_{AC} + \vec{F}_{CA}}{2} \\ \vec{F}_{eC} = -\frac{\vec{F}_{AB} + \vec{F}_{BA}}{2} \end{cases} \quad \text{et} \quad \begin{cases} \vec{F}_{cA} = -\frac{\vec{F}_A - \vec{F}_{BA} - \vec{F}_{CA}}{2} = \vec{F}_A - \vec{F}_{eA} \\ \vec{F}_{cB} = -\frac{\vec{F}_B - \vec{F}_{CB} - \vec{F}_{AB}}{2} = \vec{F}_B - \vec{F}_{eB} \\ \vec{F}_{cC} = -\frac{\vec{F}_C - \vec{F}_{AC} - \vec{F}_{BC}}{2} = \vec{F}_C - \vec{F}_{eC} \end{cases}$$

Les forces $\vec{F}_{eA}, \vec{F}_{eB}$ et \vec{F}_{eC} sont orientées respectivement suivant les normales \vec{n}_A, \vec{n}_B et \vec{n}_C .

Leur somme est nulle. Elles génèrent donc une contrainte d'extension pure (*cf.* Annexe). De la même manière, les forces ($\vec{F}_{cAB}, \vec{F}_{cBA}$), ($\vec{F}_{cAC}, \vec{F}_{cCA}$) et ($\vec{F}_{cBC}, \vec{F}_{cCB}$) créent une contrainte de cisaillement pur. Il en est donc de même pour le triplet de forces équivalentes :

($\vec{F}_{cA}, \vec{F}_{cB}, \vec{F}_{cC}$).

L'intensité de la contrainte d'extension pure σ_e est donnée par (*cf.* Annexe) :

$$\sigma_e = 2 \frac{F_{eA}}{BC} = 2 \frac{F_{eB}}{CA} = 2 \frac{F_{eC}}{AB},$$

où BC, CA et AB sont les longueurs des cotés du triangle ABC.

L'intensité de la contrainte de cisaillement pur est (*cf.* Annexe) :

$$\sigma_c = 2 \frac{F_{cA}}{BC} = 2 \frac{F_{cB}}{CA} = 2 \frac{F_{cC}}{AB}.$$

2.2 Tenseur des déformations

La déformation est obtenue à partir de la transformation du triangle ABC en A'B'C' (*cf.* Figure 4.2).

2.2.1 Déformation d'extension pure

La déformation d'extension pure $u_{XX} + u_{YY}$ (trace du tenseur des déformations) correspond à la variation relative de surface :

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{S_{A'B'C'} - S_{ABC}}{S_{ABC}}$$

où $S_{A'B'C'}$ est l'aire du triangle A'B'C' déformé et S_{ABC} l'aire du triangle ABC avant déformation.

2.2.2 Déformation de cisaillement pur

La déformation de cisaillement pur est définie par :

$$e_{xx} - e_{yy} = \frac{\partial u_x}{\partial x} - \frac{\partial u_y}{\partial y}$$

où u_i est le champ de déplacement local. Le système de coordonnées principales (\bar{e}_x, \bar{e}_y) où le tenseur des déformations est diagonal permet de calculer la déformation. La méthode pour déterminer la direction de \bar{e}_x est présentée en annexe E de ce chapitre. Dans ce système de coordonnées, le côté $\vec{AB} = X \bar{e}_x + Y \bar{e}_y$ devient $\vec{A'B'} = X' \bar{e}_x + Y' \bar{e}_y$ après déformation. La déformation de cisaillement est alors :

$$e_{xx} - e_{yy} = \frac{X' - X}{X} - \frac{Y' - Y}{Y}.$$

2.2.3 Conclusion

En conclusion, le module d'extension K_C est donné par :

$$\sigma_e = K_C \frac{\Delta S}{S_0},$$

et le module de cisaillement μ_C est donné, dans le repère principal, par :

$$\sigma_e = \mu_C (e_{xx} - e_{yy}).$$

3. Résultats et discussions

3.1 Expériences de contrôle

Nous avons réalisé deux expériences de contrôle. La première afin de vérifier que toute la bicouche lipidique est dissoute par notre procédure. La deuxième pour s'assurer de l'intégrité du squelette après la dissolution de la bicouche lipidique.

Dissolution de la bicouche

La bicouche lipidique est marquée par un lipide fluorescent : le DIOC₁₈ (dioctadecyloxycarbocyanine, Molecular Probe). La méthode de marquage, issue de Discher *et al.* [1994], est résumée en annexe G de ce chapitre. L'excitation du marqueur se fait en lumière bleue ($\lambda_{\text{ex}} = 484 \text{ nm}$) et l'émission se fait dans le vert ($\lambda_{\text{em}} = 501 \text{ nm}$). Les globules rouges sont observés en microscopie de fluorescence. Une solution de détergent est injectée, et le signal de fluorescence devient indétectable dans les secondes qui suivent l'injection. La constante de temps de décroissance du signal ($\sim 1 \text{ s}$) est bien inférieure à celle de photoblanchiment ($\sim 240 \text{ s}$). Ceci montre que la bicouche lipidique est entièrement dissoute par la procédure, en accord avec Svoboda *et al.* [1992].

Marquage de l'actine du squelette

L'actine du squelette est marquée à la phalloïdine-TRITC (Sigma, P-1951), d'après la méthode présentée dans Discher *et al.* [1994] et résumée en annexe H de ce chapitre. La technique consiste à lyser la membrane à froid afin de permettre à la sonde fluorescente d'entrer dans le globule et de se fixer sur l'actine. Les globules rouges sont marqués par cette méthode, puis les billes sont collées par la technique décrite précédemment (*cf.* § 1 de ce chapitre). Un globule marqué est piégé et la bicouche lipidique est dissoute. Le squelette reste fluorescent après la dissolution. Pour chaque position des pièges, nous enregistrons une image en fluorescence et une image en microscopie à fond clair afin de relever la position des billes. La figure 4.4 présente la superposition de ces deux images. L'image A montre un squelette au repos et l'image B le même squelette déformé.

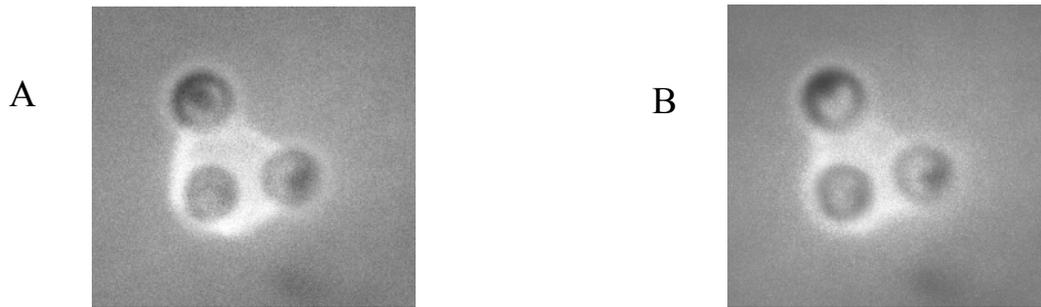


Figure 4.4 : L'actine d'un globule rouge est marquée par de la phalloïdine-TRITC. Après dissolution de la bicouche, le squelette est visualisé en fluorescence. L'image (A) correspond au squelette au repos et l'image (B) au même squelette sous tension.

Ces images montrent que le squelette reste accroché aux billes après la dissolution de la bicouche lipidique. De plus, il n'apparaît pas de zone sur le squelette déformé où la déformation soit plus importante qu'ailleurs. Ceci confirme l'hypothèse que la contrainte est relativement homogène sur la partie du squelette comprise entre les billes.

3.2 Mesure des modules élastiques

Nous présentons ici les mesures réalisées dans une solution tampon à 25 mOsm/kg, sans adénosine triphosphate (ATP) et à température ambiante, $\sim 25^{\circ}\text{C}$. Les mesures sont effectuées 10 min après la dissolution de la bicouche et se déroulent en moins de deux minutes.

Dissolution de la bicouche lipidique

Avant la dissolution, le globule rouge est maintenu sous tension par les pinces optiques. Les billes sont donc légèrement décentrées par rapport aux pièges. Lorsque le front de détergent arrive, les billes sont ramenées dans le centre des pièges tandis que la membrane disparaît. Ceci signifie que le squelette se détend légèrement en milieu hypotonique. Deux phénomènes complémentaires peuvent expliquer cela : le squelette est contraint par la

bicouche lipidique et la longueur bout-à-bout des filaments de spectrine augmente lorsque l'osmolarité diminue.

Mesure des modules d'extension et de cisaillement

La figure 4.5 présente un résultat type obtenu sur un squelette soumis à un cycle de déformations. La déformation totale est la somme d'une déformation d'extension et d'une déformation de cisaillement. La figure (A) représente la contrainte d'extension pure en fonction de la variation de surface relative. La figure (B) représente la contrainte de cisaillement pur en fonction de la déformation de cisaillement pur. Nous observons dans les deux cas une relation linéaire, en accord avec notre modèle d'élasticité linéaire. Pour la déformation d'extension, la surface s'accroît de 15 % au maximum. La pente donne le module d'extension K_C , ici $K_C = 6.1 \mu\text{N/m}$. Dans le cas du cisaillement, la déformation maximale est de 30 %. La pente de la droite donne le module de cisaillement μ_C , ici $\mu_C = 2.7 \mu\text{N/m}$.

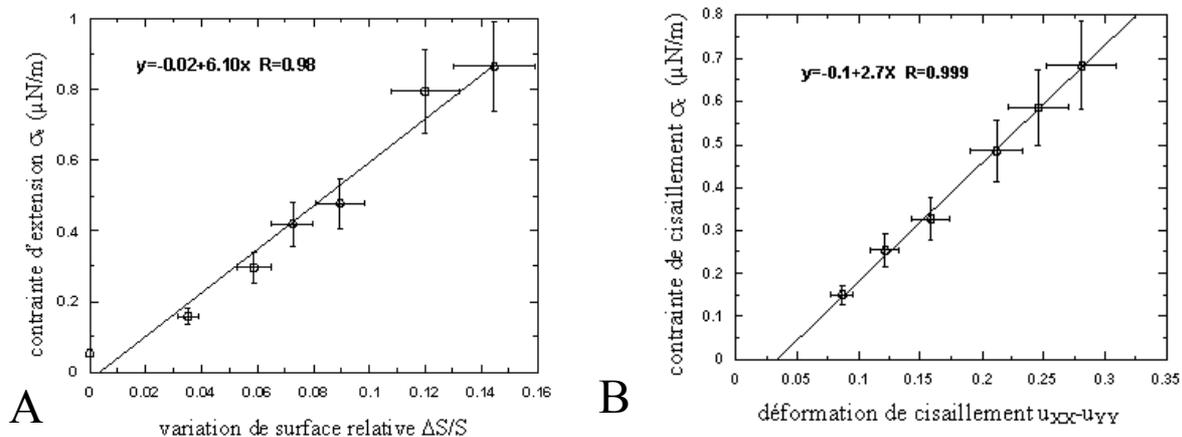


Figure 4.5 : Résultats types obtenus sur un globule rouge en milieu hypotonique. (A) Contrainte d'extension pure en fonction de la variation relative de surface. La pente de la droite correspond au module d'extension K_C . (B) Contrainte de cisaillement en fonction de la déformation de cisaillement. La pente de la droite est égale au module de cisaillement μ_C .

3.3 Histogramme des mesures à 25 mOsm/kg

La table 4.1 présente l'ensemble des mesures de K_C et μ_C obtenues sur 19 squelettes à 25 mOsm/kg. Chaque valeur présentée est la moyenne sur l'ensemble des valeurs obtenues pour chacun des cycles de déformations réalisés sur un même squelette. Le nombre de cycles de déformations réalisé est indiqué entre parenthèse. L'écart type correspondant est également indiqué. La valeur moyenne du module d'extension est $\langle K_C \rangle = 9.0 \pm 3.6 \mu\text{N/m}$, celle du module de cisaillement $\langle \mu_C \rangle = 5.2 \pm 2.1 \mu\text{N/m}$ et celle du rapport des deux modules est $\langle K_C/\mu_C \rangle = 2.3 \pm 1.1$. La dispersion des résultats est très importante, puisque K_C est compris entre 3.5 et 14.6 $\mu\text{N/m}$, μ_C entre 1.8 et 9.6 $\mu\text{N/m}$ et K_C/μ_C entre 1.0 et 4.8.

squelette #	module d'extension K_C ($\mu\text{N/m}$)	module de cisaillement μ_C ($\mu\text{N/m}$)	K_C/μ_C
1	7.1 ± 3.6 (6)	3.7 ± 2.4 (6)	2.0 ± 0.6 (6)
2	4.4 (1)	6.3 ± 1.3 (2)	-
3	12.3 ± 5.4 (3)	-	-
4	10.2 ± 3.8 (5)	8.8 ± 3.9 (4)	1.5 ± 0.8 (4)
5	8.4 ± 2.7 (6)	4.5 ± 0.8 (4)	1.9 ± 1.1 (4)
6	4.1 ± 1.3 (6)	-	-
7	9.3 ± 2.6 (6)	4.8 ± 1.5 (6)	2.0 ± 0.2 (6)
8	11.9 ± 6.1 (4)	8.1 ± 3.3 (4)	-
9	6.8 ± 1.5 (8)	4.5 ± 2.7 (8)	2.0 ± 1.3 (8)
10	3.5 ± 1.1 (7)	3.9 ± 1.4 (7)	1.1 ± 0.8 (7)
11	9.7 ± 3.7 (3)	4.0 ± 1.5 (2)	2.0 ± 0.1 (2)
12	14.6 ± 4.8 (4)	7.3 ± 4.6 (6)	3.4 ± 2.0 (3)
13	14.0 ± 2.2 (3)	4.5 ± 1.4 (5)	3.0 ± 1.2 (3)
14	6.5 ± 0.5 (4)	3.5 ± 1.8 (4)	2.3 ± 1.1 (4)
15	13.9 ± 1.4 (7)	9.6 ± 3.2 (3)	1.5 ± 0.6 (3)
16	-	5.5 ± 3.7 (3)	-
17	12.2 ± 1.7 (5)	3.6 ± 1.2 (4)	3.7 ± 0.8 (4)
18	4.3 ± 3.3 (4)	4.1 ± 0.9 (4)	1.0 ± 0.7 (4)
19	8.7 ± 3.6 (6)	1.8 ± 0.6 (4)	4.8 ± 0.7 (4)
moyenne :	9.0 ± 3.6	5.2 ± 2.1	2.3 ± 1.1

Table 4.1 : Valeurs moyennes des modules d'extension et de cisaillement obtenues sur 19 squelettes. Le nombre de cycles de déformations réalisés sur chaque squelette est indiqué entre parenthèse.

Géométrie de la déformation

Une partie de la dispersion est due à un artefact de la manipulation : nous ne contrôlons pas le nombre de feuillets du squelette qui sont déformés. Le squelette est une surface fermée. Comme le montre la figure 4.6, les forces peuvent s'appliquer soit sur un seul feuillet du squelette, soit sur les deux, suivant la position des billes. De manière générale, si

les billes sont dans le plan de symétrie du squelette, les forces vont s'appliquer aux deux feuillets du squelette. Si ce n'est pas le cas, un seul feuillet sera déformé. Lorsque deux feuillets sont déformés, les module élastiques apparents sont doubles comparé au cas où un seul feuillet est déformé.

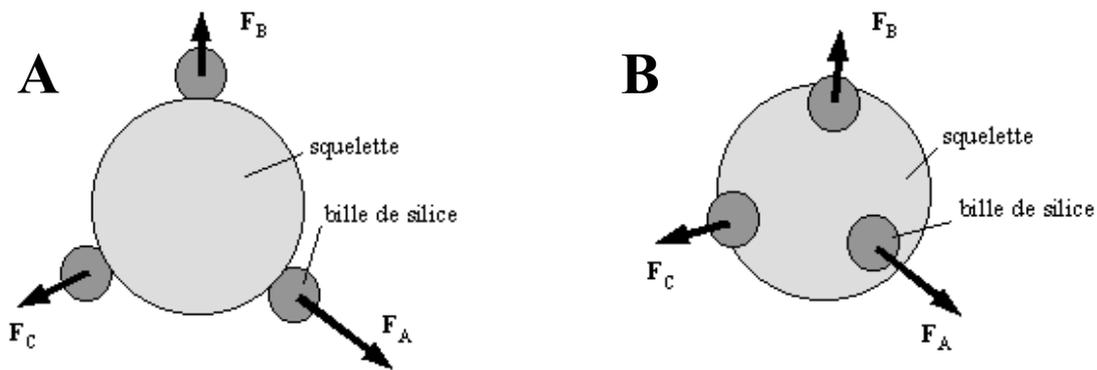


Figure 4.6 : Le nombre de feuillets du squelette déformés dépend de la position des billes. (A) Si les billes sont dans le plan de symétrie du squelette, les deux feuillets sont déformés. (B) Si ce n'est pas le cas , un seul feuillet est déformé.

La situation réelle n'est toutefois pas aussi simple car le nombre de feuillets déformés dépend aussi de la déformation exercée, et cela pour un même squelette. Certains cycles de déformations peuvent s'exercer sur un seul feuillet, alors que d'autres cycles de déformations peuvent faire travailler les deux feuillets, suivant la direction des forces appliquées. Pour prendre en compte ce phénomène, nous avons tracé les histogrammes des modules élastiques pour tous les cycles de déformations (77 mesures de K_C et 76 mesures de μ_C – cf. Figure 4.7). Comme nous l'attendions, les distributions de K_C et de μ_C présentent deux maxima. Dans le cas du module d'extension, le premier maximum est compris entre 4 et 6 $\mu\text{N/m}$ et le deuxième entre 9 et 11 $\mu\text{N/m}$. Le rapport entre les deux maxima est proche de 2, en accord avec l'hypothèse que le nombre de feuillets déformés (1 ou 2) dépend de la déformation. Pour extraire de ces histogrammes la valeur des modules élastiques, nous avons lissé ces courbes

par une somme de deux fonctions gaussiennes. Pour le module d'extension, l'équation correspondante s'écrit :

$$N(K_C) = A_1 \exp\left(-\frac{(K_C - \langle K_C \rangle)^2}{2 \Delta K_{C1}^2}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{(K_C - 2 \langle K_C \rangle)^2}{2 \Delta K_{C2}^2}\right)$$

où $N(K_C)$ est le nombre de mesures correspondant à la valeur K_C , A_1 et A_2 sont deux constantes, et ΔK_{C1} et ΔK_{C2} sont les écarts types. Le maximum de la deuxième courbe gaussienne est fixé au double de la première. Le même lissage est effectué pour le module de cisaillement dont l'histogramme présente également deux maxima, le premier entre 1.5 et 3 $\mu\text{N/m}$ et le deuxième entre 4.5 et 5.5 $\mu\text{N/m}$.

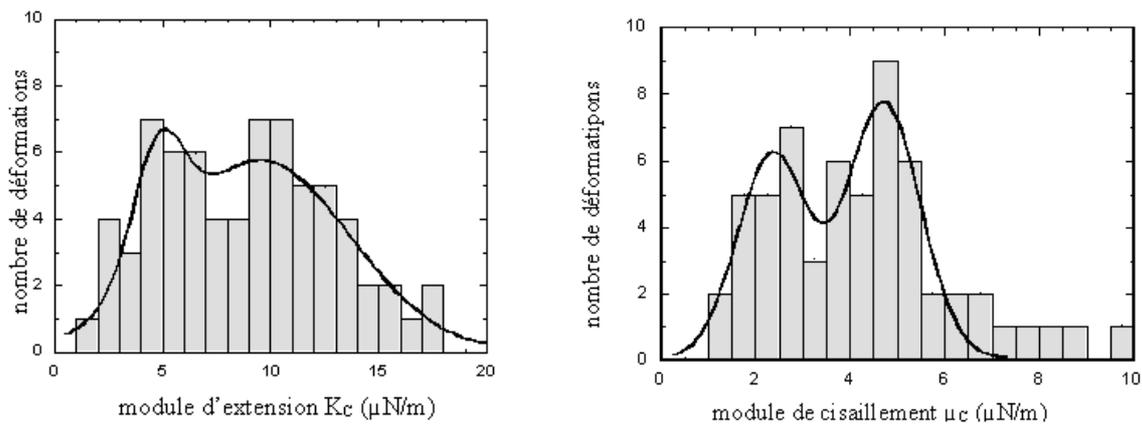


Figure 4.7 : Histogrammes des modules d'extension et de cisaillement obtenus pour chaque cycle de déformations. Chacun des deux histogrammes présente deux maxima, suivant que le cycle de déformations a lieu sur un feuillet du squelette ou sur les deux.

Le lissage permet la mesure de la valeur moyenne des modules élastiques pour un seul feuillet. Nous avons obtenu $K_C = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$. Nous constatons que les modules élastiques du squelette sont du même ordre de grandeur que le module de cisaillement de la membrane ($\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$ mesuré par pinces optiques [Hénon *et al.*, 1999]). Les modules de cisaillement de la membrane et du squelette ne peuvent pas être

comparés directement, puisque les deux mesures ne sont pas faites à la même force ionique. L'absence de bicouche lipidique a également une influence sur l'élasticité du squelette. La différence entre μ et μ_C est discutée au chapitre 5, § 1.3.

Rapport des modules d'extension et de cisaillement $\frac{K_C}{\mu_C}$

La figure 4.8 représente l'histogramme des rapports K_C/μ_C . Chaque rapport est mesuré sur un même squelette pour un même cycle de déformations. Sur l'ensemble des mesures, 65 cycles de déformations ont permis la mesure simultanée des deux modules élastiques. En lissant l'histogramme par une seule courbe gaussienne, nous obtenons la valeur moyenne du rapport, $K_C/\mu_C = 1.9 \pm 1.0$.

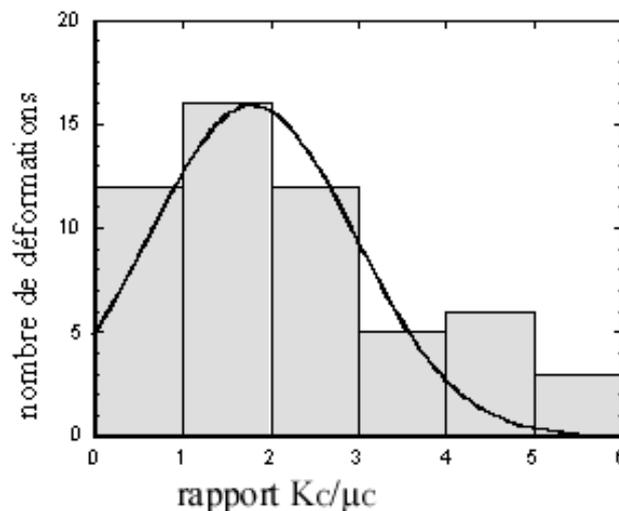


Figure 4.8 : Histogramme des rapports K_C/μ_C obtenus sur un même squelette pour un même cycle de déformations. La valeur moyenne est $K_C/\mu_C = 1.9 \pm 1.0$.

Plusieurs prédictions théoriques et numériques ont été réalisées sur des réseaux de ressorts (*cf.* Chapitre 1, § 5). Une étude théorique portant sur un réseau triangulaire parfait de ressorts a donné $K_C/\mu_C = 2$ [Kantor et Nelson, 1987]. Des études numériques sur des réseaux

bidimensionnels triangulaires parfaits ont obtenu $K_C/\mu_C = 2$ [Boal *et al.*, 1993 ; Hansen *et al.*, 1996]. Les modules élastiques décroissent lorsque certains défauts sont ajoutés dans le réseau, notamment en augmentant la présence d'hexamères et de tétramères, et en diminuant le nombre de filaments de spectrine par complexe de jonction [Hansen *et al.*, 1997]. Une étude numérique portant sur un réseau parfait triangulaire de ressorts entropiques libres de fluctuer dans un demi-espace a également montré que $K_C/\mu_C = 1.7$ [Boal, 1994]. Les paramètres entrés dans ce modèle sont la température $T = 300$ K, la longueur de contour des filaments de spectrine ($L = 200$ nm) et l'aire du squelette en fonction du nombre de complexes de jonction.

La valeur mesurée est un parfait accord avec ces prédictions. Ceci permet de penser que le squelette conserve sa structure bidimensionnelle triangulaire après la dissolution de la bicouche lipidique.

3.4 Origines de la dispersion

Le lissage par une double gaussienne réduit la dispersion. Mais les valeurs mesurées présentent encore une certaine dispersion (*cf.* § 3.2 de ce chapitre). Trois hypothèses expliquent cette dispersion.

Dispersion naturelle

Comme nous l'avons déjà signalé à propos des mesures sur la membrane du globule rouge, une partie de la dispersion provient de mesures effectuées sur des squelettes d'âges différents. Le globule rouge a une durée de vie d'environ 120 jours. Beaucoup de modifications surviennent au sein de la membrane au cours de ces trois mois. Il en résulte une augmentation des modules élastiques [Linderkamp et Meiselman, 1982]. Une étude récente a mis en évidence des modifications au sein même de la spectrine [Corsi *et al.*, 1999]. Des

modifications dans la structure du squelette, dont une augmentation de la densité de défauts, peuvent aussi expliquer la dispersion.

Géométrie de la déformation

Comme nous l'avons déjà souligné, le nombre de feuillets du squelette déformé n'est pas contrôlé. Notre analyse prend en compte que le nombre de feuillets varie suivant le cycle de déformations exercé. Mais il est également possible qu'au cours d'un cycle de déformations, le nombre de feuillets sollicités change. Par exemple, un seul feuillet peut être déformé au début du cycle de déformations, et les deux lorsque la déformation devient plus importante. Notre analyse ne prend pas en compte ce phénomène.

Modification du squelette

Notons également que le squelette est susceptible de subir des modifications après son extraction. Il est arrivé qu'une des billes se détache complètement du squelette, ou que le squelette se déchire. Alors la position d'une des billes est confondue avec celle du piège et la valeur des modules élastiques est moindre. Il est également possible que les feuillets adhèrent l'un à l'autre.

3.5 Longueur de persistance d'un filament de spectrine

Dans le cas d'un réseau bidimensionnel triangulaire parfait de ressorts, les modules élastiques sont reliés à la raideur d'un seul ressort k [Kantor et Nelson, 1987 ; Boal *et al.*, 1993] (*cf.* Chapitre 1, § 3.3) :

$$K_c = 2 \mu_c = \frac{\sqrt{3}}{2} k .$$

Bien que cette relation ne soit valable que pour un réseau triangulaire parfait, elle permet d'obtenir un ordre de grandeur de la raideur des filaments de spectrine. Nous mesurons une raideur de $5.5 \pm 3.1 \mu\text{N/m}$ à 25 mOsm/kg.

Les filaments de spectrine se comportent comme des ressorts entropiques. En effet, les forces appliquées sur le squelette sont de l'ordre de la dizaine de piconewtons, ce qui correspond à une force par filament de l'ordre de quelques dixièmes de pN. Or la force nécessaire pour déplier les sous unités de la spectrine est de l'ordre de 25-35 pN [Rief *et al.*, 1999], voir de 60 pN [Lenne *et al.*, 2000]. Ceci signifie qu'aux forces auxquelles nous travaillons, les sous unités ne sont pas dépliées et le comportement élastique de la spectrine est d'origine purement entropique. Il est alors possible de relier la raideur d'un filament à la longueur de persistance ξ de la spectrine, à l'aide du modèle du ver [Marko et Siggia, 1995] :

$$k = \frac{3 k_B T}{2 \xi L}$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue ($T \sim 300 \text{ K}$) et L la longueur de contour de la spectrine ($L \sim 200 \text{ nm}$). Ce modèle s'applique à un polymère libre, et non à un polymère inclus dans un réseau. Les fluctuations d'un filament de spectrine inclus dans un réseau sont contraintes par la présence des autres filaments. Ceci réduit l'espace des phases accessible. Cet effet est discuté dans Discher *et al.* [1998]. Ce modèle donne toutefois un ordre de grandeur de la longueur de persistance de la spectrine.

Nous mesurons une raideur de $5.5 \pm 3.1 \mu\text{N/m}$ et une longueur de persistance de la spectrine *in situ* de $\xi \sim 5 \text{ nm}$ à 25 mOsm/kg. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles estimées par différentes techniques (*cf.* Chapitre 1, § 6), où les mesures obtenues varient de 1 à 20 nm.

Nous constatons que la valeur de ξ pour un filament (double brin) est plus importante que celle portant sur un monomère seul ($\xi \sim 0.7 - 0.8 \text{ nm}$; *cf.* Chapitre 1, § 6.3). La mesure *in situ* estimée par Svoboda *et al.* ($\xi \sim 6 \text{ nm}$) est proche de notre mesure, bien qu'elle ne soit pas effectuée à la même osmolarité. La mesure effectuée sur la spectrine en solution ($\xi \sim 20 \text{ nm}$) est plus importante, ce qui montre l'influence du réseau.

D'autre part, la longueur de contour d'un tétramère de spectrine est de 200 nm. Un tétramère est composé de deux dimères, associant chacun deux brins α - β . Le brin α est composé de la répétition de 22 séquences de base, le brin β de 17 (*cf.* Chapitre 1, § 2.1). La longueur d'une sous-unité est de 5 nm. Ceci laisse à penser que chaque brin de spectrine se comporte approximativement comme une chaîne de séquences de base librement jointe, l'orientation de chacune des séquences de base étant aléatoire.

Rappelons pour comparaison que l'ADN a une longueur de persistance de l'ordre de 50 nm ; celle du PDMS (polydiméthylsiloxane) est de 5 Å. En ce qui concerne les constituants du cytosquelette d'une cellule eucaryote, l'actine a une longueur de persistance de l'ordre de 10 μm , celle des microtubules est de l'ordre du millimètre. Ceci explique pourquoi le globule rouge a un squelette particulier basé sur la spectrine et non sur l'actine comme toutes les autres cellules. Une cellule avec seulement un réseau d'actine sous-membranaire ne pourrait pas se déformer comme le fait le globule rouge.

Conclusion

L'étude présentée ici expose la première mesure directe des modules élastiques d'un squelette de globule rouge humain fraîchement séparé de la bicouche lipidique. Les forces appliquées ainsi que l'osmolarité du milieu environnant sont bien contrôlées. Nous avons

mesuré à 25 mOsm/kg un module d'extension $K_C = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$ et un module de cisaillement $\mu_C = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$. Le rapport de ces deux modules est $K_C/\mu_C = 1.9 \pm 1.0$. Ces mesures sont en bon accord avec les modèles décrivant un tel réseau de polymères. Les modules élastiques du squelette sont du même ordre de grandeur que le module de cisaillement de la membrane entière ($\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$ mesuré par pinces optiques). Notons que les deux mesures ne sont pas réalisées à la même osmolarité, ce qui rend toute comparaison directe impossible.

Ces deux modules élastiques permettent la mesure de la longueur de persistance ξ de la spectrine. Il s'agit de la première mesure « fiable » de ξ *in situ*. La valeur trouvée est de l'ordre de 5 nm à 25 mOsm/kg. Cette valeur est cohérente avec des estimations précédentes, donnant ξ entre 1 et 20 nm.

Afin de comparer le module de cisaillement μ à μ_C et K_C , il faut connaître ces derniers à 300 mOsm/kg. De plus, nous venons de montrer que l'élément essentiel dans l'élasticité de la membrane du globule rouge humain est la raideur de la spectrine. La spectrine est une protéine chargée ; la raideur dépend donc de la force ionique du milieu environnant, et donc de l'osmolarité. En conséquence, nous allons étudier le comportement élastique du squelette à différentes forces ioniques.

Annexes du chapitre 4

Annexe A : Généralités sur la mécanique du squelette

Loi de Hooke

En élasticité bidimensionnelle, le tenseur des contraintes $[\boldsymbol{\sigma}]$ et le tenseur des déformations $[\mathbf{e}]$ sont des tenseurs 2×2 . Ils sont symétriques, donc diagonalisables. Dans le système principal de coordonnées, où ces tenseurs sont diagonaux, la loi de Hooke s'écrit :

$$\sigma_{XX} = K_C (e_{XX} + e_{YY}) + \mu_C (e_{XX} - e_{YY}) = \sigma_e + \sigma_c$$

$$\sigma_{YY} = K_C (e_{XX} + e_{YY}) - \mu_C (e_{XX} - e_{YY}) = \sigma_e - \sigma_c$$

$$\sigma_{XY} = 2\mu_C e_{XY} = 0$$

Ici, σ_e et σ_c représentent respectivement la contrainte d'extension pure et la contrainte de cisaillement pur.

Équilibre mécanique

L'équilibre mécanique du squelette s'écrit :

$$\begin{aligned}\vec{R} &= \vec{F}_A + \vec{F}_B + \vec{F}_C = \vec{0} \\ \vec{M}_O(\vec{F}_A) + \vec{M}_O(\vec{F}_B) + \vec{M}_O(\vec{F}_C) &= \vec{0}\end{aligned}$$

où \vec{R} est la résultante des forces et $\vec{M}_O(\vec{F})$ le moment de la force \vec{F} par rapport à un point quelconque O. Notons que si cette relation est vraie en O, elle le reste pour n'importe quel point O' (puisque la résultante des forces est nulle) :

$$\vec{M}_{O'}(\vec{F}) = \vec{M}_O(\vec{F}) + \vec{R} \times \vec{OO}'.$$

Si la somme des trois moments est nulle, alors les trois forces sont concourantes.

Annexe B : Contrainte d'extension pure

Nous allons déterminer ici les caractéristiques du triplet de forces $(\vec{G}_A, \vec{G}_B, \vec{G}_C)$ générant une contrainte d'extension pure.

Nous considérons une surface triangulaire ABC sur laquelle une contrainte est appliquée. La force $d\vec{G}$ appliquée sur un côté de longueur dl d'un élément de surface est reliée au tenseur des contraintes par :

$$d\vec{G} = [\sigma] \vec{n} dl \quad (\text{Eq. A.1}).$$

Le vecteur \vec{n} est le vecteur unité orthogonal au côté de longueur dl .

Dans le cas d'une contrainte d'extension pure, le tenseur des déformations est donné par :

$$\begin{cases} e_{xx} = e_{yy} \\ e_{xy} = 0 \end{cases} \quad \text{et} \quad \begin{cases} \sigma_{xx} = \sigma_{yy} = 2 K_C e_{xx} = 2 K_C e_{yy} \\ \sigma_{xy} = 0 \end{cases}$$

quel que soit le référentiel choisi. Le tenseur des contraintes est diagonal et s'écrit :

$$[\sigma] = \sigma_e \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}.$$

La contrainte étant homogène, la force résultante exercée sur une longueur L est donnée par :

$\vec{G} = \sigma_e L \vec{n}$. Son point d'application est supposé au milieu du segment de longueur L . Par

exemple, la force \vec{G}_A exercée sur BC est donnée par : $\vec{G}_A = \sigma_e BC \vec{n}_A$ (cf. Figure 4.9), \vec{n}_A représente le vecteur unitaire normal au segment BC et orienté vers l'extérieur du triangle.

La force \vec{G}_A est donc orientée suivant le vecteur unitaire \vec{n}_A et sa norme est telle que

$$\sigma_e = \frac{\|\vec{G}_A\|}{BC}.$$

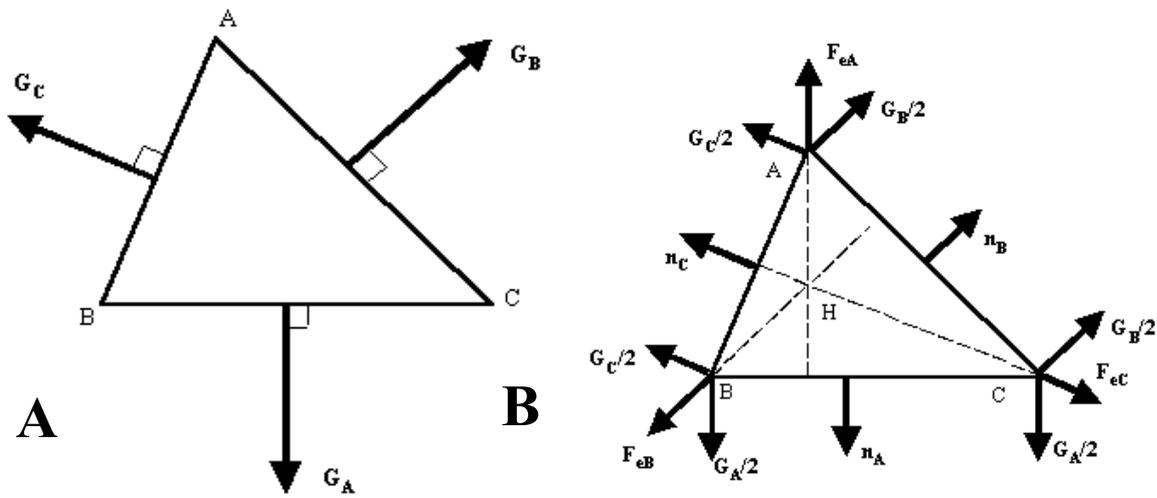


Figure 4.9 : (A) Configuration du triplet de forces \vec{G}_A , \vec{G}_B et \vec{G}_C donnant une contrainte d'extension pure sur le triangle ABC. (B) Le triplet de forces \vec{F}_{eA} , \vec{F}_{eB} et \vec{F}_{eC} exercées aux sommets du triangle ABC génère une contrainte équivalente à celle du triplet \vec{G}_A , \vec{G}_B et \vec{G}_C .

Ainsi, dans le cas d'un triangle quelconque ABC, les forces \vec{G}_A , \vec{G}_B et \vec{G}_C générant une contrainte d'extension pure sont orientées respectivement suivant la normale aux segments BC, CA et AB. Ces trois forces sont concourantes et leur somme est nulle. Leur norme est donnée par :

$$\sigma_e = \frac{G_A}{BC} = \frac{G_B}{CA} = \frac{G_C}{AB}.$$

Le problème maintenant est de relier les forces \vec{G}_A, \vec{G}_B et \vec{G}_C exercées aux milieux des côtés BC, CA et AB à des forces exercées aux trois sommets du triangle ABC. Pour un élément de surface élémentaire, une force \vec{G}_A exercée au milieu du segment BC est équivalente à deux forces $\vec{G}_A/2$, une exercée en B et l'autre en C. Ceci reste valable pour le triangle ABC puisque nous avons émis l'hypothèse que la contrainte y est homogène. Nous pouvons ainsi relier le triplet de forces $\vec{F}_{eA}, \vec{F}_{eB}$ et \vec{F}_{eC} exercées aux trois sommets du triangle aux trois forces \vec{G}_A, \vec{G}_B et \vec{G}_C donnant une contrainte d'extension pure. Ces deux triplets de forces génèrent la même contrainte supposée homogène et ils sont liés par les relations suivantes (*cf.* Figure 4.9) :

$$\begin{aligned}\vec{F}_{eA} &= \frac{\vec{G}_B + \vec{G}_C}{2} = -\frac{\vec{G}_A}{2} \\ \vec{F}_{eB} &= \frac{\vec{G}_C + \vec{G}_A}{2} = -\frac{\vec{G}_B}{2} \\ \vec{F}_{eC} &= \frac{\vec{G}_A + \vec{G}_B}{2} = -\frac{\vec{G}_C}{2}\end{aligned}$$

La deuxième partie de l'égalité vient de l'équilibre du squelette : $\vec{G}_A + \vec{G}_B + \vec{G}_C = \vec{0}$. Chacune de ces forces est donc orientée suivant la hauteur issue du sommet auquel elle s'applique.

Leurs normes sont reliées à σ_e par :

$$\sigma_e = 2 \frac{F_{eA}}{BC} = 2 \frac{F_{eB}}{CA} = 2 \frac{F_{eC}}{AB} \quad (\text{Eq. A.2}).$$

En conclusion, les forces \vec{F}_{e_A} , \vec{F}_{e_B} et \vec{F}_{e_C} donnant une contrainte d'extension pure sont portées par les hauteurs du triangle ABC. Leur somme est nulle et leurs normes sont données par l'équation A.2.

Annexe C : Contrainte de cisaillement pur

Généralités sur le cisaillement

Une déformation de cisaillement pur sur un élément de surface est donnée par :

$$e_{xx} = -e_{yy}.$$

La contrainte est alors donnée par :

$$\begin{cases} \sigma_{xx} = 2 \mu_C e_{xx} \\ \sigma_{yy} = -2 \mu_C e_{xx} \\ \sigma_{xy} = 2 \mu_C e_{xy} \end{cases}.$$

Le tenseur des contraintes de cisaillement pur est symétrique, donc diagonalisable. Il existe une base de coordonnées (\vec{e}_X, \vec{e}_Y) où le tenseur des contraintes de cisaillement pur s'écrit :

$$[\sigma]_{XY} = \sigma_c \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}.$$

Les forces \vec{K}_A , \vec{K}_B et \vec{K}_C correspondant à ce tenseur des contraintes s'obtiennent par intégration de l'équation A.1 et sont représentées sur la figure 4.10. Leurs normes sont données par :

$$\sigma_c = \frac{K_A}{BC} = \frac{K_B}{CA} = \frac{K_C}{AB}.$$

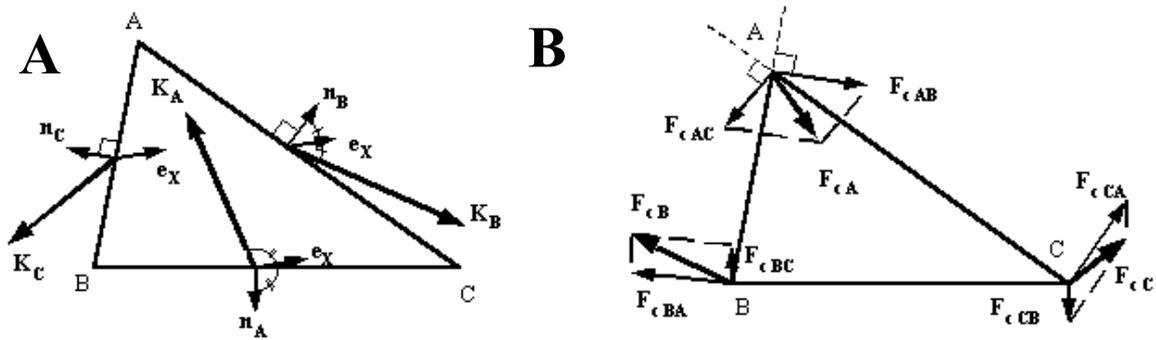


Figure 4.10 : (A) configuration des trois forces \vec{K}_A, \vec{K}_B et \vec{K}_C donnant une contrainte de cisaillement pur sur le triangle ABC. (B) Les trois forces $\vec{F}_{cA}, \vec{F}_{cB}$ et \vec{F}_{cC} exercées aux trois sommets du triangle ABC génèrent la même contrainte que les forces \vec{K}_A, \vec{K}_B et \vec{K}_C .

Le passage des forces \vec{K}_A, \vec{K}_B et \vec{K}_C exercées au milieu des segments BC, CA et AB aux forces $\vec{F}_{cA}, \vec{F}_{cB}$ et \vec{F}_{cC} exercées aux sommets du triangle se fait de la même manière que dans le cas de l'extension pure. Il s'agit de remplacer la force \vec{K}_A par deux forces $\vec{K}_A/2$ exercées en chacun des sommets B et C. Les forces équivalentes exercées aux sommets A, B et C sont :

$$\begin{aligned}\vec{F}_{cA} &= \frac{\vec{K}_B + \vec{K}_C}{2} = -\frac{\vec{K}_A}{2} \\ \vec{F}_{cB} &= \frac{\vec{K}_C + \vec{K}_A}{2} = -\frac{\vec{K}_B}{2} \\ \vec{F}_{cC} &= \frac{\vec{K}_A + \vec{K}_B}{2} = -\frac{\vec{K}_C}{2}.\end{aligned}$$

La deuxième partie de l'égalité vient de l'équilibre du squelette : $\vec{K}_A + \vec{K}_B + \vec{K}_C = \vec{0}$.

La norme de ces trois forces est :

$$\sigma_c = 2 \frac{F_{cA}}{BC} = 2 \frac{F_{cB}}{CA} = 2 \frac{F_{cC}}{AB} \quad (\text{Eq. A.3})$$

L'orientation des forces \vec{F}_{cA} , \vec{F}_{cB} et \vec{F}_{cC} est telle que les angles $(\vec{F}_{cA}, \vec{F}_{cB})$ et (CA, CB) sont égaux. Les mêmes égalités existent pour les permutations circulaires. Ceci signifie que les trois forces sont concourantes en un point du cercle circonscrit au triangle ABC. Le détail de cette démonstration est présenté en annexe D de ce chapitre.

Il est possible de décomposer les forces de cisaillement pur en les projetant sur les normales aux côtés adjacents au point d'application de la force. Par exemple au sommet A, la force \vec{F}_{cA} est projetée sur les normales \vec{n}_B et \vec{n}_C aux cotés AC et AB respectivement (cf. Figure 4.10, B). Nous obtenons :

$$\begin{cases} \vec{F}_{cA} = \vec{F}_{cAC} + \vec{F}_{cAB} \\ \vec{F}_{cB} = \vec{F}_{cBA} + \vec{F}_{cBC} \\ \vec{F}_{cC} = \vec{F}_{cCB} + \vec{F}_{cCA} \end{cases}$$

En utilisant la condition d'équilibre $\vec{F}_{cA} + \vec{F}_{cB} + \vec{F}_{cC} = \vec{0}$, l'égalité des angles (\vec{n}_A, \vec{e}_X) et (\vec{e}_X, \vec{K}_A) (cf. Annexe E) et les deux autres relations obtenues par permutations circulaires, il est possible de montrer que : $\vec{F}_{cAC} = -\vec{F}_{cCA}$, $\vec{F}_{cAB} = -\vec{F}_{cBA}$ et $\vec{F}_{cBC} = -\vec{F}_{cCB}$.

En conclusion, les forces \vec{F}_{cA} , \vec{F}_{cB} et \vec{F}_{cC} génèrent une contrainte de cisaillement pur sur le triangle ABC. Leurs orientations sont telles qu'elles sont concourantes en un point du cercle circonscrit au triangle ABC et leurs normes sont données par l'équation A.3.

Annexe D : les forces générant un cisaillement pur sont concourantes en un point du cercle circonscrit au triangle ABC

Le milieu élastique plan délimité par le triangle ABC est soumis à trois forces \vec{F}_{cA} , \vec{F}_{cB} et \vec{F}_{cC} concourantes en un point du cercle circonscrit au triangle ABC et dont la

somme est nulle. Nous allons montrer que ces trois forces génèrent une contrainte de cisaillement pur et nous admettrons que la réciproque est vraie

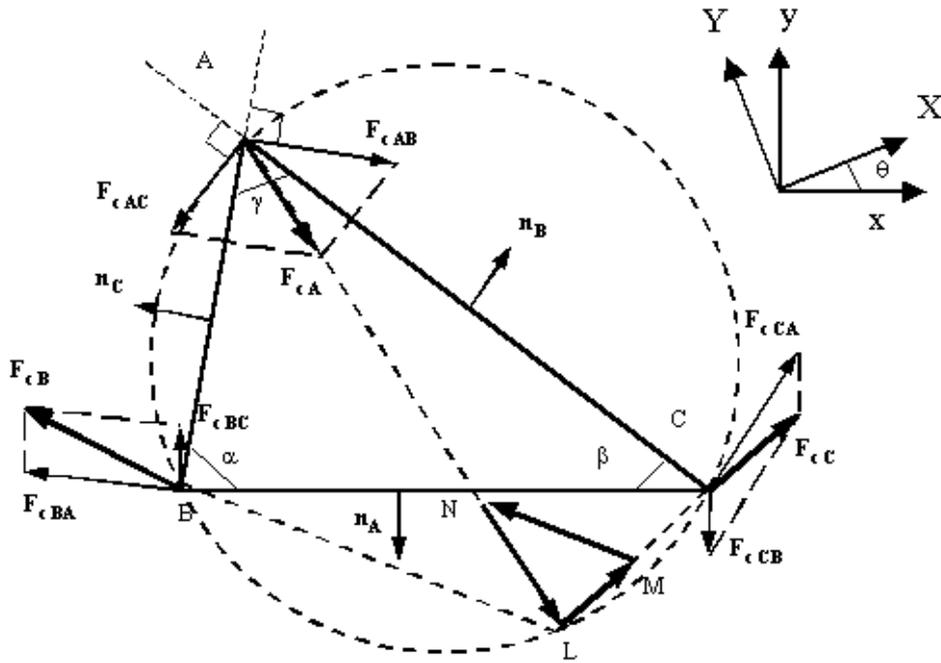


Figure 4.11 : Les trois forces sont concourantes en un point L du cercle et leur somme est nulle. Elles génèrent alors une contrainte de cisaillement pur.

Remarquons pour commencer que les triangles ABC et LMN sont similaires (cf. Figure 4.12). En effet, les angles $(\vec{F}_{cA}, \vec{F}_{cC})$ et (AB, BC) sont égaux puisqu'ils interceptent le même arc de cercle. Ceci est également vrai pour les deux autres angles.

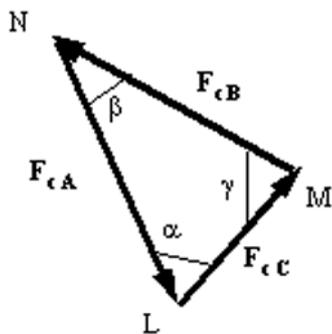


Figure 4.12 : Les triangles LMN et ABC sont similaires.

Nous avons donc la relation entre les normes des forces :

$$\frac{F_{cA}}{BC} = \frac{F_{cB}}{AC} = \frac{F_{cC}}{AB}.$$

Projetons les forces \vec{F}_{cA} , \vec{F}_{cB} et \vec{F}_{cC} sur les normales à chaque côté, afin d'obtenir les forces \vec{K}_A , \vec{K}_B et \vec{K}_C . Le processus de décomposition des forces \vec{F}_{cA} , \vec{F}_{cB} et \vec{F}_{cC} est décrit dans l'Annexe C de ce chapitre. Par construction, nous avons :

$$\vec{F}_{cB} = \frac{\vec{K}_A + \vec{K}_C}{2} = \frac{1}{2} ([\sigma] \cdot \vec{n}_A \text{ BC} + [\sigma] \cdot \vec{n}_C \text{ AB}) = -\frac{[\sigma]}{2} \cdot \vec{n}_B \text{ AC} = -\frac{1}{2} \vec{K}_B,$$

et de la même manière : $\vec{F}_{cA} = -\frac{1}{2} \vec{K}_A$, $\vec{F}_{cC} = -\frac{1}{2} \vec{K}_C$. Et donc $\frac{K_A}{BC} = \frac{K_B}{AC} = \frac{K_C}{AB}$.

Calculons maintenant le tenseur des contraintes générées par le triplet de forces \vec{K}_A , \vec{K}_B et \vec{K}_C . Pour cela, déterminons la direction de \vec{K}_B :

Posons $(\vec{e}_x, \vec{K}_A) = \phi$. L'angle (\vec{e}_x, \vec{K}_B) vaut (cf. Figures 4.13) :

$$(\vec{e}_x, \vec{K}_B) = (\vec{e}_x, \vec{K}_A) + (\vec{K}_A, \vec{K}_B) = \phi + (-\pi + \beta) = \phi + \beta - \pi.$$

$$\text{Il vient : } \vec{K}_B = AC \sigma_C \begin{bmatrix} \cos(\phi + \beta - \pi) \\ \sin(\phi + \beta - \pi) \end{bmatrix} = AC \sigma_C \begin{bmatrix} -\cos(\phi + \beta) \\ -\sin(\phi + \beta) \end{bmatrix}.$$

$$\text{Et } \vec{K}_B = AC [\sigma] \cdot \vec{n}_B \text{ avec } (\vec{e}_x, \vec{n}_B) = \frac{\pi}{2} - \beta \text{ et donc } \vec{n}_B = \begin{pmatrix} \cos(\frac{\pi}{2} - \beta) \\ \sin(\frac{\pi}{2} - \beta) \end{pmatrix}.$$

En décomposant $\cos(\phi + \beta)$ et $\sin(\phi + \beta)$, puis en identifiant chacun des termes, nous obtenons le tenseur des contraintes dans la base (\vec{e}_x, \vec{e}_y) :

$$[\sigma]_{xy} = \sigma_C \begin{bmatrix} \sin \phi & -\cos \phi \\ -\cos \phi & -\sin \phi \end{bmatrix}.$$

Nous avons $\sigma_{xx} = -\sigma_{yy}$, ce qui correspond à une contrainte de cisaillement pur. Trois forces concourantes en un point du cercle circonscrit à ABC et dont la somme est nulle génèrent une contrainte de cisaillement pur.

Annexe E : Direction du repère principal

Dans le repère principal (\vec{e}_X, \vec{e}_Y) , le tenseur des contraintes de cisaillement pur est diagonal. Nous allons montrer que les angles (\vec{n}_A, \vec{e}_X) et (\vec{e}_X, \vec{K}_A) sont égaux. Ainsi que les angles (\vec{n}_B, \vec{e}_X) et (\vec{e}_X, \vec{K}_B) ou encore (\vec{n}_C, \vec{e}_X) et (\vec{e}_X, \vec{K}_C) .

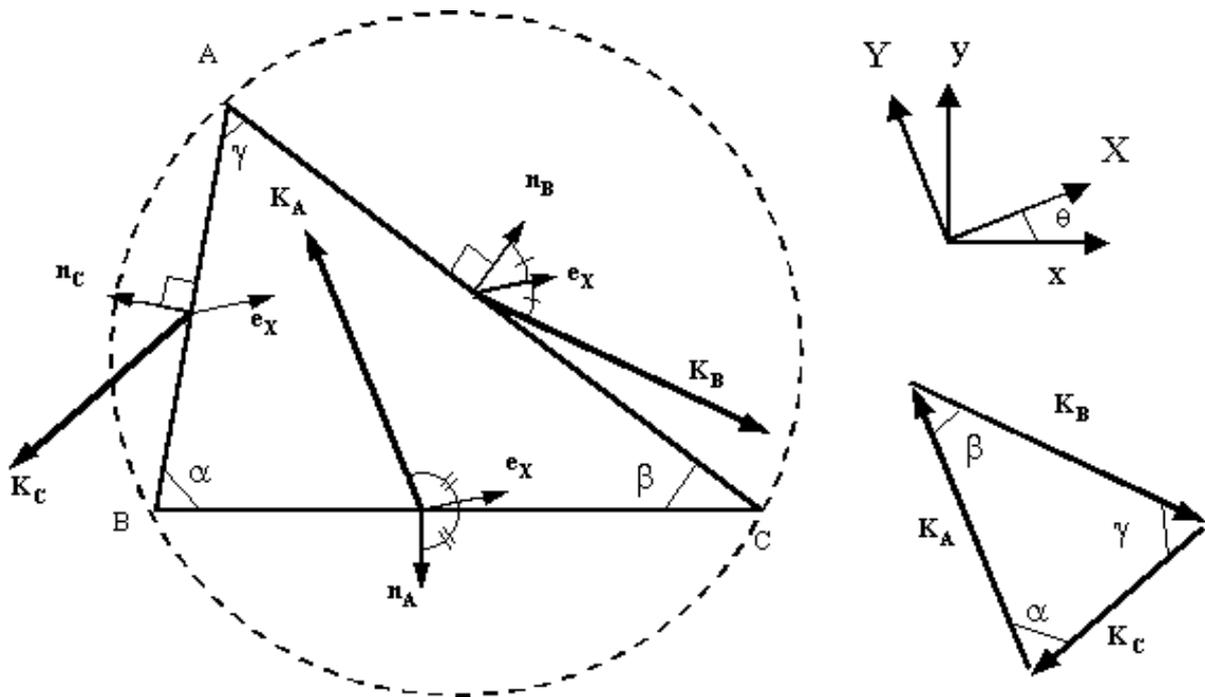


Figure 4.13 : Dans le cas du cisaillement pur, nous devons définir l'angle du repère principal (X, Y) par rapport au repère (x, y) .

Pour déterminer l'angle θ du repère principal (cf. Figure 4.13), nous allons déterminer le tenseur des contraintes de cisaillement pur dans le repère (x, y) , puis le diagonaliser afin d'obtenir l'angle θ du nouveau repère (X, Y) où le tenseur est diagonal.

Comme nous l'avons vu en Annexe D, le calcul de \vec{K}_B permet de définir le tenseur des contraintes de cisaillement pur dans le repère (x, y) :

$$[\sigma]_{xy} = \sigma_c \begin{bmatrix} \sin \phi & -\cos \phi \\ -\cos \phi & -\sin \phi \end{bmatrix}.$$

Soit $[\sigma]_{XY}$ le tenseur des contraintes de cisaillement dans le repère (X, Y) :

$$[\sigma]_{XY} = \sigma_c \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix}.$$

Déterminons $[\sigma]_{XY}$ dans le repère (x, y) : $[\sigma]_{xy} = P [\sigma]_{XY} P^{-1}$ avec $P = \begin{bmatrix} \cos \theta & -\sin \theta \\ \sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix}$

la matrice de passage et P^{-1} sa matrice inverse.

Nous obtenons :

$$[\sigma]_{xy} = \sigma_c \begin{bmatrix} \cos 2\theta & \sin 2\theta \\ \sin 2\theta & -\cos 2\theta \end{bmatrix}.$$

En identifiant à $[\sigma]_{xy} = \sigma_c \begin{bmatrix} \sin \phi & -\cos \phi \\ -\cos \phi & -\sin \phi \end{bmatrix} = \sigma_c \begin{bmatrix} \cos(\phi - \frac{\pi}{2}) & \sin(\phi - \frac{\pi}{2}) \\ \sin(\phi - \frac{\pi}{2}) & -\cos(\phi - \frac{\pi}{2}) \end{bmatrix}$, nous en

déduisons l'angle que fait le repère principal avec le repère (x, y) : $\theta = \frac{\phi}{2} - \frac{\pi}{4}$.

$$\text{Or, } (\vec{n}_A, \vec{K}_A) = (\vec{n}_A, \vec{e}_x) + (\vec{e}_x, \vec{K}_A) = \frac{\pi}{2} + \phi = 2 \left(\frac{\pi}{2} + \theta \right) \quad \text{et} \quad (\vec{n}_A, \vec{e}_x) = \frac{\pi}{2} + \theta = (\vec{e}_x, \vec{K}_A).$$

Les angles (\vec{n}_A, \vec{e}_x) et (\vec{e}_x, \vec{K}_A) sont égaux.

Annexe F : Silanisation des lentilles cylindriques

Une silanisation consiste à greffer des chaînes carbonées à la surface du verre. La première étape est un nettoyage minutieux de la surface du verre. La deuxième étape consiste en la silanisation à proprement parlée, après avoir permis la création du mince film d'eau à la surface des lentilles catalysant la réaction.

Nettoyage

Le nettoyage des lentilles commence en faisant agir un détergent (Decon 90) pendant 20 min à 60 °C dans la cuve à ultrasons. Ceci est suivi d'un premier rinçage à l'eau Millipore (10 MΩ.cm), puis d'un deuxième dans la cuve à ultrasons dans une solution d'eau avec 10 % en volume d'éthanol. Les lentilles sont rincées à l'eau Millipore.

Elles sont ensuite nettoyées par un mélange Piranha. Dans la cuve à ultrasons (afin d'éviter la formation de petites bulles sur les lentilles pendant la réaction), 2/3 d'acide sulfurique sont ajoutés à 1/3 d'eau oxygénée. Nous laissons agir le mélange pendant 10 minutes. Les lentilles sont minutieusement rincées à l'eau Millipore. Elles sont séchées avec tout le matériel de la silanisation dans l'étuve à 50° C pendant une heure.

Les lentilles sont ensuite placées sous ozone, dans une enceinte à haute teneur en dioxygène en présence d'une lampe à ultraviolet pendant une heure. L'objectif est d'oxyder toutes les matières organiques qui resteraient encore sur les lentilles. Après évacuation de

l'ozone, un petit bécher contenant de l'eau est introduit dans l'enceinte pendant ½ heure afin de favoriser la création d'un mince film d'eau.

Silanisation

La solution de silanisation est composée de 80 % d'hexadécane, de 12 % de tétrachlorométhane, de 8 % de chloroforme et de 2 mM d'octadecyltrichlorosilane. Pour 100 mL de solution, 80 µL de la solution d'octadecyltrichlorosilane (FW : 387.94 g/mol, densité de 0.984) sont ajoutés. Les lentilles sont maintenues dans cette solution pendant 1 heure 30 à 15°C. Un rinçage est ensuite effectué au chloroforme.

Annexe G : Marquage de la bicouche lipidique

La procédure de marquage est extraite de Discher *et al.* [1994]. La bicouche lipidique est rendue fluorescente en y insérant un lipide, le DiOC₁₈ (Molecular Probe). 3 µL d'une solution de DiOC₁₈ à 0.6 mg/µL dilué dans du méthanol sont laissés à l'air afin que le méthanol s'évapore. 5 µL d'une suspension de globules rouges compactés, pris directement du culot après centrifugation sont ensuite ajoutés. Après une incubation de 15 min à température ambiante, la suspension est diluée dans 0.992 mL de PBS puis rincée une fois par centrifugation.

Annexe H : Marquage de l'actine

La procédure de marquage de l'actine est extraite de Discher *et al.*, [1994]. La membrane des globules rouges est lysée par choc osmotique de manière réversible afin de permettre l'entrée de la rhodamine phalloïdine. La rhodamine est le groupe fluorescent et la phalloïdine, extrait de l'amanite du même nom, est un poison qui se fixe sur l'actine.

La rhodamine phalloïdine est conservée à -18°C dans du méthanol (échantillons de $2.5\ \mu\text{L}$ de $1\ \text{mg}/\mu\text{L}$ dans du MeOH). Un échantillon est laissé à l'air libre pour que le méthanol s'évapore. La rhodamine phalloïdine est alors dissoute dans $10\ \mu\text{L}$ d'une solution tampon hypotonique à 4°C ($10\ \text{mM}$ phosphate, $\text{pH}\ 7.4$). Le choc osmotique ainsi créé lyse la membrane de manière réversible et permet l'entrée du marqueur dans le globule rouge. $5\ \mu\text{L}$ de globules rouges compactés (prélevés directement après centrifugation) sont ensuite ajoutés et la suspension est incubée pendant $10\ \text{min}$ à 4°C . Cette suspension est ensuite amenée aux concentrations de $100\ \text{mM}$ de KCl et $1\ \text{mM}$ de MgCl_2 , puis maintenue à 37°C pendant $30\ \text{min}$. Ce procédé crée des fantômes ; les auteurs ont vérifié que le marquage ne modifie pas les propriétés élastiques de la membrane de manière notable.

Chapitre 5

Influence de la force ionique, du vieillissement et de l'ATP sur l'élasticité du squelette

Introduction

Nous présentons dans ce chapitre des expériences permettant la caractérisation des propriétés élastiques du squelette du globule rouge humain en fonction de l'osmolarité de la solution environnante et de la concentration en ATP de celle-ci ; nous avons également étudié le comportement élastique du squelette au cours du temps, après son extraction.

La spectrine est une protéine chargée au pH physiologique. Ses propriétés élastiques dépendent de la force ionique de la solution environnante. Nous avons donc réalisé trois séries de mesures complémentaires : à 100 mOsm/kg, à 150 mOsm/kg et à 300 mOsm/kg (la force ionique est respectivement de 80, 84 mM et 168 mM). Ces mesures sont effectuées suivant le même protocole expérimental que celles à 25 mOsm/kg décrites dans le chapitre 4. Nous avons ainsi mis en évidence une dépendance directe des modules élastiques en fonction de la force ionique du milieu environnant. Ces résultats sont décrits dans la première partie de ce chapitre.

Nous observons une grande dispersion sur les résultats. Afin de s'en affranchir, nous avons réalisé des mesures sur un même squelette, mais à deux osmolarités différentes : à 150

et à 25 mOsm/kg. Ces résultats, présentés en deuxième partie, appuient les conclusions obtenues en première partie.

Nous nous sommes également intéressé au comportement du squelette au cours du temps, après son extraction. Après la première série de mesures, le squelette est maintenu sous tension, et nous réalisons une deuxième série de mesures 10 ou 15 min après la première. Nous avons mis en évidence deux comportements différents suivant la force ionique du milieu dans lequel est faite la mesure. En milieu hypotonique, les modules élastiques décroissent progressivement et régulièrement jusqu'à la désagrégation du squelette. En milieu isotonique, les modules élastiques augmentent dans les dix minutes suivant la première série de mesures, puis se stabilisent.

La dernière partie de ce chapitre expose des résultats préliminaires obtenus à différentes concentrations en adénosine triphosphate (ATP). Le faible nombre de mesures ne permet pas de déduire des modules élastiques précis, mais nous avons noté deux phénomènes : un squelette extrait en milieu hypotonique avec ATP a pu être manipulé pendant plus de deux heures, alors que sans ATP, tous les squelettes étaient dénaturés au bout de 45 min au maximum. De plus, il apparaît que la présence d'ATP augmente la tension initiale du squelette.

1. Variation de la force ionique

1.1 Principe

Le principe de l'expérience est celui exposé au chapitre 4. Pour mémoire, un globule rouge avec trois billes est piégé, et sa bicouche lipidique est dissoute par injection d'une solution de triton X-100 dilué dans une solution tampon à l'osmolarité choisie pour la mesure.

Le détergent est ensuite rincé et l'osmolarité fixée par une injection de solution tampon. Le volume de la solution tampon injecté est approximativement égal à celui de la chambre d'écoulement.

Nous avons réalisé des séries de mesures dans trois solutions tampons différentes. Les mesures en milieu isotonique ont été réalisées dans une solution tampon PBS : 8.1 mM de Na_2HPO_4 , 1.5 mM de KH_2PO_4 , 2.7 mM de KCl et 137 mM de NaCl , pour un pH de 7.4 et une osmolarité de 300 mOsm/kg. Pour les mesures réalisées à 150 mOsm/kg, la solution tampon est obtenue en diluant deux fois une solution PBS avec de l'eau. Le pH est de 7.4. La solution tampon à 100 mOsm/kg est composée de 10 mM de K_2HPO_4 , de 10 mM de KH_2PO_4 et de 25 mM de NaCl pour un pH fixé à 7.4. L'osmolarité de chacune des solutions est mesurée à l'osmomètre.

Chacune des mesures présentées est réalisée 10 min après l'extraction du squelette, et est faite à température ambiante ($\sim 25^\circ\text{C}$). Chaque squelette est déformé de la même manière que pour les déformations à 25 mOsm/kg, à savoir par trois cycles de déformations successifs.

1.2 Résultats

1.2.1 Mesures à 100 mOsm/kg

Nous présentons ici les résultats obtenus à 100 mOsm/kg. Cette série de mesures présente les mêmes caractéristiques que celle à 25 mOsm/kg décrites au chapitre 4.

Pour chaque déformation, nous traçons la contrainte d'extension en fonction de la variation de surface relative ainsi que la contrainte de cisaillement pur en fonction de la déformation de cisaillement. Dans chaque cas, une relation linéaire est observée et la pente donne le module élastique.

La figure 5.1 présente les histogrammes des mesures du module d'extension et du module de cisaillement. Ces mesures ont été réalisées sur 7 squelettes, et ont permis d'obtenir 20 mesures donnant le module d'extension et 18 le module de cisaillement. La valeur moyenne du module d'extension est $7.5 \pm 6.3 \mu\text{N/m}$ et celle du module de cisaillement est de $3.6 \pm 1.6 \mu\text{N/m}$. Le module de cisaillement varie de 2.8 à 16.6 $\mu\text{N/m}$ et le module de cisaillement de 1.6 à 7.4 $\mu\text{N/m}$. Chacun des histogrammes présente deux maxima. Afin de tenir compte du nombre de feuillets du squelette déformé, nous lissons ces données par une somme de deux gaussiennes, la moyenne de la deuxième gaussienne étant fixée au double de la première. Nous en déduisons ainsi le module d'extension et le module de cisaillement pour un seul feuillet : $K_C = 7.1 \pm 4.8 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 2.4 \pm 1.0 \mu\text{N/m}$.

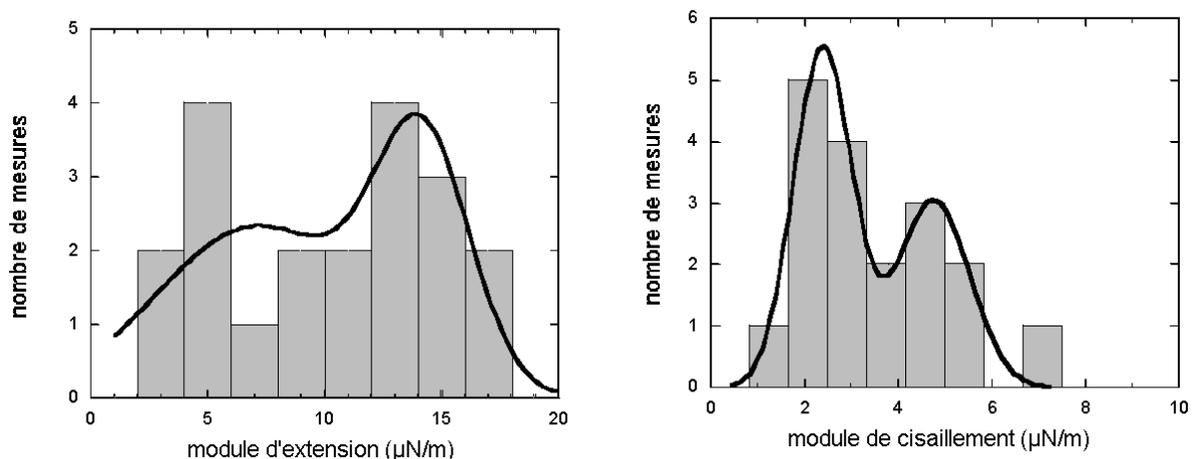


Figure 5.1 : histogrammes (A) du module d'extension et (B) du module de cisaillement à 100 mOsm/kg avec lissage par une double gaussienne.

La figure 5.2 présente l'histogramme du rapport du module d'extension sur le module de cisaillement. Quinze déformations ont permis de mesurer simultanément les deux modules. Le rapport varie de 0.9 à 4.6. L'histogramme présente un seul maximum et nous lissons les données par une seule gaussienne. La moyenne ainsi mesurée est $K_C/\mu_C = 2.9 \pm 1.8$.

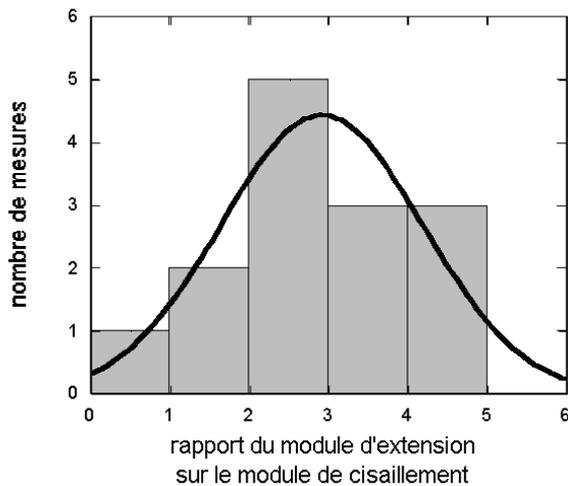


Figure 5.2 : histogramme du rapport K_C/μ_C à 100 mOsm/kg avec lissage par une simple gaussienne.

Les mesures à 100 mOsm/kg présentent deux problèmes. Les deux maxima de l’histogramme des modules d’extension ne sont pas dans un rapport 2:1. Ceci a pour conséquence un écart type important dans la mesure de K_C . Le deuxième résultat surprenant est la valeur du rapport K_C/μ_C , très proche de 3. Nous pensons que cela est une conséquence du faible nombre de mesures réalisées à cette osmolarité.

1.2.2 Mesures à 150 mOsm/kg

Cette série présente les mêmes caractéristiques qu’à 25 mOsm/kg. La figure 5.3 présente les histogrammes des modules d’extension et de cisaillement portant sur 11 squelettes. Le module d’extension a pu être mesuré sur 27 des déformations réalisées et celui de cisaillement sur 38. La dispersion est importante : le module d’extension varie de 4.6 à 28.8 $\mu\text{N/m}$ et celui de cisaillement de 3.6 à 18.3 $\mu\text{N/m}$. La valeur moyenne de ces mesures est $K_C = 15.7 \pm 6.0 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 8.3 \pm 3.9 \mu\text{N/m}$. Les histogrammes présentent chacun deux maxima, et un lissage par une double gaussienne permet d’en déduire les modules élastiques d’un seul feuillet. Nous avons mesuré $K_C = 9.7 \pm 3.4 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 5.7 \pm 2.3 \mu\text{N/m}$.

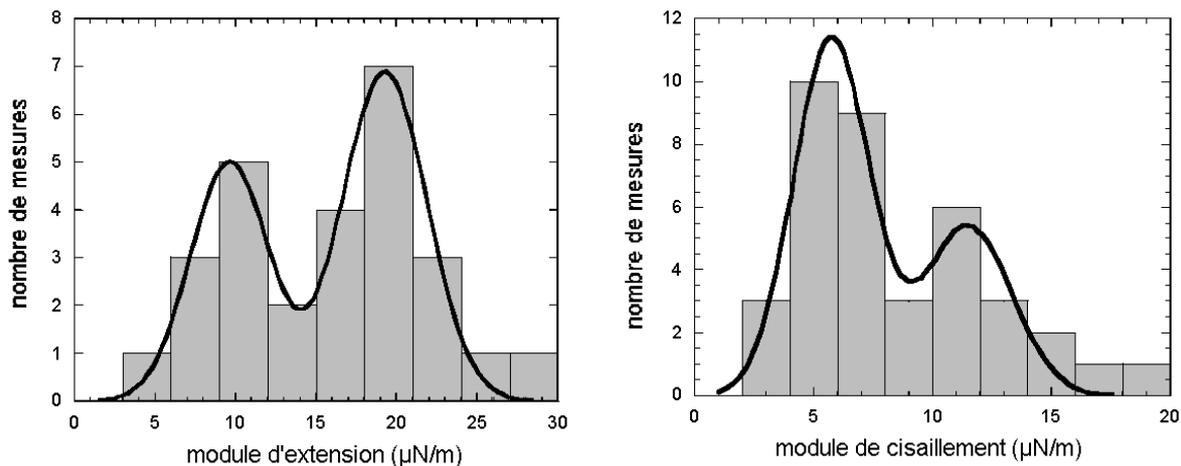


Figure 5.3 : histogrammes (A) du module d'extension et (B) du module de cisaillement à 150 mOsm/kg avec lissage par une double gaussienne.

La figure 5.4 présente l'histogramme des rapports K_C/μ_C ; 22 mesures ont permis la mesure simultanée des deux modules élastiques. Les valeurs varient de 0.8 à 3.4, et l'histogramme ne présente qu'un seul maximum. La valeur moyenne est de $K_C/\mu_C = 2.0 \pm 1.3$.

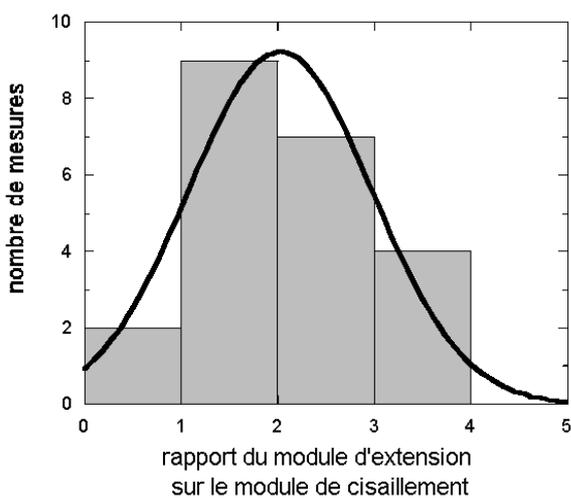


Figure 5.4 : histogramme du rapport K_C/μ_C à 150 mOsm/kg avec lissage par une simple gaussienne.

1.2.3 Mesures à 300 mOsm/kg

La figure 5.5 présente les deux histogrammes des mesures effectuées en milieu isotonique. Ces mesures ont porté sur 7 squelettes, 44 déformations ont permis la mesure de K_C et 35 celle de μ_C . La valeur moyenne de K_C est $22.6 \pm 4.5 \mu\text{N/m}$ et celle de $\langle \mu_C \rangle = 7.9 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$. Les histogrammes ne présentent pas clairement deux maxima, et il est difficile d'en déduire les modules élastiques pour un seul feuillet. Il est probable qu'à cette force ionique, les filaments de spectrine créent des points d'adhésion entre eux. En effet, les forces répulsives électrostatiques entre filaments de spectrine sont écrantées par les charges du milieu environnant, ce qui favorise leur adhésion par des forces de Van der Waals. Il est probable que la topologie du squelette n'est pas conservée : le réseau ne doit plus être triangulaire. Il est aussi possible que le squelette forme une structure tridimensionnelle.

Afin d'obtenir une valeur approximative des modules élastiques pour un seul feuillet, nous avons lissé ces mesures par une seule gaussienne. Nous mesurons alors $K_C = 21.3 \pm 10.5 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 6.7 \pm 3.0 \mu\text{N/m}$. En émettant l'hypothèse que les deux feuillets sont parfaitement collés l'un à l'autre, avec une densité de points d'attache du même ordre de grandeur que la densité de sommets dans le réseau du squelette, la valeur mesurée correspond alors au cas où deux feuillets sont simultanément déformés. Nous en déduisons ainsi des valeurs approximatives pour un seul feuillet : $K_C = 10.7 \pm 5.3 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 3.4 \pm 1.5 \mu\text{N/m}$. Ces valeurs ne donnent qu'une approximation grossière car la contrainte n'est probablement pas répartie uniformément entre les deux feuillets.

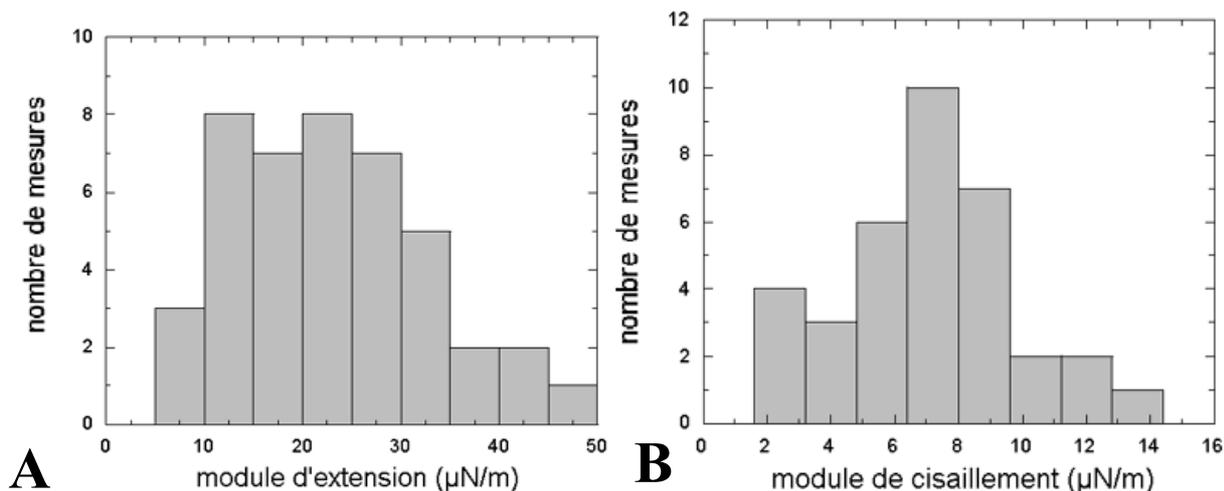


Figure 5.5 : histogrammes (A) du module d'extension et (B) du module de cisaillement à 300 mOsm/kg.

La figure 5.6 montre l'histogramme du rapport K_C/μ_C à 300 mOsm/kg. Le nombre de mesures ayant permis la mesure des deux modules simultanément est de 24. La valeur moyenne est de 3.0 ± 1.3 . Cette valeur est plus grande que celle attendue pour un réseau parfaitement triangulaire, qui doit être de l'ordre de deux (*cf.* Chapitre 1, § 3) [Kantor et Nelson, 1987 ; Boal *et al.*, 1993 ; Boal, 1994 ; Hansen *et al.*, 1996]. Comme nous l'avons déjà signalé, ceci peut être dû au fait qu'une force ionique élevée favorise l'adhésion des filaments de spectrine entre eux. Le squelette à cette force ionique ne doit plus être parfaitement triangulaire. Il est également possible qu'il adopte, du moins partiellement, une structure tridimensionnelle.

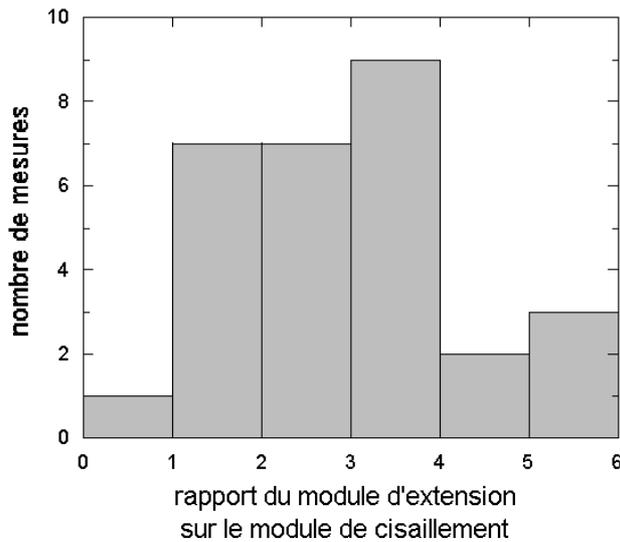


Figure 5.6 : histogramme du rapport K_C/μ_C à 300 mOsm/kg.

1.3 Discussion

Influence de la force ionique sur les modules élastiques

La figure 5.7 présente la variation des modules élastiques en fonction de l'osmolarité (*i. e.* la force ionique). Nous y avons ajouté les mesures à 25 mOsm/kg présentées au chapitre 4. Cette figure met en évidence une dépendance directe des modules élastiques en fonction de la force ionique. Comme nous l'avons précisé, les valeurs à 300 mOsm/kg sont entachées d'une grande incertitude de par l'adhésion des filaments de spectrine entre eux. En revanche, nous observons globalement une augmentation avec la force ionique pour les modules élastiques en milieu hypotonique. Si de plus, nous représentons cette dépendance par une loi linéaire, nous obtenons :

$$K_C(\text{Osm}) = 3.86 + 0.038 \times \text{Osm}$$

$$\mu_C(\text{Osm}) = 1.27 + 0.024 \times \text{Osm},$$

avec Osm l'osmolarité du milieu environnant en mOsm/kg. En supposant que l'on puisse extrapoler la valeur des modules élastiques à 300 mOsm/kg, nous trouvons :

$K_C(300 \text{ mOsm/kg}) = 15.4 \text{ } \mu\text{N/m}$ et $\mu_C(300 \text{ mOsm/kg}) = 8.6 \text{ } \mu\text{N/m}$. Ces valeurs sont en bon accord avec celles obtenues par simulations numériques sur un réseau bidimensionnel de ressorts entropiques [Boal, 1994] : $K_C = 17 \pm 2 \text{ } \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 10 \pm 2 \text{ } \mu\text{N/m}$. Pour obtenir ces résultats, l'auteur a introduit dans son modèle la température ($T = 300 \text{ K}$), la longueur de contour des filaments de spectrine ($L = 200 \text{ nm}$) et l'aire du squelette en fonction du nombre de complexes de jonction.

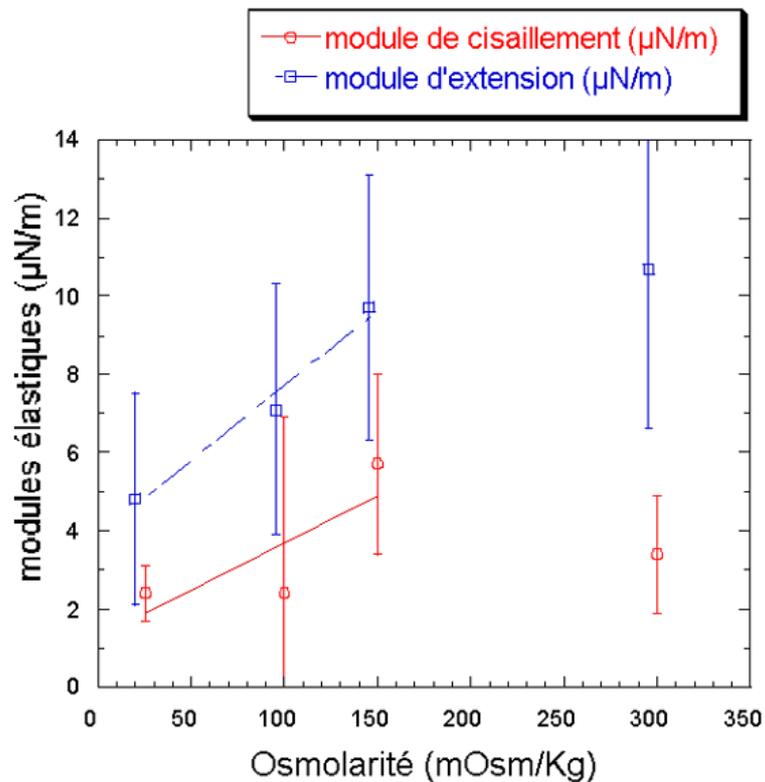


Figure 5.7 : bilan des modules élastiques en fonction de l'osmolarité (les couples K_C et μ_C sont pris à la même osmolarité (25, 100, 150 et 300 mOsm/kg), ils apparaissent décalés pour une meilleur lisibilité).

Longueur de persistance

Nous pouvons déduire de ces mesures les valeurs de la longueur de persistance d'un filament de spectrine en fonction de l'osmolarité. Comme décrit au chapitre 4, la longueur de

persistance ξ d'un filament de spectrine est directement reliée aux modules élastiques dans le cas où le squelette est considéré comme un réseau bidimensionnel triangulaire parfait de ressorts entropiques et en utilisant le modèle du ver [Marko et Siggia, 1995] :

$$K_C = 2 \mu_c = \frac{3 \sqrt{3} k_B T}{4 \xi L},$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température absolue (~ 300 K dans nos expériences), ξ la longueur de persistance et L la longueur de contour d'un filament de spectrine.

La figure 5.8 montre la dépendance de la longueur de persistance en fonction de l'osmolarité et de la force ionique du milieu environnant. La longueur de persistance est calculée à partir du module d'extension.

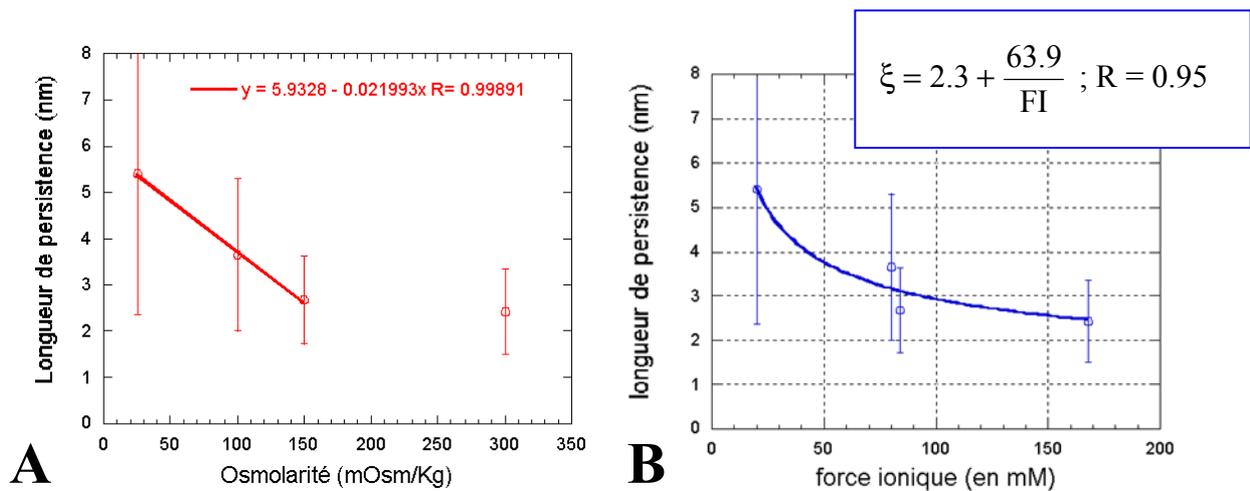


Figure 5.8 : Longueur de persistance en fonction (A) de l'osmolarité et (B) de la force ionique.

La longueur de persistance totale ξ d'un polyélectrolyte est la somme d'une longueur de persistance électrostatique l_{OSF} – qui dépend de la concentration en ions – et d'une longueur l_0 due aux contraintes stériques [Odijk, 1977 ; Skolnick et Fixman, 1977]. La longueur l_{OSF} dépend de la force ionique de la solution, à cause de l'écrantage des charges de

la spectrine par les contre-ions, tandis que l_0 reste constant. Dans ce modèle, le polymère porte des charges séparées par une distance A . L'interaction entre deux charges est donné par : $v(r) = k_B T (l_B/r) \exp[-\kappa r]$ où l_B est la longueur de Bjerrum et κ est l'inverse de la longueur de Debye. Cette dernière dépend de la force ionique FI de la solution et est donné par la relation de Debye-Hückel : $\kappa^2 = 4\pi l_B FI$. La longueur de persistance électrostatique est alors donnée par : $l_{OSF} = l_B/(4\kappa^2 A^2)$ [Barrat et Joanny, 1993]. La longueur de persistance ξ doit alors se comporter comme : $\xi = l_0 + \frac{C^{te}}{FI}$.

Nous avons lissé la figure 5.8, B) par une telle loi. L'accord est correcte, bien que le nombre de points est faible et l'erreur sur chacun de ces points grande. Notons toutefois que la valeur de $l_0 = 2.3$ nm mesurée est relativement proche de celle estimée par Svoboda *et al.* [1992] à environ 3 nm.

Comparaison des modules μ et μ_C

Le module de cisaillement μ de la membrane mesuré par pince optique à 300 mOsm/kg est égal à 2.5 ± 0.4 $\mu\text{N/m}$. Le module de cisaillement du squelette à cette même osmolarité semble voisin de 10 $\mu\text{N/m}$. Ces deux valeurs sont du même ordre de grandeur.

Comment pouvons nous expliquer la différence entre ces deux valeurs ? Autrement dit, quelle est la différence entre un squelette libre et un squelette attaché à la bicouche lipidique ? Pour le squelette libre, les filaments de spectrine sont libres de fluctuer dans la troisième dimension. En revanche, la bicouche lipidique a deux effets sur les fluctuations de la spectrine. Le premier est de limiter, de par sa présence, les fluctuations à un demi-espace. Le deuxième effet est dû aux points d'attache du squelette aux protéines transmembranaires.

Nous avons vu (*cf.* Chapitre 1, § 2.3) que les complexes de jonction ainsi que les filaments de spectrine sont liés à certaines protéines transmembranaires.

La bicouche lipidique a donc pour effet de limiter les fluctuations de la spectrine, et ainsi de modifier les modules élastiques. Les fluctuations de la spectrines sont réduites par la membrane.

Influence de la bicouche lipidique sur les fluctuations de la spectrine

Nous avons observé lors de la dissolution de la bicouche lipidique en milieu isotonique que la tension dans le squelette augmente. Ceci se traduit par le fait que les billes se rapprochent les unes des autres dans les secondes qui suivent la dissolution de la bicouche. Lorsque la bicouche est dissoute, les liaisons spectrine-bicouche n'existent plus et les filaments sont alors libres de fluctuer à trois dimensions. Ceci appuie l'idée que la spectrine se comporte comme un polymère flexible.

En revanche, en milieu hypotonique, le squelette s'étend légèrement lors de la dissolution de la bicouche. L'effet de l'augmentation des fluctuations est contrebalancé par l'augmentation de la longueur de persistance.

2. Variation de l'osmolarité sur un même squelette

Les résultats obtenus par la méthode précédente présentent une grande dispersion, et des valeurs fiables ne peuvent être obtenues qu'en réalisant des statistiques sur un grand nombre de données. Afin de s'affranchir de cette contrainte, nous avons aussi réalisé des mesures sur un même squelette en faisant varier l'osmolarité.

2.1 Principe

Un globule rouge avec trois billes est piégé, la bicouche lipidique est dissoute par une solution de Triton X-100 diluée dans une solution tampon à 150 mOsm/kg. Le détergent est rincé et l'osmolarité fixée à 150 mOsm/kg. Nous procédons ensuite à la mesure des modules élastiques par la méthode décrite au chapitre 4.

Après cela, nous modulons la position de deux des trois pièges avec un signal sinusoïdal à basse fréquence (0.5 Hz) à l'aide d'un générateur de fonctions. L'amplitude des déplacements des deux pièges est de l'ordre de vingt pour-cent de leur écartement total, soit $\sim 1 \mu\text{m}$. Le squelette est alors soumis à des déformations variables périodiques, et nous enregistrons les déformations à l'aide du magnétoscope S-VHS.

L'enregistrement commence tandis que le squelette est dans un milieu à 150 mOsm/kg. Nous injectons lentement une solution tampon à 25 mOsm/kg tout en modulant la position des pièges. Après 5 à 10 min d'injection de la solution tampon à 25 mOsm/kg, nous ré-injectons la solution tampon à 150 mOsm/kg pour revenir à la concentration initiale. À la fin de la manipulation, nous enregistrons la position des pièges en fonction du temps.

L'exploitation des résultats se fait à l'aide d'un ordinateur équipé d'une carte d'acquisition numérique permettant l'acquisition de 25 images par seconde. L'acquisition des films se fait par séquences de deux secondes ; les séquences sont espacées d'une minute. Les séquences acquises sont ensuite découpées en succession d'images à l'aide du logiciel Premiere (Adobe), puis chaque image est redimensionnée par Photoshop (Adobe). Le même traitement est fait sur le film donnant la position des pièges. Le logiciel KaleidaGraph est ensuite utilisé pour déterminer l'aire du triangle ayant comme sommet chacun des centres des billes. L'exploitation des résultats se fait sur les deux images d'aires minimale et maximale

qui sont les deux images où la position des pièges est connue avec la plus grande précision. Le fait de n'utiliser que deux images ne permet pas de déduire le module de cisaillement, pour lequel l'erreur sur la détermination de l'orientation du repère principal est trop importante. Nous ne mesurons donc que K_C . L'erreur sur chaque mesure est estimée à 20 %.

2.2 Résultats et discussion

Comportement qualitatif du squelette

Pendant l'injection de la solution tampon à 25 mOsm/kg, le squelette se détend au fur et à mesure que l'osmolarité est abaissée et l'amplitude de déplacement des billes est plus grande. Ceci signifie que la raideur du squelette diminue. Lorsque nous réinjectons la solution à 150 mOsm/kg, la raideur augmente et l'amplitude des déplacements des billes diminue.

Mesure des modules élastiques sur un squelette

La figure 5.9 présente la variation du module d'extension K_C au cours du temps. La première flèche correspond au début de l'injection de la solution tampon à 25 mOsm/kg, la deuxième à celle de 150 mOsm/kg. Le graphe présente trois palliés distincts : le premier jusqu'à $t = 190$ s, le deuxième pour $300 < t < 420$ s, et le dernier au-delà de $t = 480$ s. Ceci correspond aux valeurs du module d'extension aux trois osmolarités. Le module d'extension K_C à 150 mOsm/kg est égal à $13.8 \pm 0.8 \mu\text{N/m}$. À 25 mOsm/kg, il vaut $K_C = 4.4 \pm 0.5 \mu\text{N/m}$ et après le retour à 150 mOsm/kg, $K_C = 8.0 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$.

Ceci est la preuve directe de la dépendance des modules élastiques – et donc de la raideur de la spectrine – en fonction de l'osmolarité de la solution environnante.

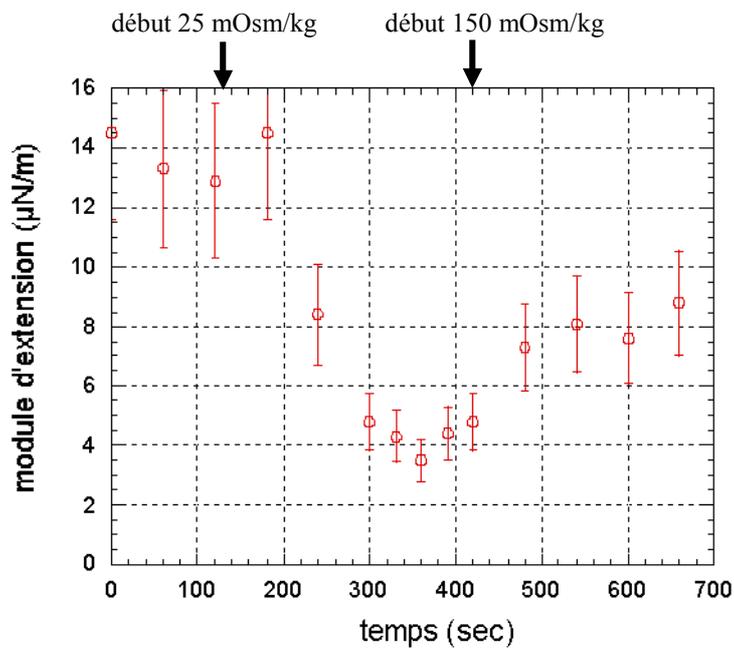


Figure 5.9: Variation du module d'extension sur un squelette dont l'osmolarité du milieu environnant est abaissée à 25 mOsm/kg, puis ramenée à 150 mOsm/kg.

Ensemble des mesures

Nous avons réalisé cette expérience sur 6 squelettes différents (*cf.* Table 6.1). Les deux modules d'extension K_C et K_C' à 150 mOsm/kg ont été mesurés par la méthode décrite au chapitre 4, et ceci afin d'avoir une moindre erreur. La mesure à 25 mOsm/kg est réalisée par la méthode décrite ci-dessus, juste avant le début de l'injection de la solution tampon à 150 mOsm/kg.

Les valeurs trouvées pour le module d'extension sont compatibles avec celles mesurées précédemment (*cf.* Chapitre 5, § 1). Ceci montre que le protocole expérimental ne modifie pas l'élasticité du squelette.

squelettes	K_C à 150 mOsm/kg	K_C à 25 mOsm/kg	K'_C à 150 mOsm/kg
1	15.2 ± 5.4	5.3 ± 1.4	bille détachée
2	13.8 ± 0.8	4.4 ± 0.7	8.0 ± 0.7
3	9.0 ± 3.3	4.5 ± 0.4	∅
4	27.9 ± 2.4	16.4 ± 3.3	19.2 ± 5.9
5	26.4 ± 3.3	17.5 ± 0.6	∅
6	10.6 ± 1.8	3.6 ± 0.8	∅
moyennes	17.1 ± 8.1	8.6 ± 6.5	13.6 ± 7.9

Table 5.1 : Bilan sur 6 squelettes des mesures du module d'extension en faisant varier l'osmolarité.

La deuxième mesure à 150 mOsm/kg n'a pas toujours été possible. Il est arrivé que le squelette s'échappe au cours de l'expérience. La mesure a quelquefois été rendue impossible parce que la tension du squelette devenait importante pendant la remontée à 150 mOsm/kg. Ceci avait pour conséquence une variation relative de surface très faible (~1 ou 2 %), et donc une incertitude sur la mesure importante. La portion de squelette collée à la bille augmente lors de la descente à 25 mOsm/kg, ce qui réduit l'aire du squelette entre les trois billes et donc augmente la tension lors de la remontée à 150 mOsm/kg.

Nous constatons que le passage de 150 à 25 mOsm/kg entraîne une diminution du module d'extension de l'ordre de 50 %. Le module d'extension revient à environ 80 % de sa valeur initiale. Cette différence s'explique par la désagrégation du squelette qui a lieu au cours du temps, après son extraction (*cf.* partie suivante de ce chapitre).

3. Comportement au cours du temps

Nous nous intéressons dans cette partie au comportement élastique du squelette au cours du temps, après la dissolution de la bicouche lipidique.

3.1 Principe

Après la première série de mesures, le squelette est maintenu sous tension par les pinces optiques et une deuxième série de mesures est réalisée 15 min après la première. Dans un certain nombre de cas, nous avons réalisé une troisième série de mesures 15 min après la deuxième. Ces mesures ont été réalisées en milieu hypotonique à 25 mOsm/kg et en milieu isotonique.

3.2 Résultats et discussion

Les mesures obtenues aussi bien en milieu hypotonique qu'en milieu isotonique sont similaires à celle obtenues pendant la première série de mesures : nous observons une dépendance linéaire entre la contrainte et la déformation pour l'extension et pour le cisaillement pur.

Mesure en milieu hypotonique, 15 min après la première série de mesures

En milieu hypotonique (25 mOsm/kg), l'histogramme des modules d'extension porte sur 56 mesures, celui du cisaillement sur 38. Ils comportent tous les deux deux maxima et nous lisons les données par une somme de deux gaussiennes. Nous obtenons pour un seul feuillet : $K_C = 5.8 \pm 2.2 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 2.0 \pm 0.8 \mu\text{N/m}$. Le rapport des modules est $K_C/\mu_C = 1.7 \pm 1.0$ sur 33 déformations. Lors du premier cycle de déformations, nous avons mesuré $K_C = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$, $\mu_C = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$ et $K_C/\mu_C = 1.9 \pm 1.0$ (cf. Chapitre 4). Ceci

montre que les modifications survenues dans les 15 min après la première série de mesures ne sont pas significatives.

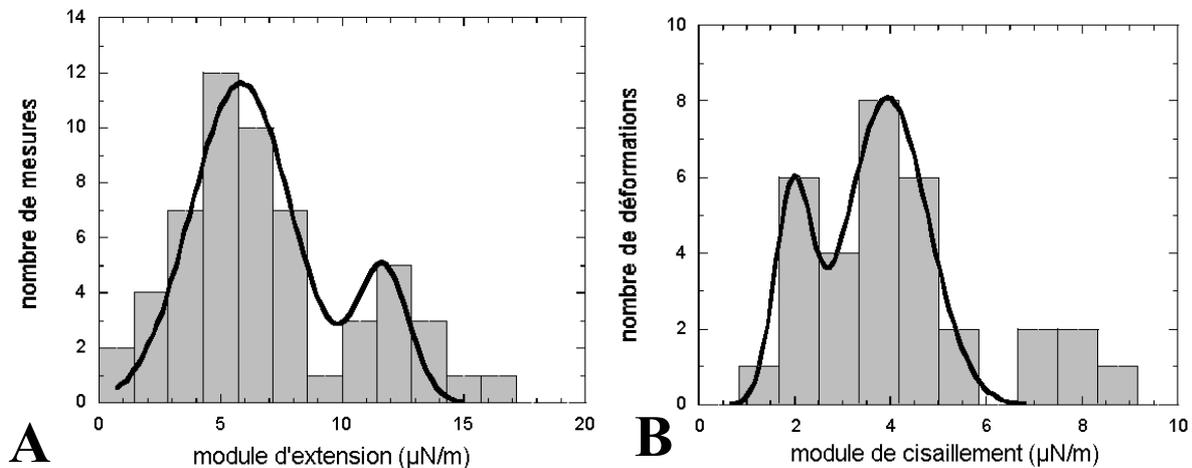


Figure 5.10 : Histogrammes en milieu hypotonique à 25 mOsm/kg des modules (A) d'extension et (B) de cisaillement.

Le comportement élastique au-delà de cette deuxième série de mesures est différent. Certaines mesures réalisées 30 min et même 45 min après la première série de mesures ont montré que le squelette devient de plus en plus souple au cours du temps. Nous avons mesuré un module d'extension de 1.5 $\mu\text{N/m}$ 30 min après la première série de mesures. Le squelette en milieu hypotonique ne peut plus être manipulé au-delà de 30-45 min après son extraction : la position des billes est alors confondue avec les pièges, et elles ne sont plus liées entre elles.

Il est fort probable que nous observons une désagrégation du squelette au cours du temps. Cette désagrégation intervient soit au niveau des complexes de jonction, soit au niveau de la spectrine. Il est également possible que les points d'attache du squelette sur les billes soient affectés.

Mesures en milieu isotonique, 15 min après la première série de mesures

La figure 5.11 présente les histogrammes des mesures obtenues en milieu isotonique. Lors de la deuxième série de mesures, 35 déformations ont donné un module d'extension et 20 un module de cisaillement. Nous avons mesuré un module d'extension de $16.2 \pm 5.6 \mu\text{N/m}$ et un module de cisaillement de $4.1 \pm 1.5 \mu\text{N/m}$. Le rapport K_C/μ_C est de 3.7 ± 1.8 , mesuré sur 18 déformations.

Nous avons mesuré en milieu hypotonique, lors de la première série de mesures, $K_C = 10.7 \pm 5.3 \mu\text{N/m}$, $\mu_C = 3.4 \pm 1.5 \mu\text{N/m}$ et $K_C/\mu_C = 3.0 \pm 1.3$ (*cf.* Chapitre 5, § 1). Les propriétés élastiques sont modifiées dans les 15 min qui suivent la première série de mesures. Nous observons en effet un accroissement en moyenne de 44 % pour le module d'extension et de 38 % pour le module de cisaillement. Il est fort probable que les filaments de spectrine créent des liaisons entre eux. Ce phénomène est dû à la forte osmolarité, qui écrante les répulsions électrostatiques entre filaments et favorise ainsi leur adhésion. Le squelette doit progressivement former une structure tridimensionnelle moins souple. Cette hypothèse est étayée par l'augmentation du rapport K_C/μ_C : sa valeur s'éloigne de 2, la structure du squelette n'est probablement plus bidimensionnelle triangulaire.

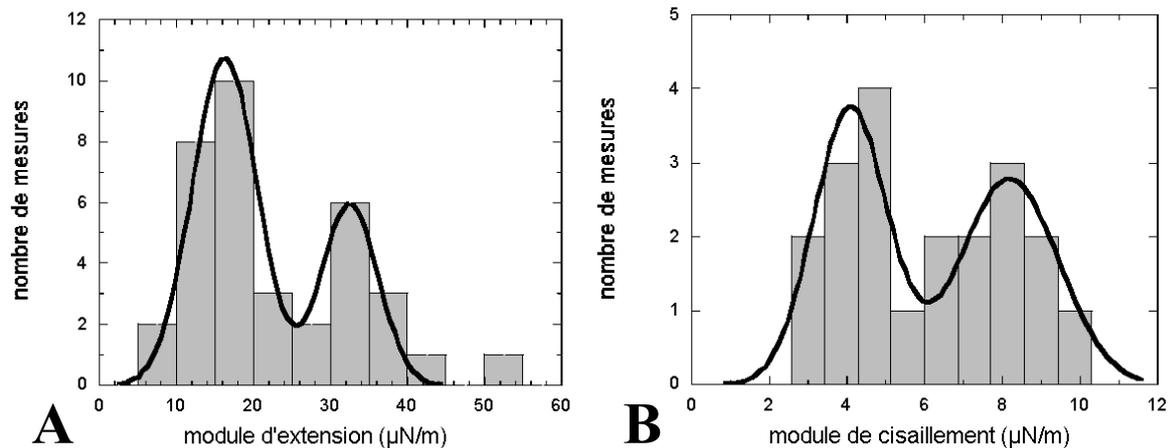


Figure 5.11 : Histogrammes en milieu isotonique des modules (A) d'extension et (B) de cisaillement.

Après cette deuxième série de mesures, nous n'avons plus observé de changement dans les propriétés élastiques du squelette, tant que celui-ci est maintenu sous tension. En revanche, si le squelette est relâché, les trois billes se rapprochent rapidement les unes des autres et il n'est alors plus possible de les séparer. Ceci est dû à l'effondrement du squelette causé par l'adhésion des brins de spectrine entre eux : preuve supplémentaire que les filaments de spectrine créent des liaisons entre eux à forte osmolarité, et que le squelette est susceptible d'avoir une structure tridimensionnelle en milieu isotonique.

4. Dépendance avec la concentration en ATP

Nous avons réalisé quelques expériences en milieu hypotonique à 25 mOsm/kg contenant 1 mM d'ATP (Sigma, A-7699). L'ATP ou adénosine triphosphate est la source d'énergie chimique directement utilisable par toute cellule.

4.1 Principe

Le principe des mesures est celui décrit au chapitre 4. Le seul changement est que la solution tampon hypotonique contient en plus 1 mM d'ATP. La faible concentration en ATP ne modifie pas l'osmolarité de la solution tampon de manière significative.

4.2 Résultats et discussion

Nous avons réalisé ce type de mesures sur seulement quatre squelettes. Le faible nombre de mesures fait qu'il n'est pas possible d'en déduire des valeurs précises pour les modules élastiques. Nous avons toutefois noté certaines modifications par rapport aux mesures sans ATP :

i) Après la dissolution de la bicouche lipidique, le squelette est sous tension, alors que ce n'était pas le cas dans la même solution tampon sans ATP. Nous devons alors réduire la tension en rapprochant les pièges les uns des autres avant de déformer le squelette.

ii) La stabilité du squelette au cours du temps semble être augmentée. Un squelette a été ainsi manipulé pendant près de deux heures, en effectuant une série de mesures toutes les 15 min. La table 6.2 présente la valeur moyenne du module d'extension mesuré en fonction du temps. Nous avons ainsi mesuré K_C pendant deux heures, sans changement notable, alors que dans les mêmes conditions, sans ATP, les modules élastiques décroissent progressivement et le squelette est dénaturé au bout de 30 à 45 min (*cf.* § 3.3 de ce chapitre).

Durée à partir de l'extraction (min)	Module d'extension moyen ($\mu\text{N/m}$)
15	16.2 ± 4.0 (6)
30	20.1 ± 2.1 (6)
45	18.2 ± 1.4 (6)
63	13.4 ± 1.0 (4)
78	17.3 ± 1.6 (4)
95	15.8 ± 0.7 (4)
114	14.0 ± 1.0 (6)

Table 6.2 : Mesures effectuées sur un squelette en milieu hypotonique (25 mOsm/kg) avec 1 mM d'ATP. Le nombre de mesures de K_C sur lesquelles est effectuée la moyenne est donné entre parenthèse. L'origine du temps est pris à la dissolution de la bicouche.

Sur les quatre squelettes manipulés, nous avons obtenu 9 mesures de K_C . La valeur moyenne des modules d'extension obtenus sur ces 9 déformations est $K_C = 12.5 \pm 6.2 \mu\text{N/m}$. Le faible nombre de valeurs ne permet pas de connaître le nombre de feuilletts déformés. Sans ATP, la valeur moyenne du module d'extension est de 9.0 ± 3.6 . En l'absence de mesures complémentaires, nous ne pouvons conclure sur la signification de cette différence apparente.

Il semble donc que l'ATP ait deux effets sur le squelette. Le premier est d'augmenter la tension initiale. Ceci est sûrement dû à l'augmentation des fluctuations de la spectrine liée à la présence d'ATP. Cette augmentation ne peut pas s'expliquer par la faible augmentation de l'osmolarité due à l'ATP. Il a déjà été observé que l'ATP augmente les fluctuations de la membrane du globule rouge [Levin et Korenstein, 1991], et même du squelette [Tuvia *et al.*, 1998]. Nos mesures vont dans le même sens.

Le deuxième effet de l'ATP est de stabiliser le squelette après la dissolution de la bicouche lipidique, et de retarder (d'éviter ?) la désagrégation de celui-ci. Il est difficile à l'heure actuelle de savoir de quelle manière et sur quelles protéines intervient l'ATP.

Conclusion

Ce chapitre souligne l'importance de certains facteurs sur l'élasticité du squelette du globule rouge. La force ionique intervient directement sur la raideur des filaments de spectrine. Nous avons ainsi donné la dépendance quantitative des modules élastiques en fonction de la force ionique. En milieu tampon hypotonique, le squelette devient de plus en plus souple, puis se dénature au bout de 30 à 45 minutes après son extraction. L'ATP semble intervenir dans ce processus puisque sa présence limite cette désagrégation. En milieu isotonique, il est très probable que les filaments de spectrine adhèrent les uns aux autres, à cause de l'écrantage des répulsions électrostatiques entre filaments.

Conclusion

L'utilisation simultanée de plusieurs pinces optiques a permis une étude rigoureuse de l'élasticité de la membrane du globule rouge humain et de son squelette. Les forces appliquées ainsi que les conditions expérimentales – notamment la force ionique – sont parfaitement contrôlées.

Appliquée à la membrane du globule rouge, la technique des pinces optiques s'est révélée un atout majeur puisqu'elle permet la mesure du module de cisaillement μ aux petites déformations. L'extraction de ce module élastique ne s'appuie que sur la loi de Hooke. La valeur mesurée est $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles obtenues par micropipette ($4 < \mu < 10 \mu\text{N/m}$), mais inférieure. Nous expliquons cette différence par trois hypothèses : i) les deux techniques n'opèrent pas dans le même régime élastique, ii) la structure de la membrane est modifiée lors de l'aspiration dans la micropipette à cause du glissement du squelette de la bicouche lipidique, et iii) chaque technique peut sélectionner une population de globules différentes, suivant leur affinité au verre.

L'utilisation simultanée de trois pinces optiques a permis la première mesure des modules élastiques du squelette du globule rouge, après la dissolution de la bicouche lipidique. Nous avons mesuré $K_C = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$, $\mu_C = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$ et $K_C/\mu_C = 1.9 \pm 1.0$ dans un milieu hypotonique à 25 mOsm/kg. Ces mesures sont en bon accord avec des modèles théoriques et numériques de réseaux de ressorts. Nous avons pu également caractériser la dépendance de l'élasticité en fonction de la salinité du milieu environnant.

Un des résultats importants de ce travail est la détermination de la longueur de persistance de la spectrine *in situ*. À partir du comportement élastique macroscopique du squelette, nous avons déterminé la raideur d'un filament de spectrine ($k = 3.5 \mu\text{N/m}$ à 5 mOsm/kg) ainsi que sa longueur de persistance ($\xi = 5 \text{ nm}$ à 25 mOsm/kg). Ceci constitue la première mesure de la longueur de persistance d'un filament de spectrine inclus dans un réseau.

La valeur mesurée de la longueur de persistance explique notamment pourquoi le squelette du globule rouge humain est à base de spectrine et non pas d'actine, comme c'est généralement le cas pour les autres cellules. En effet, la longueur de persistance de l'actine est de l'ordre du micron. La raideur d'un filament d'actine est donc beaucoup plus importante que celle d'un filament de spectrine. Un squelette à base d'actine ne pourrait pas se déformer comme le fait celui du globule rouge humain.

Perspectives

Module de cisaillement de la membrane

Le module de cisaillement μ de la membrane mesuré par pinces optiques est plus faible que les modules obtenus par aspiration par micropipette (*cf.* Chapitre 3, § 3.3). Une hypothèse expliquant cette différence est que les déformations ne se font pas dans le même régime élastique. L'aspiration par micropipette génère de grandes déformations, et le modèle utilisé nécessite d'introduire une énergie hyper-élastique de déformation de la membrane. La valeur de μ dépend de la forme de l'énergie introduite dans le modèle. Nos mesures sur des globules rouges discoïdes (*cf.* Chapitre 3, § 3.2) présentent une partie en régime de faibles déformations – pour une force appliquée inférieure à 15 pN – et une partie en régime de grandes déformations – au-delà de 15 pN. Il serait intéressant de voir quelle valeur de μ est mesurée en utilisant les différents modèles hyper-élastiques.

Modules élastiques du squelette

La méthode utilisée pour extraire les modules élastiques du squelette ne prend en compte que la partie du squelette située entre les trois billes. Une méthode beaucoup plus précise consisterait à considérer la déformation réelle du squelette. Ceci est possible en marquant le squelette avec une sonde fluorescente (comme nous avons fait dans le Chapitre 4, § 3). L'analyse de ces mesures ne semble possible qu'à l'aide de simulation numérique. La figure P.1 présente un cycle de déformations sur un squelette marqué (par la rhodamine phalloïdine) et déformé. Le marquage fluorescent permet de prendre en compte la déformation réelle, ce qui donnerait des valeurs de modules élastiques plus précises. Pourquoi

ne pas envisager également de déduire la contrainte locale de l'intensité du signal fluorescent (comme le fait Discher *et al.* [1996] sur les expériences d'aspiration par micropipette) ?

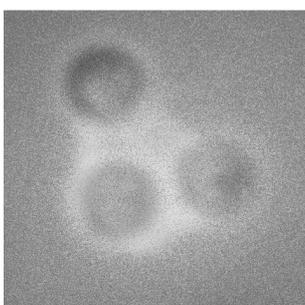
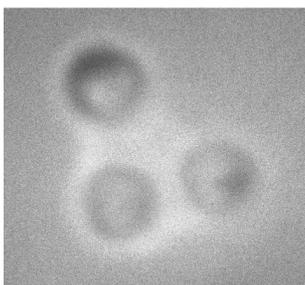
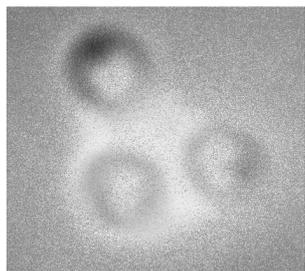
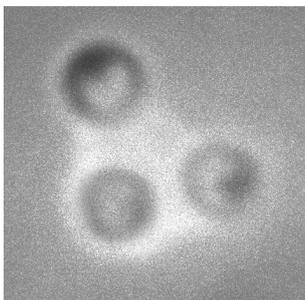
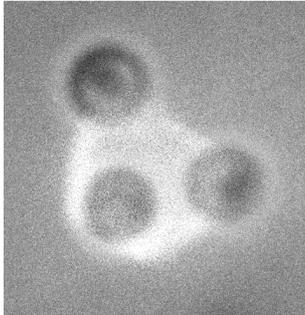


Figure P.1 : Cycle de déformations d'un squelette dont l'actine est marquée. Ces images sont obtenues par la superposition de l'image en fluorescence et de celle en microscopie à fond clair. Chaque image est réalisée après le déplacement des pièges de 100 nm dans les deux directions.

Réponse dynamique du squelette

Nous avons effectué une étude très préliminaire de la réponse dynamique du squelette.

Protocole expérimental

Un globule rouge est piégé par trois billes, la membrane est dissoute, puis l'osmolarité du milieu environnant est amenée à 150 mOsm/kg par 10 min d'injection d'une solution tampon. La position des pièges dans la direction Ox (*cf.* Figure P.2) est ensuite modulée par un signal sinusoïdal de faible amplitude ($A_0 \sim 0.5 \mu\text{m}$) et de fréquence variable par un générateur de fonction. Deux des trois pièges oscillent, le troisième restant fixe. Le faisceau laser réfléchi par la bille du piège fixe est envoyé sur une photodiode à quadrants (*cf.* Chapitre 2, § 4), et le signal de la position de la bille est traité par une détection synchrone (*cf.*, Chapitre 2, Figure 2.10). Nous faisons varier la fréquence d'excitation de 0.5 à 60 Hz, et la détection synchrone mesure le déphasage du mouvement de la bille par rapport au signal d'excitation.

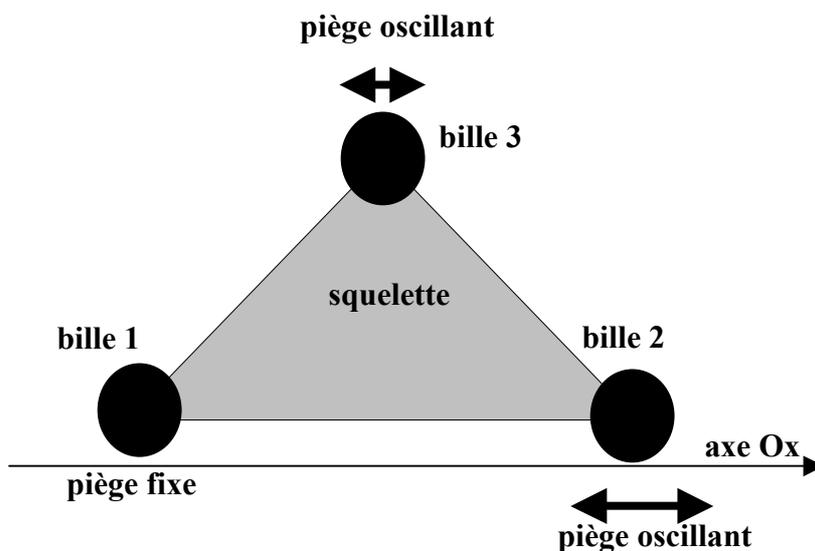


Figure P.2 : Deux des pièges sont soumis à un signal sinusoïdal de faible amplitude. Une détection synchrone mesure le déphasage de la bille dans le piège fixe par rapport au signal d'excitation.

Modélisation du squelette

Le squelette est considéré comme un solide de Kelvin-Voigt (*cf.* Figure P.3), c'est-à-dire composé de l'association en parallèle d'un ressort de raideur E_{sq} et d'un amortisseur de coefficient de viscosité η_{sq} . Nous faisons l'hypothèse que la déformation du squelette se fait principalement dans la direction Ox. La troisième bille n'est pas prise en compte par notre modèle.

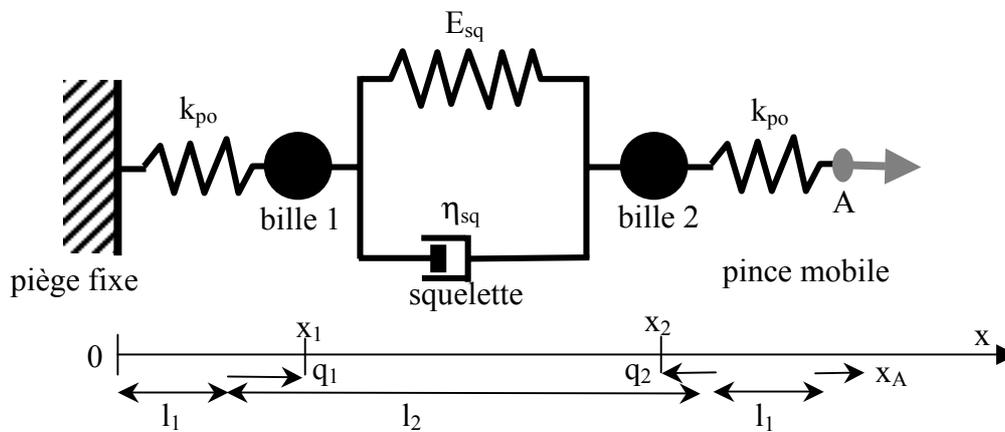


Figure P.3 : Le squelette est modélisé par un solide de Kelvin-Voigt, c'est-à-dire par une association en parallèle d'un ressort de raideur E_{sq} et d'un amortisseur de coefficient de viscosité η_{sq} .

Dans une association en parallèle, la contrainte imposée à l'ensemble est la somme des contraintes imposées à chaque branche ; la déformation est identique dans chaque branche et égale à la déformation subie par l'ensemble.

Expressions des forces exercées sur chacune des branches

La contrainte τ_1 dans le ressort est donnée par :

$$\tau_1 = E_{sq} \varepsilon,$$

où ε est la déformation. La force appliquée sur la branche est : $\vec{F}_1 = E_{sq} \vec{u}$, où \vec{u} est le déplacement.

La contrainte τ_2 dans l'amortisseur est :

$$\tau_2 = \eta_{sq} \frac{\partial \varepsilon}{\partial t},$$

La norme F_2 de la force exercée sur l'amortisseur de viscosité η_{sq} est donnée par :

$F_2 = \eta_{sq} \frac{d u}{d t}$. Dans notre cas, η_{sq} a comme unités des Pascal mètre seconde ; nous

l'assimilons donc à une viscosité bidimensionnelle.

En négligeant les termes inertiels, les petits mouvements au voisinage des positions d'équilibre $x_1 = l_1$ et $x_2 = l_2$ sont décrits par :

$$\begin{aligned} -k_{po} (x_1 - l_1) - \zeta_s \frac{d x_1}{d t} + E_{sq} (x_2 - x_1 - l_2) + \eta_{sq} \frac{d(x_2 - x_1 - l_2)}{d t} &= 0 \\ -k_{po} (x_2 - (l_2 + l_1 + X_0 \cos(\omega t))) - \zeta_s \frac{d x_2}{d t} - E_{sq} (x_2 - x_1 - l_2) - \eta_{sq} \frac{d(x_2 - x_1 - l_2)}{d t} &= 0 \end{aligned}$$

où k_{po} est la raideur de la pince optique, $\zeta_s = 6\pi\eta R$, X_0 l'amplitude de déplacement du piège et ω la pulsation du signal d'excitation. En faisant intervenir les écarts $q_1 = x_1 - l_1$ et $q_2 = x_2 - l_1 - l_2$ par rapport à la position d'équilibre, il vient :

$$\begin{aligned} (\zeta_s + \eta_{sq}) \frac{d q_1}{d t} + (k_{po} + E_{sq}) q_1 - E_{sq} q_2 - \eta_{sq} \frac{d q_2}{d t} &= 0 \\ \zeta_s \frac{d q_2}{d t} + (k_{po} + E_{sq}) q_2 - E_{sq} q_1 - \eta_{sq} \frac{d q_1}{d t} &= k_{po} X_0 \cos(\omega t) \end{aligned}$$

Les solutions stationnaires de ce système d'équation sont calculées par le logiciel Mathematica :

$$q_1[t] = \frac{2 \bar{A} k}{((2 E_{sq}^2 k + E_{sq} (k - w \zeta) (k + w \zeta) + 2 k w^2 \eta (-\zeta + \eta)) \cos[t w] + w (2 E_{sq}^2 \zeta + 2 E_{sq} k \zeta + (k^2 - w^2 \zeta (\zeta - 2 \eta)) \eta) \sin[t w]) / (2 (k - \dot{n} w \zeta) (k + \dot{n} w \zeta) (2 E_{sq} + k - \dot{n} w (\zeta - 2 \eta)) (2 E_{sq} + k + \dot{n} w (\zeta - 2 \eta)))}$$

et

$$q_2[t] = \frac{2 \bar{A} k}{((2 E_{sq}^2 k + E_{sq} (3 k^2 + w^2 \zeta^2) + k (k^2 + w^2 (\zeta^2 - 2 \zeta \eta + 2 \eta^2))) \cos[t w] + w (2 E_{sq}^2 \zeta + 2 E_{sq} k \zeta + (k^2 + w^2 \zeta (\zeta - 2 \eta)) (\zeta - \eta)) \sin[t w]) / (2 (k - \dot{n} w \zeta) (k + \dot{n} w \zeta) (2 E_{sq} + k - \dot{n} w (\zeta - 2 \eta)) (2 E_{sq} + k + \dot{n} w (\zeta - 2 \eta)))}$$

Nous cherchons les solutions stationnaires à la même fréquence que le signal d'excitation :

$q_1 = q_{1,0} \cos[\omega t - \varphi]$ et $q_2 = q_{2,0} \cos[\omega t - \beta]$. Le déphasage φ est :

$$\varphi = \arctan \left[\frac{\omega (2 E_{sq}^2 \zeta_s + 2 E_{sq} k_{po} \zeta_s - \eta_{sq} (k_{po}^2 - \omega^2 \zeta_s (\zeta_s + 2 \eta_{sq})))}{2 E_{sq}^2 k_{po} + E_{sq} (k_{po}^2 - \omega^2 \zeta_s^2) + 2 k_{po} \omega^2 \eta_{sq} (\zeta_s + \eta_{sq})} \right]$$

La figure 6.7 présente un graphe type pris à $E_{sq} = 1 \mu\text{N/m}$ et $\eta_{sq} = 0.01 \mu\text{N.s/m}$. La raideur des pièges est calculée pour $P = 150 \text{ mW}$.

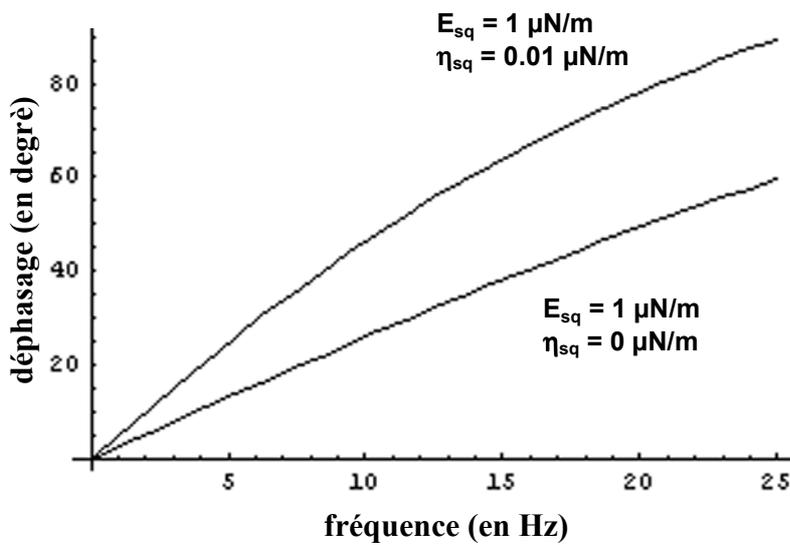


Figure P.4 : Valeur calculée du déphasage en fonction de la fréquence, pour $E_{sq} = 1 \mu\text{N/m}$. Deux valeurs de η_{sq} sont représentées : $\eta_{sq} = 0 \mu\text{N.s/m}$ et $\eta_{sq} = 0.01 \mu\text{N.s/m}$.

Résultats et Discussion

Lorsque nous lisons les mesures expérimentales par le modèle de solide de Kelvin-Voigt, nous mesurons une raideur dynamique E_{sq} de $0.9 \mu\text{N/m}$ et une viscosité bidimensionnelle η_{sq} de $0.03 \text{ Pa.s.}\mu\text{m}$ (cf. Figure P.5). Ceci correspond à un temps caractéristique de relaxation $\tau = \frac{\eta_{sq}}{E_{sq}}$ égale à 0.03 s .

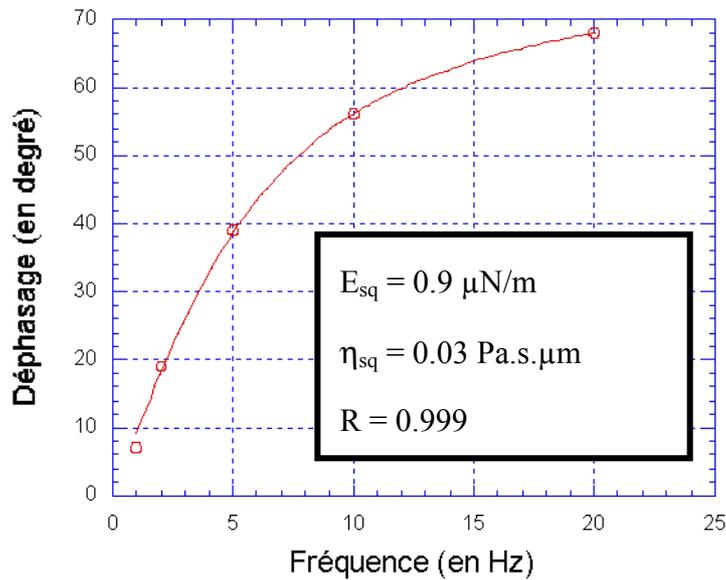


Figure P.5 : Lissage des données expérimentales par le modèle de Kelvin-Voigt.

Le temps de relaxation ainsi mesuré est de l'ordre de quelques ms. Celui d'une bille dans une pince, par dissipation visqueuse, est du même ordre de grandeur :

$$\tau = \frac{6 \pi \eta R}{k_{po}} \approx 10 \text{ ms.}$$

Or, notre modèle ne prend pas en compte la troisième bille. Il est fort probable que nous mesurons essentiellement la dissipation par frottement visqueux de la troisième bille dans le liquide.

Relation entre E_{sq} et K_C , μ_C

La valeur de E_{sq} mesurée est du même ordre de grandeur que K_C et μ_C . Elle est toutefois inférieure. La contrainte appliquée σ est de l'ordre de F/R , R étant le diamètre des billes, soit le micron. Le module K_C est défini par :

$$\sigma = K_C \frac{\Delta S}{S_0}.$$

Le module E_{sq} est déterminé par : $F = E_{sq} \Delta L$, ΔL étant l'amplitude des oscillations.

La variation relative de surface $\frac{\Delta S}{S_0}$ se comporte comme : $\frac{\Delta L}{L_0}$, ΔL étant l'amplitude des oscillations ($\Delta L \sim 1 \mu\text{m}$), L_0 la distance entre les deux billes ($L_0 \sim 10 \mu\text{m}$). Il vient donc :

$$E_{sq} \approx K_C \frac{R}{L_0}.$$

Il apparaît donc que E_{sq} est plus petit que K_C . La valeur de K_C est de l'ordre de $10 \mu\text{N/m}$ (cf. Chapitre 5, § 1.2), ce qui signifie que E_{sq} doit être de l'ordre de $1 \mu\text{N/m}$. Ceci est en accord avec notre mesure.

Conclusion

Ces expériences préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence le comportement viscoélastique du squelette du globule rouge humain. Le comportement du système squelette et billes est dominé par la dissipation visqueuse des billes. Pour pouvoir étudier le comportement du squelette en dynamique, il faut un modèle qui prenne en compte la géométrie du squelette et la déformation réelle de celui-ci.

Publications : [Hénon *et al.*, 1999]

Biophysical Journal Volume 76 February 1999 1145–1151

1145

A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers

Sylvie Hénon, Guillaume Lenormand, Alain Richert, and François Gallet

Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-Chimique, ESA 7057 associée au CNRS et aux Universités Paris 6 et Paris 7, 75251 Paris cedex 05, France

ABSTRACT Optical tweezers are used to apply calibrated forces to human erythrocytes, via small silica beads bound to their membrane. The shear modulus μ of the membrane is inferred from measurements of the cell deformation in the small strain linear regime. We find the same result $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$ for both discotic and nearly spherical swollen cells. This value is smaller than the one deduced from micropipettes experiments. However the two methods do not operate in the same deformation regime and are not expected to lead to the same result.

INTRODUCTION

In this work, optical tweezers are used for the first time to measure the elastic coefficients of the red blood cell membrane. The recent development of this technique has opened new possibilities for convenient manipulation of biological objects (Svoboda and Block, 1994). Optical tweezers make it possible to trap, manipulate, and displace a living cell or a part of it without damage, either directly or using specific handles (Ashkin *et al.*, 1987; Block *et al.*, 1989; Visscher *et al.*, 1993; Vorobjev *et al.*, 1993; Dai and Sheetz, 1995). Moreover, this tool can be made quantitative after a careful calibration (Simmons *et al.*, 1996; Svoboda and Block, 1994); the restoring force in the trap depends on the size, the shape, and the optical index of the trapped object and is proportional to the incident light power. Typical values of escape forces lie between 1 and 50 pN, which is in the range necessary to locally distort a cell.

Direct red blood cell trapping has been reported in the literature (Ashkin *et al.*, 1987; Svoboda *et al.*, 1992; Bronkhorst *et al.*, 1995; Mammen *et al.*, 1996). In an experiment using multiple trapping, the cell was seized by three points and deformed into a parachute shape (Bronkhorst *et al.*, 1995). Then the relaxation time to equilibrium was measured, which is a combination of the membrane elastic moduli and viscosities. However, this configuration did not allow the authors to measure the membrane elastic coefficients, because the trapped volume and thus the exerted force were not well defined.

In this work we report simultaneous measurements of forces and deformations exerted on a red blood cell, from which we infer the elastic shear modulus of the membrane. The cell is seized and deformed by means of two small

silica beads bound to the membrane. The beads are trapped in split optical tweezers and used like handles to pull on the membrane with two opposite forces, which are determined by a preliminary calibration.

We compared our results with the predictions of the linear elastic theory. At low forces ($F < 10\text{--}15$ pN) the membrane remains in the small deformation limit. A red blood cell membrane may be modeled either by two independent parallel discs if it is in isotonic buffer or by a sphere in hypotonic buffer. In both cases the cell diameter variation is proportional to the applied force, leading to $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$. At higher forces we enter the large deformation regime, and we observe deviations from the linear response.

According to our measurements, the value of μ appears to be smaller than the usually accepted one, deduced from micropipette experiments (Evans, 1973; Hochmuth and Waugh, 1987; Lelièvre *et al.*, 1995). A detailed comparison between different methods is presented in the Discussion.

MATERIALS AND METHODS

Red blood cell preparation

Fresh blood was obtained from healthy donors by a fingertip needle prick. Red blood cells (RBCs) were diluted in phosphate-buffered saline (Sigma P 4417) and then washed three times by centrifugation. Whenever necessary, hypotonic buffer (10 mM potassium phosphate, pH 7.4, 75 mM NaCl, i.e., 155 mOsm/kg) was used to get spherical or nearly spherical RBCs.

Silica microbeads, 2.1 μm in diameter, are purchased from Bangs Laboratories (Fishers, IN). The beads were rinsed several times in purified water before addition to the RBC suspension. The added amount corresponded to approximately two beads per erythrocyte. The suspension was then maintained at 4°C for 1 h, allowing spontaneous and nonspecific adhesion of microbeads to the RBC membrane (Svoboda *et al.*, 1992). Finally, it was diluted to $\sim 50,000$ RBCs/ μl . All observations and measurements were made at room temperature ($T \approx 25^\circ\text{C}$).

The embedded observation chamber was made of the usual microscope slide and coverslip, separated by a thin (50 μm) sticking plastic film. At an early stage in the experiment, slides and coverslips were coated with bovine serum albumin (BSA) (Sigma A 4503) to prevent RBC or bead adhesion to glass plates. Actually, we obtained better results using slides silanized with dimethyldichlorosilan. In all cases, a small amount of BSA (~ 1 mg/ml) is added to the suspension after the beads have stuck to the cells.

Received for publication 10 August 1998 and in final form 10 November 1998.

Address reprint requests to Dr. Sylvie Hénon, Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-Chimique, ESA 7057 associée au CNRS et aux Universités Paris 6 et Paris 7, Case courrier 7056, 2 place Jussieu, 75251 Paris cedex 05, France. Tel.: 33-1-44-27-77-82; Fax: 33-1-44-27-43-35; E-mail: henon@lbhp.jussieu.fr.

© 1999 by the Biophysical Society

0006-3495/99/02/1145/07 \$2.00

Optics

Our optical tweezers setup is schematized in Fig. 1. It is comparable to the one described with detail by Simmons et al. (1996). We use a noninverted optical microscope (Polyvar model from Reichert) to trap the RBCs and simultaneously observe them. The 1.064 μm Nd:YAG laser beam (model R2-E-106C from Spectra Physics) has a maximum emission power $P_{\text{max}} = 605$ mW. The beam is reflected by a dichroic mirror inside the microscope and focused at the observation point through an immersion objective ($\times 100$, numerical aperture 1.25). The wavelength was chosen to minimize water and hemoglobin absorption and to avoid possible damage to the cell. At $\lambda = 1.064$ μm , the absorption coefficient for a 2 mM hemoglobin solution is 0.2 cm^{-1} (Svoboda and Block, 1994). From this we estimate a local temperature increase $\Delta T \approx 3^\circ\text{C}$ for a red blood cell directly trapped in a 200-mW beam focused over a $1\text{-}\mu\text{m}^3$ region. This is in agreement with other experimental results and estimates (Liu et al., 1995). The actual heating of the RBCs should be much smaller in our experiment, because we never focus the beam directly on the cell, but on a bead located on its side.

The displacement of the trap in the observation plane is accurately controlled by the rotation of two galvanometric mirrors with perpendicular axes (6800 HP model; Cambridge Technology). By applying a square waveform signal to them, the trap position rapidly commutes between two points, which is equivalent to a pair of traps if the commuting frequency f_c is high enough (current f_c are in the range of 50–300 Hz).

The $f = +500$ mm converging lens placed between the galvanometric mirrors and the microscope plays two different roles: first it makes the laser beam diameter comparable to the back aperture diameter of the microscope objective, to maximize the beam angular aperture in the observation plane. Second, it conjugates the galvanometric mirrors and this back aperture, so that the laser beam is fully collected by the objective for any angular position of the mirrors.

Force calibrations

The force exerted on a trapped object depends on its size and shape, and on the refractive indices of the object and the surrounding medium. It is proportional to the incident laser power. However, because the sizes of the object and the focusing region are on the same order of magnitude (~ 1 μm), it is difficult to calculate *ab initio* the restoring force. Furthermore, because of the optical aberrations of the objective, the exact shape of the trap is not well known. Thus a preliminary force calibration is necessary.

The usual calibration method consists in submitting the trapped spherical bead to a counterflow of known velocity v (Svoboda and Block, 1994;

Simmons et al., 1996). The escape force from the trap is exactly opposite the viscous drag force F :

$$F = 6\pi R\eta v \quad (1)$$

where $R = 1.05$ μm is the bead radius and η is the liquid viscosity. To calibrate a single trap, we apply with one galvanometric mirror a sinusoidal displacement $a = a_0 \sin(2\pi ft)$ to a trapped bead immersed in pure water ($\eta = 0.9 \cdot 10^{-3}$ Pa \cdot s at $T = 25^\circ\text{C}$). For $a_0 = 12$ μm and in the range $0 < f < 50$ Hz, we observe that the bead always escapes from the trap at the point of maximum velocity $v = 2\pi fa_0$. In this frequency range, the bead inertia is negligible, and at any time the bead velocity has its steady-state value. With f measured as a function of the total laser power P , the escape force $F(P)$ is determined in a first approximation by Eq. 1. Following Svoboda and Block (1994), a correction of order R/d is applied to Eq. 1 to take into account the finite distance d from the bead to the top or bottom of the cell. This correction is larger than 5% only if $d < 10$ μm .

Several calibration curves $F(P)$ are presented in Fig. 2 at different depths of the trap from the top coverslip. As expected, one observes that F is almost a linear function of the power P . At maximum power $P_{\text{max}} = 605$ mW, the escape force may be as high as 80 pN. Nevertheless, there is a slight deviation from the exact proportionality law, for which there are two possible explanations: first the power calibration of the laser may not be quite accurate; second, the spatial mode of the laser is mainly TEM_{00} , but it may be slightly perturbed by other modes at high power, and the trap shape could be affected.

In Fig. 2, one notices that, for a given power P , the force F decreases as the depth h from the top increases. This effect was previously reported by other authors (Svoboda and Block, 1994) and is related to the imperfect stigmatism at distance h from the plane coverslip/water interface. To include this effect, we fit the experimental curves with the empirical calibration formula:

$$F(P, h) = \frac{a_0 + a_1 P + a_2 P^2 + a_3 P^3}{h + h_0} \quad (2)$$

The coefficients a_2 and a_3 account for small corrections to a behavior linear with P . In our case, the agreement with the data is quite satisfying with $h_0 = 104.5$ μm , as shown in Fig. 2.

We estimate the relative accuracy in the calibration to be $\sim 5\%$. The main source of uncertainty is the dispersion in bead diameter (estimated to be ± 0.1 μm), because we noticed that the escape force for different beads

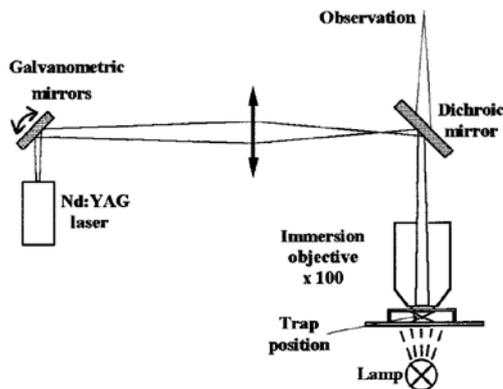


FIGURE 1 Scheme of the optical tweezers experimental setup. Trapping is achieved by focusing the laser beam ($\lambda = 1.064$ μm) through the microscope objective. Two perpendicular galvanometric mirrors make it possible to move the trap in the observation plane or split the trap in two by rapidly commuting their position.

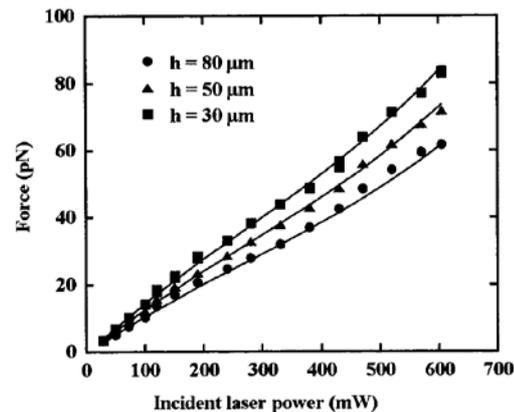


FIGURE 2 Examples of calibration of the escape force of a 2.1- μm silica bead from a single trap F versus the incident laser power P , at different depths h from the top coverslip. Symbols represent experimental data and solid curves are the best interpolation given by the empirical formula (Eq. 2) (see text). Notice that F is roughly proportional to P and decreases with h because of optical aberrations.

trapped in the same conditions may differ by a few percent. Furthermore, small beam misalignment or imperfect cleanliness of optics reduces the escape force by another few percent. Thus we systematically and carefully realign the setup and perform a calibration test before each experiment.

Calibration of the double trap was also necessary for the RBC experiments. Measurements of the escape force F_d from each trap were performed in the same manner as above. We found that $F_d(P, h) = \alpha F(P, h)$, where α is a number of order 0.5, independent of the power P , but slightly dependent on the depth h and on the commutation frequency f_c . We measured, for instance, $\alpha = 0.44, 0.42,$ and 0.40 , respectively, for $h = 30, 50,$ and $80 \mu\text{m}$, at the same commutation frequency $f_c = 300 \text{ Hz}$. The dependence on f_c is hardly significant in the range $50 < f_c < 300 \text{ Hz}$ ($\alpha = 0.46$ for $f_c = 150 \text{ Hz}, h = 30 \mu\text{m}$), but α decreases more rapidly beyond $f_c = 400 \text{ Hz}$. This is due to the finite commuting time $\Delta t \approx 200 \mu\text{s}$ from one trap position to the other.

Experimental procedure, data recording, and analysis

The measurements reported in the following section are made on selected RBCs with two silica beads in diametrical position (see Fig. 3). When the

coating of the microscope slide by either BSA or silane is not perfect, it may happen that one of the beads sticks to the bottom glass slide. In this case, we pull on the other free bead with a single trap. In all other cases, we use a double trap to manipulate the cell. Images of the deformed cell are stored with a video cassette recorder and a microcomputer for further analysis. For a given laser power P , we apply an increasing stress to the membrane by slowly incrementing the distance between the two trapped beads. The cell becomes elongated, and its diameter D decreases in the direction perpendicular to the applied force. Just before one of the beads escapes from the trap, we record the cell shape, and we know the applied force F by using the above calibration. By varying the laser power P , we collect a set of images of the same cell submitted to different forces, as shown, for instance, in Fig. 3. If the measurements are quickly repeated, no hysteretic behavior of the shape is observed after the power P is increased and decreased. Actually, when the cell is trapped for several minutes at high power ($P > 300 \text{ mW}$), some membrane stiffening is observed, and the cell elasticity is affected. Thus we make sure that all of the manipulations on the same cell take place in less than 15 min. Numerical image processing is used to measure the cell diameter D . The border position is located to within ± 1 pixel, and the final accuracy of D is $\sim 100 \text{ nm}$.

RESULTS AND DISCUSSION

The inner fluid of the red cell is purely viscous and has no elasticity. As a consequence, the membrane is entirely responsible for the elastic response. In the following, we only consider the linear elasticity limit in the small deformation regime. We assume a constant membrane thickness, which makes the problem purely two-dimensional.

In the small deformation regime, the simple constitutive laws of elasticity are (Landau and Lifshitz, 1959)

$$\begin{aligned} \sigma_{xx} &= K(e_{xx} + e_{yy}) + \mu(e_{xx} - e_{yy}) \\ \sigma_{yy} &= K(e_{xx} + e_{yy}) + \mu(e_{yy} - e_{xx}) \\ \sigma_{xy} &= 2\mu e_{xy} \end{aligned} \tag{3}$$

$\sigma_{ij} = \delta F_i / \delta x_j$ and $e_{ij} = 1/2(\delta u_i / \delta x_j + \delta u_j / \delta x_i)$ are the stress and strain tensors (see Fig. 4), K is the area compressibility, and μ is the elastic shear modulus of the membrane.

In a first approximation, the membrane of a discotic unswollen RBC of diameter D_0 at rest is modeled by two parallel independent discs submitted to zero stress at their border. Only two opposite forces of intensity F are exerted

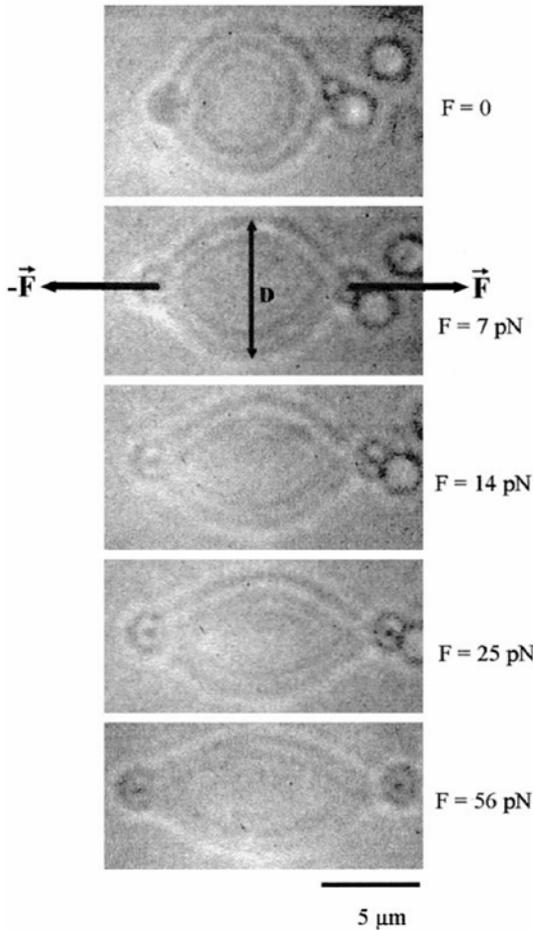


FIGURE 3 Discotic RBC with two silica beads in diametrical position. The deformation increases with increasing force F . Each image is taken just before the bead escapes from the trap, and F is given by the calibration formula (Eq. 2). The variations in diameter D are measured in the direction perpendicular to F .

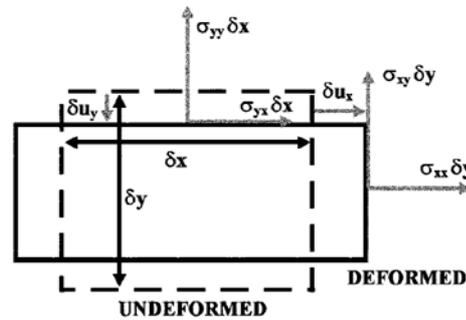


FIGURE 4 Representation of the deformations and stresses exerted on a surface element. It is supposed that the membrane thickness is constant, so that the problem is purely two-dimensional.

at two diametrically opposed points of the disc border. The deformation can be exactly calculated everywhere (Landau and Lifshitz, 1959). In particular, the diameter variation in the direction perpendicular to F is

$$D = D_0 - \frac{F}{2\pi\mu} \left(1 + \left(1 - \frac{\pi}{2} \right) \frac{\mu}{K} \right) \quad (4)$$

The validity of this formula lies in the assumption that there is no stress at the disc border, which is an unverifiable and probably crude approximation. This led us to perform experiments on osmotically swollen spherical or nearly spherical cells as well, because exact algebra can be carried out in this specific geometry.

For a spherical shell with two opposite forces applied at its poles, the stress and deformation are the same along the equator (see Fig. 5):

$$\sigma_{\theta\theta} = \frac{F}{2\pi R} \quad (5a)$$

$$\frac{\sigma_{\theta\theta}}{R'} + \frac{\sigma_{\varphi\varphi}}{R} = 0 \quad (5b)$$

$$\sigma_{\theta\varphi} = 0 \quad (5c)$$

$$e_{\varphi\varphi} = \frac{R - R_0}{R_0} \quad (5d)$$

Here θ and φ are, respectively, the colatitude and azimuth on the sphere, R_0 is the equilibrium radius, and R and R' are the two main radii of curvature at the equator for the deformed sphere. Equation 5b expresses the fact that the membrane is not under tension; there is no pressure difference between the cell interior and exterior.

In the small deformation limit, $R \approx R' \approx R_0$; then $\sigma_{\theta\theta} \approx -\sigma_{\varphi\varphi}$. Equations 3 and 5 lead to

$$D = D_0 - \frac{F}{2\pi\mu} \quad (6)$$

In the case of the RBC membrane, it is often assumed that K is controlled by the phospholipidic bilayer, which has a constant area in a first approximation. On the contrary, μ is determined by the elastic properties of the cytoskeleton,

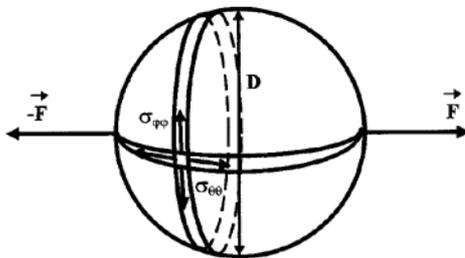


FIGURE 5 Representation of the stresses exerted on a spherical cell by two diametrically opposite forces F . φ is the azimuth and θ the colatitude. $\sigma_{\theta\theta}$ and $\sigma_{\varphi\varphi}$ are constant along any circle parallel to the equator.

described in the simplest way as a two-dimensional network of spectrin strands bound to the bilayer. It is known from micropipette experiments that K is on the order of 300–500 mN/m (Evans et al., 1976; Waugh and Evans, 1979; Hochmuth and Waugh, 1987), and μ is in the range 4–10 $\mu\text{N/m}$ (Evans, 1973; Hochmuth and Waugh, 1987; Engelhardt and Sackmann, 1988; Lelièvre et al., 1995). Thus the approximation $\mu \ll K$ is generally made for the red blood cell membrane. Within this approximation, Eqs. 4 and 6 take exactly the same form; the expected relation between the deformation and the applied force is the same for discotic and spherical cells.

Actually, it was shown in a recent work (Mohandas and Evans, 1994; Discher et al., 1994) that, because the cytoskeleton is bound to a fluid membrane, it may slip with respect to it. Then an external stress may cause local dilation or compression of the cytoskeleton, although its total area must remain constant, because the phospholipidic bilayer is almost incompressible. This implies that the shear modulus measured in the micropipette experiments is actually a combination of μ and K . For our configuration, in the unrealistic limit where the cytoskeleton would be entirely decoupled from the bilayer, K in Eq. 4 should be replaced by the cytoskeleton elastic constant K_c . Taking the estimate $K_c/\mu \approx 2$ for an ideal triangular spectrin network (Boal et al., 1992; Hansen et al., 1996, and references therein), this would make a 30% difference for the diameter variations between Eqs. 4 and 6. However, because the total area of the cytoskeleton must remain constant, the real effect is smaller. To simplify the following discussion, we decided not to include this effect in Eq. 6, although it should be kept in mind as a possible small correction to our results.

Fig. 6 shows measurements of the diameter D versus applied force F for two RBCs in different buffers: one curve corresponds to a discotic RBC in isotonic conditions, and the other to a swollen RBC in hypotonic buffer. In this last

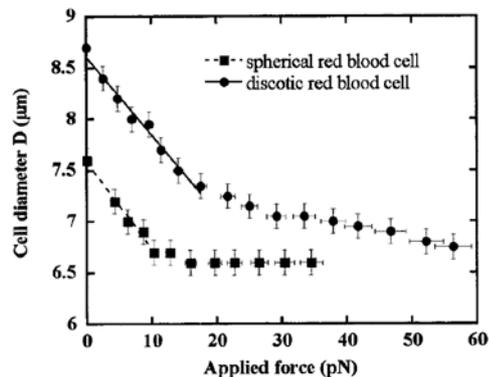


FIGURE 6 Experimental variations of the cell diameter D versus applied force F for a discotic and a quasispherical RBC. The variations are linear at low forces (small deformation), and the membrane shear modulus is given by the slope $D(F)$ in this regime. One finds $\mu = 2.05 \pm 0.3 \mu\text{N/m}$ for the discotic cell and $\mu = 1.9 \pm 0.3 \mu\text{N/m}$ for the spherical one.

case, the osmolarity is adjusted to make the cell nearly spherical, but to keep the membrane under zero tension at rest. We notice that, in both cases, as long as the force remains small enough (typically $F < 15$ pN), D presents linear variations with F . The shear modulus is deduced from the slope: in these particular cases one finds $\mu = 2.05 \pm 0.3$ $\mu\text{N/m}$ for the discotic cell and $\mu = 1.9 \pm 0.3$ $\mu\text{N/m}$ for the spherical one. At higher forces, one observes deviations from the linear variations, and even a saturation for spherical cells. In the case of discotic cells, the finite deformation regime is reached as soon as $F > 15$ pN. Several models were proposed to describe the membrane elasticity in this regime (Skalak et al., 1973; Evans and Skalak, 1980), and we compared them to our data. Although their predictions somehow differ at large deformation, the shear modulus is only determined by the slope of the curves at small deformation. Thus the value extracted from these models is in agreement with the one above. The case of spherical cells is different: above a force threshold F_c we observe that D remains nearly constant. In Fig. 6, for instance, $F_c = 10$ pN. We interpret this saturation as the effect of an increase in the membrane tension, as soon as the deformation is enough to tighten the membrane.

Fig. 7 shows the histogram of μ measured for 30 discotic and six spherical RBCs. The μ values range from 1.4 to 3.7 $\mu\text{N/m}$ for discotic cells and from 1.7 to 3.3 $\mu\text{N/m}$ for spherical ones. This corresponds to the natural dispersion observed in previous works. The averaged values are $\mu = 2.5 \pm 0.4$ $\mu\text{N/m}$ for discotic and $\mu = 2.35 \pm 0.5$ $\mu\text{N/m}$ for spherical cells. Because no significant difference is found between these two values, we conclude that the shear modulus is the same in the two cases.

Our final result, $\mu = 2.5 \pm 0.4$ $\mu\text{N/m}$, is comparable to but definitely smaller than previous measurements of μ . An estimate of 10 $\mu\text{N/m}$ for μ was first deduced from the deformation of RBCs in a shear flow (Hochmuth et al.,

1973). A widely applied method consists in measuring μ from the length of RBCs aspirated in a micropipette (for instance, Evans, 1973; Hochmuth and Waugh, 1987; Lelièvre et al., 1995); the values obtained with this technique lie between 4 and 10 $\mu\text{N/m}$, the most commonly accepted value being around 6 $\mu\text{N/m}$. More recently, the deformation of RBCs in an AC electric field (Engelhardt and Sackmann, 1988) led also to a value of ~ 6 $\mu\text{N/m}$. The difference between these results and ours is too large to be due to experimental uncertainties and must necessarily come from the technique itself. Two explanations can be invoked:

First, these different experiments do not work in the same elasticity regime. With optical tweezers, the cell deformation may be locally large, especially close to the silica beads, but the measurements are taken in the equatorial region, where the deformation always remains small and where the linear theory applies. On the contrary, all other measurements involve the large deformation regime, and their interpretation requires a more complex description than pure linear shear elasticity. Moreover, recent work suggests that a spectrin network may have a nonlinear elastic response and that the elastic coefficients may increase by as much as one order of magnitude from the small to the finite deformation regime (Boal et al., 1992). Our result is consistent with this prediction.

Second, the different techniques may not operate on the same RBC population, at least on average. The optical tweezers technique concerns cells that are tightly bound to glass beads. On the contrary, the micropipette technique supposes that the cells do not adhere to the glass pipette wall, because this would make friction forces play an important role in the force balance. Actually, friction is neglected in the interpretation of micropipette data. Thus one can suppose that these two techniques sort out the cells according to their affinity for glass, which depends on the membrane surface state and which may be associated with different elastic properties from one cell to another.

One could argue that a lower value of the shear modulus may be caused by a heating of the cell or physical or chemical damage of the membrane due to the high laser power. We checked to make sure that this was not the case in our experimental conditions. As we mentioned before, when a 200-mW laser beam is directly focused on the RBC, the temperature elevation in a steady-state regime is only a few degrees. In our setup the beam was not focused on the cell, but on the neighboring beads, and we avoided a total exposure time longer than a few minutes. It is reported in the literature (Waugh and Evans, 1979) that the shear modulus decreases by $\sim 20\%$ when the temperature increases from 25 to 45°C. This effect is definitely too small to account for the difference between the micropipette measurements and ours. Furthermore, we observe no hysteresis when the laser power is cycled between low and high values, which shows that the membrane undergoes no irreversible transformation.

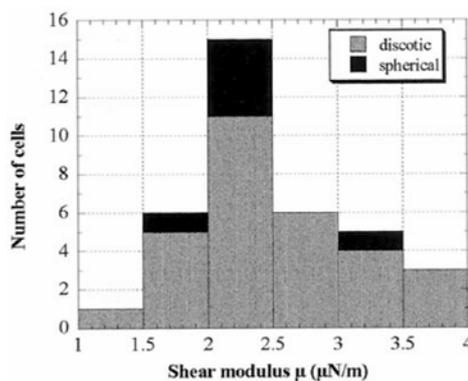


FIGURE 7 Histogram of the shear modulus μ measured for 30 discotic and six quasispherical RBCs. Within experimental error, the averaged μ values for discotic and spherical cells are the same. The final averaged value is $\mu = 2.5 \pm 0.4$ $\mu\text{N/m}$.

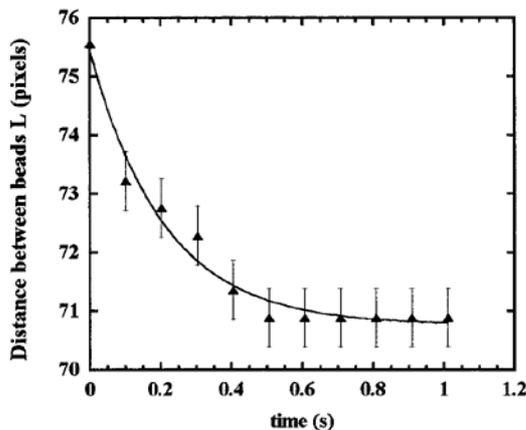


FIGURE 8 Relaxation of an elongated RBC toward equilibrium. The distance $L(t)$ between the two beads bound to the cell is plotted versus time, starting when the cell escapes from the trap. The solid curve represents the best exponential fit, with a time constant $\tau = 206$ ms.

Finally, a good indication that the membrane is not damaged consists in distorting a cell and measuring the relaxation time to its equilibrium shape (Bronkhorst et al., 1995; Linderkamp and Meiselman, 1982; Sutura et al., 1985). This time is controlled by the membrane viscosity and elasticity and varies roughly from 100 ms (young cells) to 300 ms (old cells) in normal conditions (Bronkhorst et al., 1995). Fig. 8 shows an example of the relaxation of a RBC previously elongated by pulling on the beads with the tweezers; the distance $L(t)$ between the two beads is plotted as a function of time. By fitting the data with an exponential curve, the obtained relaxation time in this case is $\tau = 206$ ms. We obtained similar values for all of the RBCs tested by this method. This confirms that in our experiment optical tweezer manipulations have a negligible effect on the cell elastic response.

CONCLUSION

In this paper we showed that, by using silica beads as local handles, optical tweezers are a powerful tool not only for manipulating cells, but also for applying calibrated forces in the pN range. Measuring the induced deformation allows researchers to investigate cell viscoelastic properties. This was applied to the red blood cell membrane; we checked that the method is nonperturbative for the cell and obtained a new determination of the membrane shear modulus μ at small deformations. The measured value $\mu = 2.5 \pm 0.4$ $\mu\text{N/m}$ is about half that measured by the micropipette technique at larger deformations. We argue that there is no contradiction in this statement, because the shear modulus is expected to increase from the small to the finite deformation regime, and because the elastic modulus measured with micropipettes is a combination of the shear modulus and area compressibility.

We acknowledge C. Bucherer, C. Lacombe, N. A. N'Dri, and J. C. Lelièvre for very interesting discussions.

REFERENCES

- Ashkin, A., J. M. Dziedzic, and T. Yamane. 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*. 330: 769–771.
- Block, S. M., D. F. Blair, and H. C. Berg. 1989. Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers. *Nature*. 338:514–518.
- Boal, D. H., U. Seifert, and A. Zilker. 1992. Dual network model for red blood cell membranes. *Phys. Rev. Lett.* 69:3405–09.
- Bronkhorst, P. J. H., G. J. Streekstra, J. Grimbergen, E. J. Nijhof, J. J. Sixma, and G. J. Brakenhoff. 1995. A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophys. J.* 69:1666–1673.
- Dai, J., and M. P. Sheetz. 1995. Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers. *Biophys. J.* 68:988–996.
- Discher, D. E., N. Mohandas, and E. A. Evans. 1994. Molecular maps of red cell deformation: hidden elasticity and in situ connectivity. *Science*. 266:1032–1035.
- Engelhardt, H., and E. Sackmann. 1988. On the measurement of shear elastic moduli and viscosities of erythrocyte plasma membranes by transient deformation in high frequency electric fields. *Biophys. J.* 54: 495–508.
- Evans, E. A. 1973. New membrane concept applied to the analysis of fluid shear- and micropipette-deformed red blood cells. *Biophys. J.* 13: 941–954.
- Evans, E. A., and R. Skalak. 1980. *Mechanics and Thermodynamics of Biomembranes*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Evans, E. A., R. Waugh, and L. Melnik. 1976. Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophys. J.* 16:585–595.
- Hansen, J. C., R. Skalak, S. Chien, and A. Hoger. 1996. An elastic network model based on the structure of the red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 70:146–166.
- Hochmuth, R. M., N. Mohandas, and P. L. Blackshear, Jr. 1973. Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.* 13:747–762.
- Hochmuth, R. M., and R. E. Waugh. 1987. Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. *Annu. Rev. Physiol.* 49:209–219.
- Landau, L. D., and E. M. Lifshitz. 1959. *Theory of Elasticity*. Pergamon Press, New York. 56.
- Lelièvre, J. C., C. Bucherer, S. Geiger, C. Lacombe, and V. Vereycken. 1995. Blood cell biomechanics evaluated by the single-cell micromanipulation. *J. Phys. III France*. 5:1689–1706.
- Linderkamp, O., and H. J. Meiselman. 1982. Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red cells. *Blood*. 59:1121–1127.
- Liu, Y., D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, C. F. Chapman, and B. J. Tromberg. 1995. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers. *Biophys. J.* 68:2137–2144.
- Mammen, M., K. Helmersson, R. Kishore, S. K. Choi, W. D. Phillips, and G. M. Whitesides. 1996. Optically controlled collisions of biological objects to evaluate potent polyvalent inhibitors of virus-cell adhesion. *Chem. Biol.* 3:757–763.
- Mohandas, N., and E. A. Evans. 1994. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:787–818.
- Simmons, R. M., J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudich. 1996. Quantitative measurements of force and displacement using optical trap. *Biophys. J.* 70:1813–1822.
- Skalak, R., A. Tozeren, R. P. Zarda, and S. Chien. 1973. Strain energy function of red blood cell membranes. *Biophys. J.* 13:245–264.
- Sutura, S. P., R. A. Gardner, C. W. Boylan, G. L. Carroll, K. C. Chang, J. S. Marvel, C. Kilo, B. Gonen, and J. R. Williamson. 1985. Age-related changes in deformability of human erythrocytes. *Blood*. 65:275–282.

- Svoboda, K., and S. M. Block. 1994. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:247–285.
- Svoboda, K., C. F. Schmidt, D. Branton, and S. M. Block. 1992. Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 63:784–793.
- Visscher, K., G. J. Brakenhoff, and J. J. Krol. 1993. Micromanipulation by “multiple” optical traps created by a single fast scanning trap integrated with the bilateral confocal scanning laser microscope. *Cytometry*. 14: 105–114.
- Vorobjev, I. A., H. Liang, W. H. Wright, and M. W. Bernes. 1993. Optical trapping for chromosome manipulation: a wave-length dependence of induced chromosome bridges. *Biophys. J.* 64:533–538.
- Waugh, R. E., and E. A. Evans. 1979. Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophys. J.* 26:115–131.

[Lenormand *et al.*, 2001]

Biophysical Journal Volume 81 July 2001 43–56

43

Direct Measurement of the Area Expansion and Shear Moduli of the Human Red Blood Cell Membrane Skeleton

Guillaume Lenormand, Sylvie Hénon, Alain Richert, Jacqueline Siméon, and François Gallet

Laboratoire de Biorhéologie et d'Hydrodynamique Physico-Chimique, ESA 7057 associée au CNRS et aux Universités Paris 6 et Paris 7, Paris, France

ABSTRACT The area expansion and the shear moduli of the free spectrin skeleton, freshly extracted from the membrane of a human red blood cell (RBC), are measured by using optical tweezers micromanipulation. An RBC is trapped by three silica beads bound to its membrane. After extraction, the skeleton is deformed by applying calibrated forces to the beads. The area expansion modulus K_C and shear modulus μ_C of the two-dimensional spectrin network are inferred from the deformations measured as functions of the applied stress. In low hypotonic buffer (25 mOsm/kg), one finds $K_C = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$, $\mu_C = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$, and $K_C/\mu_C = 1.9 \pm 1.0$. In isotonic buffer, one measures higher values for K_C , μ_C , and K_C/μ_C , partly because the skeleton collapses in a high-ionic-strength environment. Some data concerning the time evolution of the mechanical properties of the skeleton after extraction and the influence of ATP are also reported. In the Discussion, it is shown that the measured values are consistent with estimates deduced from experiments carried out on the intact membrane and agree with theoretical and numerical predictions concerning two-dimensional networks of entropic springs.

INTRODUCTION

The red blood cell (RBC) is known for its ability to withstand great deformations when it passes through small capillaries. Because the inner cell is only composed of a viscous fluid (solution of hemoglobin), the resistance to stress is mainly attributed to the elastic properties of its membrane. The RBC membrane is made of a lipid bilayer reinforced on its inner face by a flexible two-dimensional protein network. This skeleton is made of spectrin dimers associated to form mainly tetramers, ~ 200 nm long (Bennett and Gilligan, 1993). They are linked together by complex junctions (primarily composed of actin filaments and protein 4.1) and attached to the lipid bilayer via transmembrane proteins (glycophorin C and band 3). In a simplified description, they form a triangular network in which each actin filament is connected to six spectrin tetramers. The actual spectrin network has many defects and is far from being perfectly triangular. The spectrin dimers can also self-associate into hexamers and higher-order oligomers (Liu *et al.*, 1987; Ursitti *et al.*, 1991). Moreover, the number of spectrin filaments per F-actin varies from three to eight (Ursitti and Wade, 1993), with an average value of six. The skeleton elasticity is determined both by the intrinsic behavior of spectrin filaments and by the topology of the network.

In the classical elastic model, the membrane response to a given stress is assumed to be linear for small deformations and is characterized by three elastic moduli: the area expansion modulus K , the shear modulus μ , and the bending stiffness B . The bending stiffness ranges from a few $k_B T$ to

a few tens of $k_B T$ (Evans, 1983; Peterson *et al.*, 1992), and is too small to have a noticeable influence on the membrane response to an in-plane stress. The area expansion modulus of the RBC membrane is determined by the total amount of lipids in the bilayer, and the membrane dilation under stretching is usually small. By comparison, the deformation under a shear stress is quite important and is mainly controlled by the elastic response of the spectrin network (Evans, 1973).

The elastic moduli K and μ of the membrane have been measured by various techniques, among which the micropipette is the most commonly used (Evans, 1973; Hochmuth and Waugh, 1987; Engelhardt and Sackmann, 1988; Lelièvre *et al.*, 1995). This method leads to $\mu = 4\text{--}10 \mu\text{N/m}$ and $K = 300\text{--}500 \text{ mN/m}$. More recently, by pulling on the membrane with optical tweezers, we measured $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$ (Hénon *et al.*, 1999). With this last technique, the strains are smaller than with micropipettes, which may explain the difference. However, other works based on the analysis of the local amplitude of membrane flickering can be interpreted only if μ has even a much smaller value (Peterson *et al.*, 1992).

The present work focuses on the elastic properties of the membrane skeleton, characterized by its own area expansion modulus K_C and shear modulus μ_C . Many theoretical studies, and a few experimental ones, have been devoted to this question in the past. The goal is to separate, in the elastic behavior of the entire RBC membrane, the respective roles of the lipid bilayer and of the spectrin network. Depending on whether the skeleton is free or bound to the lipid bilayer, theoretical approaches are slightly different. For a triangular network constrained to in-plane deformations, analytical and numerical works have predicted that the ratio K_C/μ_C should be equal to 2 in the small stress regime (Kantor and Nelson, 1987; Boal *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1996). This result holds whether the spectrin strands are

Received for publication 16 October 2000 and in final form 28 March 2001.

Address reprint requests to Dr. Sylvie Hénon, LBHP Case 7056, 2 Place Jussieu, F-75251 Paris Cedex 5, France. Tel.: 33-1-4427-7782; Fax: 33-1-4427-4335; E-mail: henon@ccr.jussieu.fr.

© 2001 by the Biophysical Society

0006-3495/01/07/43/14 \$2.00

modeled as Hookean springs or are submitted to square-well interactions. Moreover, simulations have shown that the elastic moduli decrease when adding topological defects, either by increasing the number of high-order oligomers or by decreasing the coordinance number per complex junction (Hansen et al., 1997). However, an unbound network fluctuates out of its average plane, which reduces the average distance between vertices and modifies the elastic coefficients as compared to a plane network. By performing Monte Carlo simulations on a network freely fluctuating in a half-space, Boal (1994) has shown that the ratio of the in-plane elastic moduli may drop to 1.7. Furthermore, it has been shown that the Poisson ratio of a two-dimensional network may become negative at large stress (Aronovitz and Lubensky, 1988; Boal et al., 1993), but this regime falls out of most of the usual experimental conditions (including the ones reported in this paper).

In earlier experiments, the RBC membrane was deformed by aspiration into a micropipette. Although the skeleton remains bound to the membrane in this case, it can freely slide along the lipid bilayer and therefore sustains both shear and expansion strains. Mohandas and Evans (1994) have proposed that the overall shear modulus μ of the membrane is related through a serial coupling to the area expansion K_C and shear modulus μ_C of the skeleton, as $\mu \sim (\mu_C K_C) / (\mu_C + K_C)$. According to this formula, one expects μ and μ_C to have the same order of magnitude. Independently, Stokke et al. (1986) predicted that the projection length aspirated inside the pipette strongly depends on the ratio μ/K_C . Moreover, by analyzing fluorescence images of the spectrin distribution inside the pipette, Discher et al. (1994) inferred a first measurement of the ratio K_C/μ_C , close to 2.

Qualitative behavior of a free, freshly extracted RBC membrane skeleton has also been reported in the literature (Svoboda et al., 1992). In that study, a membrane skeleton trapped with optical tweezers was extracted under a microscope and deformed in a flow field. From the extent of thermal undulations and from the skeleton deformability, the skeleton bending rigidity appeared to be markedly lower than that of the intact RBC membrane. Moreover, a great dependence of the skeleton size on the ionic strength was highlighted.

In this work we present new experiments and data concerning the elastic behavior of the isolated membrane skeleton. We measure both K_C and μ_C by means of optical tweezers. Our experimental setup does not allow us to measure the skeleton bending stiffness B_C . Small silica beads bound to the skeleton are used as handles to seize and manipulate it after dissolving the lipid bilayer with a detergent (Yu et al., 1973). By applying calibrated stresses to the skeleton through the beads and simultaneously measuring its deformation, we can determine K_C and μ_C . In a low osmolarity buffer, we find $\langle K_C \rangle = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$, $\langle \mu_C \rangle = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$, and $\langle K_C/\mu_C \rangle = 1.9 \pm 1.0$. These values are

in good agreement with the expected ones. The skeleton shear modulus μ_C has the same order of magnitude as the membrane shear modulus μ measured by optical tweezers (Hénon et al., 1999). The ratio $\langle K_C/\mu_C \rangle$ is close to values obtained by theoretical and numerical studies (Boal, 1994; Hansen et al., 1996). We also measure K_C and μ_C in an isotonic buffer to evaluate the influence of the ionic strength. Finally, we characterize the time evolution of the skeleton stiffness in either low osmolarity or isotonic buffers.

MATERIALS AND METHODS

Optical tweezers

Our optical tweezers setup has been described elsewhere (Hénon et al., 1999). Schematically, tweezers are made by focusing a high-power infrared laser beam (Nd:YAG, $\lambda = 1.064 \mu\text{m}$, $P_{\text{max}} = 600 \text{ mW}$) through the immersion objective ($\times 100$, $\text{NA} = 1.25$) of a standard optical microscope. At the converging point, the electric field is large enough to trap small dielectric objects, in the present work spherical silica beads, $2.1 \mu\text{m}$ in diameter. The trap is located in the same plane as the observation plane of the microscope. Two galvanometric mirrors having perpendicular axes are used to control the trap position or to create multiple traps by rapidly commuting the focusing point between different positions at frequency f_c ($f_c \sim 200 \text{ Hz}$). They are monitored by a numerical program coupled to the NIH Image analysis software. This program can handle the positions of multiple traps (up to four).

The restoring force F exerted on a trapped bead depends on the departure $\Delta x = x - x_0$ of the bead position x from the trap center x_0 . Following Simmons et al. (1996), $F(\Delta x)$ is calibrated by applying a known viscous drag force to the bead. Practically, the calibration chamber is made of a microscope slide and coverslip separated by a plastic film spacer and is mounted on a piezoelectric stage (model P-780; PolytecPI, Waldbronn, Germany). The chamber is filled with a suspension of beads in pure water and moved back and forth at constant velocity v in the horizontal plane, while one bead is trapped by the laser beam held at a fixed position x_0 . Because the steady-state regime is reached in a few microseconds and the bead inertia is negligible, the trapping force $F(\Delta x)$ exactly equilibrates the viscous drag force $F' = 6\pi\eta Rv$, where $R = 1.05 \mu\text{m}$ is the bead radius and $\eta = 0.9 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$ is the water viscosity at the experimental temperature $T \sim 25^\circ\text{C}$. A correction is made to the viscous drag force to take into account the finite distance from the bead to the top or bottom of the chamber (Svoboda and Block, 1994). The bead displacement in the flow field Δx is measured from the microscope image. We find that $F(\Delta x)$ is proportional to Δx at least for $\Delta x < 1 \mu\text{m}$, meaning that the trap is harmonic in this range. In a good approximation, F is found proportional to the incident laser power P , so that one can write:

$$F = \alpha_n A P \Delta x \quad (1)$$

We measured the coefficient A for a single trap: $A = 0.26 \text{ pN mW}^{-1} \mu\text{m}^{-1}$. The numerical constant α_n depends on the number n of traps. By definition, α_1 is equal to 1, and we found $\alpha_2 = 0.40$, $\alpha_3 = 0.25$, $\alpha_4 = 0.18$. We noticed no dependence of A and α_n on the commuting frequency f_c in the range $150 \text{ Hz} < f_c < 300 \text{ Hz}$. Their dependence with the distance h between the trap and the top coverslip is weak in our experimental situation ($10 \mu\text{m} < h < 60 \mu\text{m}$).

Flow chamber

A schematic drawing of the stainless steel flow chamber is shown in Fig. 1. The flow is limited by a coverslip and a cylindrical lens. The chamber

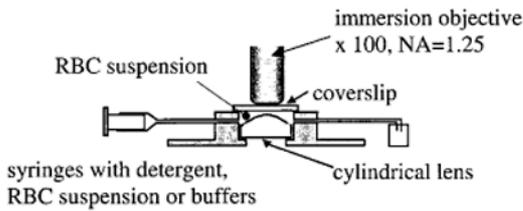


FIGURE 1 Scheme of the stainless steel flow chamber, placed on the stage of the microscope. The RBCs are trapped in the narrow channel ($e \sim 60 \mu\text{m}$) limited by the cylindrical lens and the coverslip. The immersion objective is used both for the observation and the optical tweezers focusing. Several holes allow local injection of buffers, detergent solution, and RBC suspension through small polyethylene catheters (not shown).

inner volume is ~ 0.7 ml. The lens has negligible effect on the path of optical rays, its role is to make a narrow channel ($50 \mu\text{m} < e < 80 \mu\text{m}$) to trap the RBCs as close as possible to the top coverslip. The chamber is placed on the microscope stage and is illuminated from below for bright-field observation. The laser beam is focused into the flow field through the top objective and coverslip. Several holes are drilled in the chamber walls to inject the RBCs' suspension, the buffers, and the detergent solution through small polyethylene catheters ($300 \mu\text{m}$ in diameter).

Solutions are injected at controlled rates using syringe pumps. A thermocouple probe measures the temperature in the chamber. The cylindrical lens is coated with octadecyltrichlorosilan (Sigma, Paris, France) after a meticulous cleaning (Decon 90 at 60°C for 20 min, H_2O_2 with H_2SO_4 for 10 min, and O_3 for 1 h). Moreover, 2 ml of a solution of 50 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma A 4503) diluted in phosphate buffered saline (PBS; Sigma P 4417), are injected at the beginning of the manipulation. This treatment prevents beads, erythrocytes, and (partially) freshly extracted skeletons from sticking to the lens.

Extraction of the skeleton

Fresh blood is obtained by fingertip needle prick. Red blood cells are suspended in PBS, then washed three times by centrifugation. Silica microbeads (~ 1 bead per RBC) are added to the suspension. After incubating for 1 h at 4°C , the beads stick spontaneously and irreversibly to the RBC membrane (from zero to five beads bind to each RBC). After adding a small amount of BSA (1 mg/ml), the suspension is slowly injected into the flow chamber. We select an RBC with three beads attached to its periphery and trap the beads with three optical tweezers (see Fig. 2). Although no special treatment is made to obtain ghosts, most of the cells carrying several beads appear partially lysed when entering into the flow chamber: the shear stresses applied to the membrane by the beads during the injection are probably large enough to tear it. Consequently, the skeletons are extracted from ghosts most of the time.

Two different kinds of manipulation are held: the first one in a hypotonic buffer (5 mM NaCl, 5 mM K_2HPO_4 , pH 7.4, 25 mOsm/kg) and the second one in an isotonic buffer (PBS: 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl, and 137 mM NaCl, pH 7.4, 300 mOsm/kg). For the low osmolarity experiments, once the RBC is seized by the three beads, the hypotonic buffer is slowly injected for 5 min to lower the osmolarity of the medium. Then the detergent solution (Triton X-100 in hypotonic buffer $\sim 1\text{--}3\%$ in volume) is injected until bilayer dissolution. Afterward, the detergent is rinsed out with a second injection of hypotonic buffer for 10 min. The injected volume roughly equals the chamber volume, so that the osmolarity is stabilized at 25 mOsm/kg. Isotonic buffer experiments begin by the injection of the detergent (Triton X-100 in PBS $\sim 1\text{--}3\%$ in volume). After the membrane dissolution, PBS is injected for 5 min to rinse out the detergent.

We have performed independent tests to check that the membrane dissolution is totally achieved. Following the method described by Discher et al. (1994), we have labeled the membrane bilayer with a fluorescent lipophilic probe (DIOC18, from Molecular Probes, Eugene, OR), and we have checked that the fluorescence signal vanishes completely in a few seconds after the beginning of the detergent injection.

We start to manipulate the membrane skeleton 5 or 10 min after its extraction. All the manipulations take place at 25°C , measured in the flow chamber. We cannot measure the actual temperature of the skeleton, but we assume that the local heating due to the tweezers is negligible (Liu et al., 1995; Hénon et al., 1999) because the absorption of the skeleton proteins at $\lambda = 1.064 \mu\text{m}$ is very low.

Once the bilayer is dissolved, the RBC is no longer visible in bright field, but we observe in most cases that the beads cannot be moved independently; this indicates that the beads remain linked together through the skeleton and that their adherence sites on the RBC are most of the time transmembrane proteins linked to the skeleton, i.e., glycoporphin or band 3. Several experiments are performed after labeling the F-actin with a fluorescent probe (phalloidin-TRITC) to check that the skeleton remains intact after extraction and to visualize it during its deformation (see corresponding section and Fig. 5). Although it is reported that the labeling procedure does not change the elastic properties of the skeleton (Discher et al., 1994), all the measurements are realized without the fluorescent labeling.

Deformations of the skeleton

The skeleton is deformed by varying the distances between the traps. Three different kinds of deformation are carried out. By increasing the distances between the traps simultaneously in two orthogonal directions, we generate a deformation close to pure area expansion. By increasing the distance in only one direction, we exert both area expansion and shear. The third kind of deformation is obtained by increasing the distance in one direction and decreasing it in the other direction. Generally, this leads to a deformation close to pure shear. We increase the distance between the traps by steps of $\sim 0.1 \mu\text{m}$. Within a few minutes, we submit the skeleton to several cycles corresponding to the three different kinds of deformation, each cycle being made of five to eight successive steps of increasing stress, followed by a symmetric decrease. Because the skeleton is invisible, its deformation is interpolated from the bead positions (see the following section and Theory). To study a possible time evolution (up to 45 min after extraction), several sets of measurements alternate with 10–15-min waiting periods.

Visualization, force measurements, and data analysis

Visualization and image recording are made with a video camera (model SIT 68, Dage-MTI Inc., Michigan City, IN) connected to a Macintosh computer. For each configuration of the traps, an image is recorded. The position of the center of each bead is located with the NIH Image analysis software, with an accuracy of 50 nm. To determine the traps' positions, free isolated beads are trapped afterward at equilibrium in each of the three tweezers for several trap configurations corresponding to the actual cycles of the skeleton deformation; in these conditions, the positions of the bead centers and of the traps are identical. The calibration formula 1 gives the force exerted on each bead during the skeleton manipulation. For all measurements, the laser power is set to 150 mW; the force applied to each bead varies from 1 to 8 pN. The uncertainty comes both from the determination of the bead and trap relative positions and from the accuracy on force calibration. We evaluate the final uncertainty on the force measurements to $\sim 15\%$. Similarly, the uncertainty on the beads positions determines the error bars on the skeleton deformation (10% on average). To calculate the

strain, the shear and area expansion stress, and finally to get the moduli μ_C and K_C , the data analysis and graphic Kaleidagraph software (Synergy Software, Reading, PA) is used. The corresponding algebra is developed in the Theory section.

Membrane skeleton labeled with phalloidin-TRITC

Control images of the actual deformation of the skeleton are done by labeling F-actin with phalloidin-TRITC (Sigma, P1951). The method used is described in Discher et al. (1994). It uses a cold, hypotonic lysis, so that fluorescent probes can enter the cell and bind internally. Briefly, 2.5 μl phalloidin-TRITC are dissolved in 20 μl cold lysis buffer (10 mM sodium phosphate, pH 7.4). Cold, packed red cells (5 μl) are added and after 10 min, the suspension is adjusted to 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , and incubated at 37°C for 30 min. Then, the RBCs are washed by centrifugation and the silica beads are added.

THEORY

In this section we determine quantitative relations, involving the elastic moduli K_C and μ_C , between the forces exerted by each of the three trapped beads and the stresses and strains applied to the membrane skeleton.

We consider the membrane skeleton as a continuous, homogeneous, and isotropic elastic medium. Although out-of-plane fluctuations may be allowed, the skeleton is assumed to be flat, on average, as soon as it is put under a slight tension. Then its in-plane elastic properties are characterized by a two-dimensional area expansion modulus K_C and shear modulus μ_C . These approximations are reasonable because both the membrane thickness (a few nanometers) and the mesh size (~ 200 nm) are small compared to the scale of experimental deformations (a few micrometers). We also neglect the bending elasticity. Finally, we only consider small deformations, so that linear elastic theory applies.

A scheme of the deformed and undeformed skeleton is represented in Fig. 2. It is assumed that the three trapping forces \mathbf{F}_A , \mathbf{F}_B , and \mathbf{F}_C are exerted at the centers A, B, and C of the beads. We restrict the study of the skeleton deformation in the region limited by the triangle ABC. Calculating the exact strain and stress everywhere would require extra numerical analysis. In a simplified analytical approach, we assume that the stress (and the strain) is homogeneous over the region ABC, so that it keeps its triangular shape, becoming A'B'C' under tension. We are aware of the fact that the actual stress may not be homogeneous everywhere, especially in the regions where the skeleton sticks to the beads. This is a source of uncertainty in the determination of the elastic moduli. Images of deformed fluorescent RBCs were precisely taken to evaluate this effect, from which we conclude that the assumption of a homogeneous stress is reasonable.

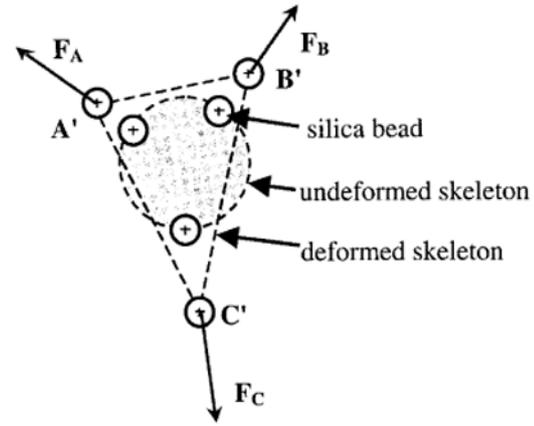


FIGURE 2 Principle of the experimental procedure (not to scale). An RBC is seized by trapping each of the three silica beads bound to its periphery in optical tweezers. A detergent solution is injected to dissolve the lipid bilayer. The beads remain stuck to the skeleton. The skeleton is deformed by varying the distances between the traps. Its deformation, interpolated from the beads positions, is a superposition of shear and area expansion. The forces exerted on the beads are calculated with calibration formula 1.

In the linear theory of elasticity, Hooke's law describes the relation between the two-dimensional 2×2 stress tensor $[\boldsymbol{\sigma}]$ and strain tensor $[\mathbf{u}]$. In the principal system of coordinates, in which these tensors are diagonal, this relation is written as:

$$\sigma_{XX} = K_C(u_{XX} + u_{YY}) + \mu_C(u_{XX} - u_{YY}) = \sigma_e + \sigma_s \quad (2a)$$

$$\sigma_{YY} = K_C(u_{XX} + u_{YY}) - \mu_C(u_{XX} - u_{YY}) = \sigma_e - \sigma_s \quad (2b)$$

$$\sigma_{XY} = 2\mu_C u_{XY} = 0$$

Here σ_e and σ_s are, respectively, defined as the pure area expansion stress and the pure shear stress components. To analyze the experiments, the procedure is the following: one has to relate on the one hand the forces \mathbf{F}_A , \mathbf{F}_B , and \mathbf{F}_C to the stress components σ_e and σ_s , and on the other hand the deformation of the triangle ABC into A'B'C' to the strain components u_{XX} and u_{YY} . Then K_C and μ_C are determined by Eqs. 2a and 2b.

The first step consists of splitting the triplet $(\mathbf{F}_A, \mathbf{F}_B, \mathbf{F}_C)$ into two triplets of forces $(\mathbf{F}_e) = (\mathbf{F}_{eA}, \mathbf{F}_{eB}, \mathbf{F}_{eC})$ and $(\mathbf{F}_s) = (\mathbf{F}_{sA}, \mathbf{F}_{sB}, \mathbf{F}_{sC})$, applied to the vertices A, B, and C, and respectively generating a pure area expansion stress and a pure shear stress. This splitting can be made through a geometrical construction detailed in the Appendix. To summarize it, one projects $\mathbf{F}_A = \mathbf{F}_{AB} + \mathbf{F}_{AC}$ along the two directions normal to AB and AC (see Fig. 3) and makes equivalent projections in B and C. The triplets (\mathbf{F}_e) and (\mathbf{F}_s)

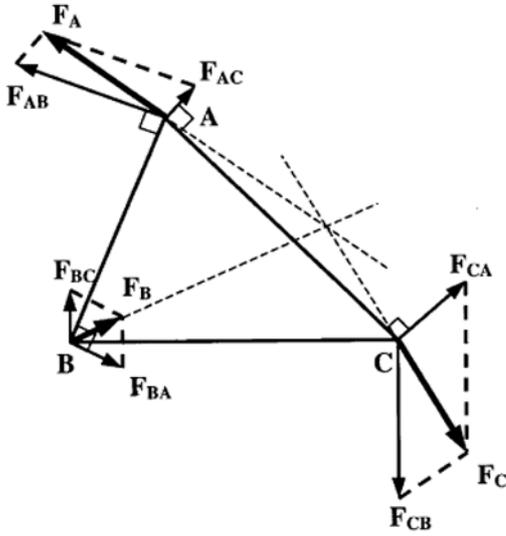


FIGURE 3 Construction used to separate the triplet of forces (\mathbf{F}) = (\mathbf{F}_A , \mathbf{F}_B , \mathbf{F}_C) into two triplets of forces (\mathbf{F}_e) = (\mathbf{F}_{eA} , \mathbf{F}_{eB} , \mathbf{F}_{eC}) and (\mathbf{F}_s) = (\mathbf{F}_{sA} , \mathbf{F}_{sB} , \mathbf{F}_{sC}), respectively, generating a pure area expansion and a pure shear stress. $\mathbf{F}_A = \mathbf{F}_{AB} + \mathbf{F}_{AC}$ is projected along the two directions normal to AB and AC. Equivalent projections are drawn in B and C. The triplets (\mathbf{F}_e) and (\mathbf{F}_s) are explained in the text.

are then given by:

$$\mathbf{F}_{eA} = -\frac{\mathbf{F}_{BC} + \mathbf{F}_{CB}}{2}$$

$$\mathbf{F}_{sA} = \frac{\mathbf{F}_A - \mathbf{F}_{BA} - \mathbf{F}_{CA}}{2} = \mathbf{F}_A - \mathbf{F}_{eA} \quad (3a)$$

$$\mathbf{F}_{eB} = -\frac{\mathbf{F}_{AC} + \mathbf{F}_{CA}}{2}$$

$$\mathbf{F}_{sB} = \frac{\mathbf{F}_B - \mathbf{F}_{CB} - \mathbf{F}_{AB}}{2} = \mathbf{F}_B - \mathbf{F}_{eB} \quad (3b)$$

$$\mathbf{F}_{eC} = -\frac{\mathbf{F}_{AB} + \mathbf{F}_{BA}}{2}$$

$$\mathbf{F}_{sC} = \frac{\mathbf{F}_C - \mathbf{F}_{AC} - \mathbf{F}_{BC}}{2} = \mathbf{F}_C - \mathbf{F}_{eC} \quad (3c)$$

The relations among σ_e , σ_s , (\mathbf{F}_e), and (\mathbf{F}_s) are:

$$\sigma_e = 2 \frac{F_{eA}}{BC} = 2 \frac{F_{eB}}{AC} = 2 \frac{F_{eC}}{AB}$$

(see Eq. A8)

$$\sigma_s = 2 \frac{F_{sA}}{BC} = 2 \frac{F_{sB}}{AC} = 2 \frac{F_{sC}}{AB}$$

(see Eqs. A10–A12)

The strain may be calculated from the measured deformation of the triangle ABC into A'B'C'. The pure area expansion contribution $u_{xx} + u_{yy}$ is equal to the relative surface increase $\Delta S/S$ of the triangle. The area expansion modulus is given by $\sigma_e = K_C \Delta S/S$.

The shear deformation is defined as $u_{xx} - u_{yy} = \partial u_x / \partial x - \partial u_y / \partial y$, where \mathbf{u} represents the local displacement. It can easily be calculated in the principal system of coordinates (\mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y) defined in the Appendix, in which $\partial u_x / \partial Y = \partial u_y / \partial X = 0$. For instance, in this system of coordinates, the side $\mathbf{AB} = X\mathbf{e}_x + Y\mathbf{e}_y$ becomes $\mathbf{A'B'} = X'\mathbf{e}_x + Y'\mathbf{e}_y$ and the shear deformation is given by:

$$u_{xx} - u_{yy} = \frac{X' - X}{X} - \frac{Y' - Y}{Y} \quad (4)$$

The shear modulus is obtained by $\sigma_s = \mu_C(u_{xx} - u_{yy})$.

To conclude this section, it is important to point out that the membrane skeleton is a closed surface and that its deformation depends on the relative positions of the beads at its periphery. If the plane defined by the three beads is a plane of symmetry for the RBC, the forces are symmetrically exerted on both sheets of the skeleton (Fig. 4 A). On the contrary, if it is not a plane of symmetry, only one sheet (the top or the bottom one) is deformed (Fig. 4 B). The

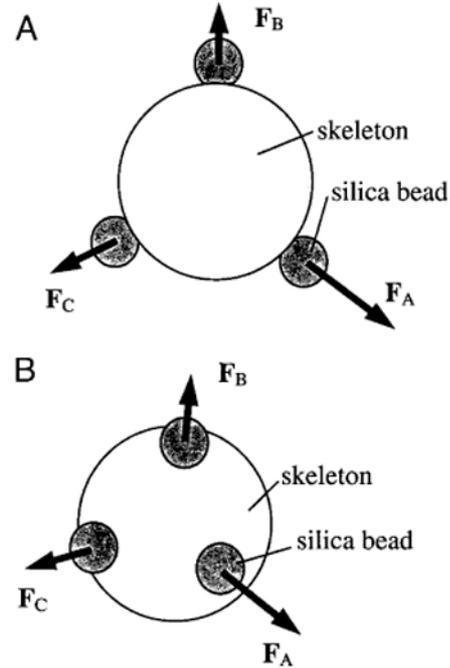


FIGURE 4 The number of sheets of the skeleton that are deformed depends on the position of the beads. (A) If the beads are in a plane of symmetry for the skeleton, the upper and lower sheets of the skeleton are deformed. (B) If the beads are not in a plane of symmetry, only one sheet is deformed.

above theoretical presentation is restricted to a single sheet, but the possibility of pulling simultaneously on both sheets will be taken into account in the Results section.

RESULTS

Visualization of the skeleton

Control images of the skeleton after its extraction are done by labeling F-actin with phalloidin-TRITC, allowing visualization of the skeleton during its deformation. Experiments are carried out in hypotonic and isotonic buffer. Fig. 5 shows two images taken during the first set of deformations in isotonic buffer. Fig. 5 *A* is taken with low stress applied to the skeleton, Fig. 5 *B* shows the same skeleton at higher stress. They confirm that the skeleton remains stuck to the beads after the dissolution of the lipid bilayer. Moreover, the deformed skeleton globally keeps a triangular shape on both images: no local excessive stretching is visible in Fig. 5 *B*, especially in the regions where the beads are attached. This indicates that, in a first approximation, the stress is homogeneous over the deformed area and validates the model proposed in the Theory section. Images of de-

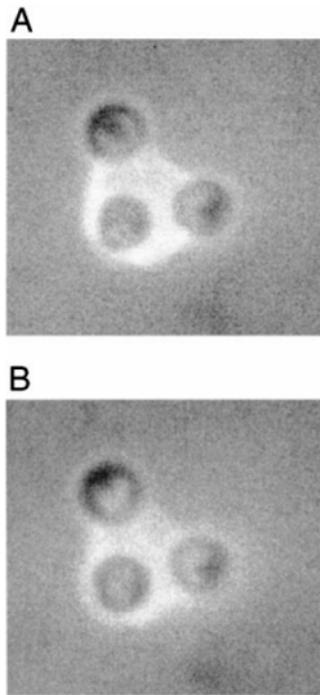


FIGURE 5 Two images of a skeleton visualized by labeling F-actin with phalloidin-TRITC, taken during the first set of deformations in an isotonic buffer. In (*A*) a low stress is applied to the skeleton, and (*B*) shows the same skeleton at higher stress. The skeleton roughly keeps a triangular shape, meaning that the approximation of homogeneous strain is reasonable.

formed skeletons in hypotonic buffer lead to the same conclusion.

Measurements in low osmolarity buffer

We present here measurements held in a low osmolarity buffer (25 mOsm/kg) without adenosine triphosphate (ATP) and at room temperature, i.e., $\sim 25^\circ\text{C}$. In this section we report the results of the first set of skeleton manipulations, which starts 10 min after its extraction and takes place within a couple of minutes. A low osmolarity buffer is used to prevent the shrinkage of the skeleton in the presence of screening charges, as reported by Svoboda et al. (1992).

Before extraction, the RBC membrane is maintained under a slight tension by pulling on the beads with the optical

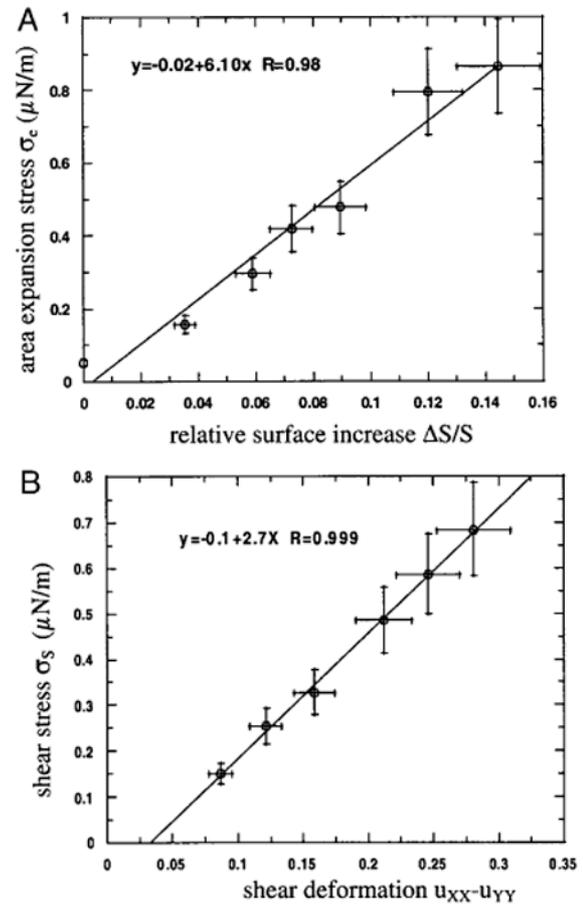


FIGURE 6 Stress versus strain plotted for a typical deformation of a freshly extracted skeleton in low osmolarity buffer (25 mOsm/kg). (*A*) Pure area expansion component σ_e versus area dilation $\Delta S/S$; (*B*) pure shear component σ_s versus shear strain $u_{xx} - u_{yy}$. Notice the linear behavior in both cases, in agreement with linear elasticity model. The respective slopes give the area expansion modulus K_C and the shear modulus μ_C .

tweezers. When the front of the detergent solution arrives on the trapped RBC, the membrane begins to deform. Then, within a second, the beads move back to the center of the traps while the contour of the RBC disappears. This means that, in hypotonic buffer, the skeleton slightly expands as the lipid bilayer is dissolved (see Discussion). Fig. 6 A and B show typical results obtained for a deformation consisting of increasing the distance between the traps along one direction while the distance along the perpendicular one remains constant. This deformation generates both area expansion and shear strains. Graph 6 A is a plot of the area expansion stress σ_e versus the relative surface increase $\Delta S/S$. Graph 6 B shows the shear stress σ_s versus the shear strain $u_{XX} - u_{YY}$. We observe a linear relation in both cases, which means that the skeleton elastic behavior is correctly described by Hooke's law. On graph 6 A, the area increases by up to 15%. The slope gives the area expansion modulus, here $K_C = 6.1 \mu\text{N/m}$. On graph 6 B, the maximum deformation is 30%, and the slope gives the shear modulus $\mu_C = 2.7 \mu\text{N/m}$.

Table 1 reports the values of the shear and area expansion moduli, obtained for 19 different skeletons in the 25 mOsm/kg buffer. Each value is an average over several measurements corresponding to different deformations (usually six) of the same skeleton. The values of the elastic coefficients, averaged over the 19 skeletons, are $\langle K_C \rangle = 9.0 \pm 3.6 \mu\text{N/m}$, $\langle \mu_C \rangle = 5.2 \pm 2.1 \mu\text{N/m}$, and $\langle K_C/\mu_C \rangle = 2.3 \pm 1.1$. Notice the important dispersion: $3.5 \mu\text{N/m} < K_C < 14.6 \mu\text{N/m}$, $1.8 \mu\text{N/m} < \mu_C < 9.6 \mu\text{N/m}$, and $1.0 < K_C/\mu_C < 4.8$. It can be explained by the fact that we do not

control the number of sheets of the skeleton that are actually deformed. In a simple description, the forces are exerted either on a single sheet of the skeleton or on both sheets, depending on the bead positions (see Fig. 4). The actual situations may be more complex and, for instance, the deformation of the same skeleton may concern either the two sheets or only a single one, depending on the direction of the exerted forces. Of course, when two sheets are deformed, one expects to measure apparent elastic moduli twice as much as for a single sheet. To take this into account, we have plotted in Fig. 7, A and B, the values obtained for each single deformation (77 measurements for K_C and 76 for μ_C). As expected, the stack histograms $N(K_C)$ and $N(\mu_C)$ present two maxima. For instance, in Fig. 7 A, the first maximum is at $K_C \sim 4\text{--}6 \mu\text{N/m}$ and the second one at $K_C \sim 9\text{--}11 \mu\text{N/m}$. The ratio between these values is close to 2, which supports our assumption about the deformation of either one or two sheets. To be more quantitative, we fit the histogram by a sum of two Gaussian curves:

$$N(K_C) = A_1 \exp\left(-\frac{(K_C - \langle K_C \rangle)^2}{2\Delta K_{C1}^2}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{(K_C - 2\langle K_C \rangle)^2}{2\Delta K_{C2}^2}\right) \quad (5)$$

where A_1 and A_2 are two constants, ΔK_{C1} and ΔK_{C2} the standard deviations. The maximum of the second Gaussian function is set to twice the first one. The same analysis is performed for the shear modulus μ_C , for which the stack

TABLE 1 Area expansion modulus and shear elastic modulus measured for 19 skeletons in low osmolarity buffer (25 mOsm/kg) without ATP

Skeleton No.	Area Expansion Modulus K_C ($\mu\text{N/m}$)	Shear Modulus μ_C ($\mu\text{N/m}$)	K_C/μ_C
1	$7.1 \pm 3.6(6)$	$3.7 \pm 2.4(6)$	$2.0 \pm 0.6(6)$
2	4.4 (1)	$6.3 \pm 1.3(2)$	—
3	$12.3 \pm 5.4(3)$	—	—
4	$10.2 \pm 3.8(5)$	$8.8 \pm 3.9(4)$	$1.5 \pm 0.8(4)$
5	$8.4 \pm 2.7(6)$	$4.5 \pm 0.8(4)$	$1.9 \pm 1.1(4)$
6	$4.1 \pm 1.3(6)$	—	—
7	$9.3 \pm 2.6(6)$	$4.8 \pm 1.5(6)$	$2.0 \pm 0.2(6)$
8	$11.9 \pm 6.1(4)$	$8.1 \pm 3.3(4)$	—
9	$6.8 \pm 1.5(8)$	$4.5 \pm 2.7(8)$	$2.0 \pm 1.3(8)$
10	$3.5 \pm 1.1(7)$	$3.9 \pm 1.4(7)$	$1.1 \pm 0.8(7)$
11	$9.7 \pm 3.7(3)$	$4.0 \pm 1.5(2)$	$2.0 \pm 0.1(2)$
12	$14.6 \pm 4.8(4)$	$7.3 \pm 4.6(6)$	$3.4 \pm 2.0(3)$
13	$14.0 \pm 2.2(3)$	$4.5 \pm 1.4(5)$	$3.0 \pm 1.2(3)$
14	$6.5 \pm 0.5(4)$	$3.5 \pm 1.8(4)$	$2.3 \pm 1.1(4)$
15	$13.9 \pm 1.4(7)$	$9.6 \pm 3.2(3)$	$1.5 \pm 0.6(3)$
16	—	$5.5 \pm 3.7(3)$	—
17	$12.2 \pm 1.7(5)$	$3.6 \pm 1.2(4)$	$3.7 \pm 0.8(4)$
18	$4.3 \pm 3.3(4)$	$4.1 \pm 0.9(4)$	$1.0 \pm 0.7(4)$
19	$8.7 \pm 3.6(6)$	$1.8 \pm 0.6(4)$	$4.8 \pm 0.7(4)$
Average	9.0 ± 3.6	5.2 ± 2.1	2.3 ± 1.1

The values are averaged over several deformations exerted on the same skeleton (number indicated in parentheses).

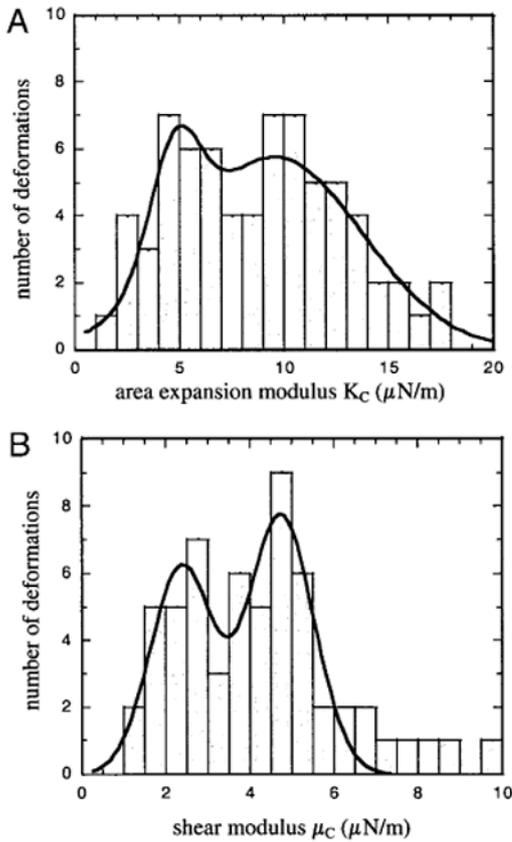


FIGURE 7 Stack histograms of the elastic moduli K_C (A) and μ_C (B) obtained for each deformation (77 measurements for K_C and 76 for μ_C on 19 different skeletons) right after extraction in low osmolarity buffer. The histograms present two maxima: the first one corresponds to the deformation of a single sheet of the skeleton and the second one of both sheets. The values of the two maxima are in a 2:1 ratio. The best fit with a double Gaussian is also represented.

histogram also shows two maxima at $\mu_C \sim 1.5\text{--}3 \mu\text{N/m}$ and $\mu_C \sim 4.5\text{--}5.5 \mu\text{N/m}$ (Fig. 7 B). From the fits we deduce the average values of elastic moduli for a single sheet $\langle K_C \rangle = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$ and $\langle \mu_C \rangle = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$ (Table 2). As expected, the skeleton shear modulus and the area expansion modulus have the same order of magnitude as the intact membrane shear modulus μ .

Fig. 8 represents a stack histogram of the ratio K_C/μ_C , K_C and μ_C being measured from the same deformation. From the 19 studied skeletons, 65 deformations give both μ_C and K_C . As expected, there is only one maximum. Fitting the stack histogram with a single Gaussian curve gives the average value $\langle K_C/\mu_C \rangle = 1.9 \pm 1.0$. This value is in agreement with the predictions of theoretical and numerical studies performed on networks either confined in two dimensions (Kantor and Nelson, 1987: $K_C/\mu_C = 2$; Boal et al.,

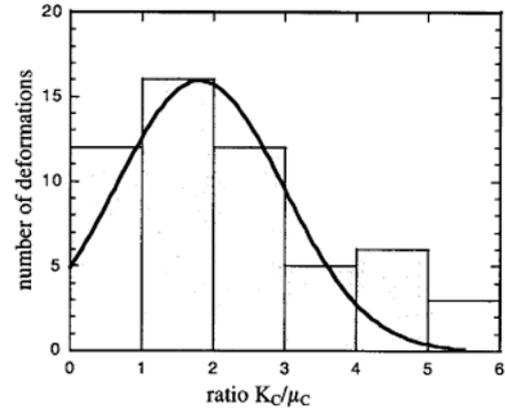


FIGURE 8 Stack histogram of the ratio K_C/μ_C , K_C , and μ_C being measured from the same deformation of a skeleton, right after extraction in low osmolarity buffer. The best Gaussian fit is shown. The center value is $\langle K_C/\mu_C \rangle = 1.9 \pm 1.0$. This value is close to the predictions of theoretical and numerical studies for a two-dimensional triangular network of identical springs.

1993: $K_C/\mu_C = 2$; Hansen et al., 1997: $K_C/\mu_C \leq 2$) or fluctuating in three dimensions (Boal, 1994: $K_C/\mu_C = 1.7$).

Measurements in isotonic buffer

We present here measurements held in an isotonic buffer without ATP at room temperature, i.e., $\sim 25^\circ\text{C}$. The skeleton manipulation starts 5 min after its extraction. We apply the same kind of deformations as in the low hypotonic experiments.

Just after the lipid bilayer dissolution, the beads spontaneously move away from the trap centers, due to a partial shrinking of the skeleton (see Discussion). After rinsing out by a buffer injection the tension of the skeleton is partially released by decreasing the distance between the traps, and deformations can be held. During the manipulations, the optical tweezers keep the skeleton under slight tension to prevent further shrinkage as much as possible.

For each deformation we plot the expansion stress σ_e versus the relative surface increase $\Delta S/S$ and the shear stress σ_s versus the shear strain $u_{XX} - u_{YY}$. We obtain the same kind of graphs as the ones shown in Fig. 6, A and B. The surface increases by up to 15% and linear variations are observed in both cases. The slopes give the elastic moduli.

The experiments in isotonic buffer were held on 7 skeletons, 44 different deformations for K_C and 35 for μ_C . The average values over all the skeletons are $\langle K_C \rangle = 22.6 \pm 4.5 \mu\text{N/m}$, $\langle \mu_C \rangle = 7.9 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$, and $\langle K_C/\mu_C \rangle = 2.9 \pm 0.6$. We have plotted in Fig. 9, A and B the stack histograms of K_C and μ_C obtained for each deformation. Contrary to the measurements in low osmolarity buffer, there is no clear evidence for two maxima on the stack histograms. It is

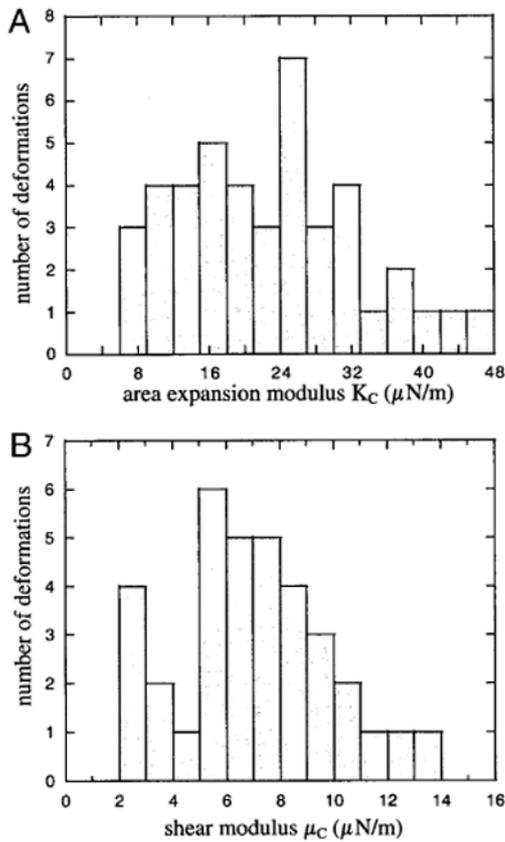


FIGURE 9 Stack histograms of the elastic moduli K_C (A) and μ_C (B) obtained for each deformation (44 measurements for K_C and 35 for μ_C on seven different skeletons) right after extraction in isotonic buffer. Contrary to the measurements in low osmolarity buffer, there is no clear evidence for two maxima. In this case the two sheets of the skeleton may be stuck together, because the high ionic strength of the medium screens the repulsive interaction between the spectrin filaments.

likely that the two sheets of the skeleton stick together because the high ionic strength of the medium screens the repulsive interaction between spectrin filaments. Fitting the K_C and μ_C stack histograms by a single Gaussian function

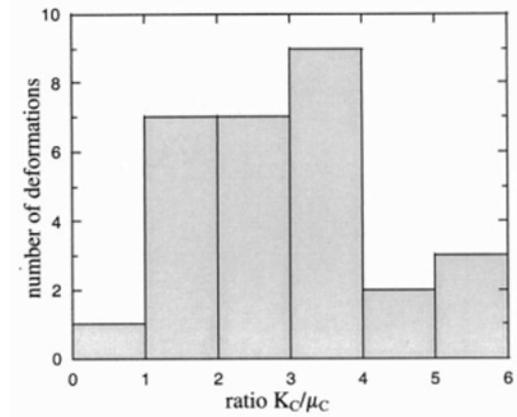


FIGURE 10 Stack histogram of the ratio K_C/μ_C , K_C , and μ_C being measured from the same deformation of a skeleton, right after extraction in isotonic buffer. The average value is $\langle K_C/\mu_C \rangle = 3.0 \pm 1.3$.

gives $\langle K_C \rangle = 21.3 \pm 10.5 \mu\text{N/m}$ and $\langle \mu_C \rangle = 6.7 \pm 3.0 \mu\text{N/m}$. If we could assume that the two sheets were perfectly stuck to each other, with a density of adherence points comparable to the density of vertex in the spectrin network, then we could infer the elastic moduli for a single sheet: $\langle K_C \rangle = 10.7 \pm 5.3 \mu\text{N/m}$ and $\langle \mu_C \rangle = 3.4 \pm 1.5 \mu\text{N/m}$. However, in practice, it is not possible to estimate the number of adherence points and we do not know how the stresses divide between the two sheets. Moreover, there might be a partial fusion between the two sheets, so that the spectrin network loses its initial topology. Nevertheless, we consider the above elastic moduli as orders of magnitude for a single sheet and we keep them for further comparison with the one measured in hypotonic buffer.

Fig. 10 shows the histogram of the ratio K_C/μ_C in isotonic buffer. As for the low hypotonic measurements, each value is determined on the same skeleton and for the same deformation. Of the 44 deformations held on the 7 skeletons, 24 give both K_C and μ_C . The average is $\langle K_C/\mu_C \rangle = 3.0 \pm 1.3$. This value is higher than the one expected from theoretical and numerical works (Kantor and Nelson, 1987; Boal et al., 1993; Boal, 1994; Hansen et al., 1996). This might result

TABLE 2 Comparison of the values of the area expansion and shear elastic modulus ascribed to a single sheet of the skeleton, measured in various conditions: low osmolarity buffer or isotonic buffer, right after extraction or 15 min after the first set of deformations

	Area Expansion Modulus K_C ($\mu\text{N/m}$)	Shear Modulus μ_C ($\mu\text{N/m}$)	K_C/μ_C
25 mOsm/kg buffer, no ATP, 25 mOsm/kg			
Right after extraction	4.8 ± 2.7 (88)	2.4 ± 0.7 (76)	1.9 ± 1.0 (65)
15 min after extraction	5.1 ± 1.2 (56)	2.0 ± 0.5 (38)	1.7 ± 1.0 (33)
Isotonic buffer, no ATP, 300 mOsm/kg			
Right after extraction	10.7 ± 5.3 (44)	3.4 ± 1.5 (35)	3.0 ± 1.3 (24)
15 min after extraction	15.4 ± 3.4 (35)	4.7 ± 1.3 (20)	3.7 ± 1.8 (18)

The total number of deformations is indicated in parentheses.

from the fact that the two sheets are stuck to each other and no longer form a plane triangular network.

Time dependence

After the first set of deformations, the skeleton is held for 10 or 15 min with the optical tweezers switched on. Then, another set of deformations is performed. The results, either in hypotonic or in isotonic buffer, are similar to the ones obtained right after the extraction: a linear dependence is observed between the stresses and strains, both for area expansion and shear. In the low osmolarity buffer, the stack histograms also present two maxima (not shown). We fit them by a sum of two Gaussian functions, and we deduce the elastic moduli for a single sheet in low osmolarity buffer $\langle K_C \rangle = 5.1 \pm 1.2 \mu\text{N/m}$ and $\langle \mu_C \rangle = 2.0 \pm 0.5 \mu\text{N/m}$ on, respectively, 56 and 38 deformations. The ratio $\langle K_C/\mu_C \rangle$ on 33 deformations is 1.7 ± 1.0 . Thus, 15 min after the skeleton extraction in hypotonic buffer, we do not observe any significant change of its elastic coefficients. The values obtained in isotonic buffer are $\langle K_C \rangle = 15.4 \pm 3.4 \mu\text{N/m}$, $\langle \mu_C \rangle = 4.7 \pm 1.3 \mu\text{N/m}$, and $\langle K_C/\mu_C \rangle = 3.7 \pm 1.8$ on, respectively, 35, 20, and 18 deformations. We notice that, oppositely to hypotonic buffer, the skeleton properties rapidly change in isotonic buffer: after 15 min, the area expansion increases by up to 44% and the shear modulus by up to 38%. The spectrin filaments may progressively stick to each other as the buffer ions screen the repulsive interactions, and may finally form a three-dimensional structure, stiffer than a two-dimensional network.

The behavior at longer time is somehow different. Most of the time, we were able to manipulate a skeleton for 30 or 45 min after its extraction. The skeletons extracted in 25 mOsm/kg buffer generally become progressively softer with increasing time. Some measurements (data not shown) realized 30 min after extraction give an area expansion modulus as low as $1.5 \mu\text{N/m}$ —the shear modulus could not be measured. After 45 min, the skeletons are often damaged and can no longer be deformed. In some cases, they break up and separate from the beads. The long-time behavior of skeletons extracted in isotonic buffer is different. Generally, as long as the skeleton is held under tension with the tweezers, the stiffness stabilizes after 15 min and no further apparent change is measured.

ATP dependence

Previous work have shown that the mechanical behavior of the RBC membrane is modified in the presence of adenosine triphosphate (ATP) (Manno et al., 1995). For instance, ATP enhances the fluctuations of the intact membrane (Levin and Korenstein, 1991) and also of the membrane skeleton (Tuvia et al. 1998), with which it interacts through various binding sites. In this work we looked for a possible

change of the skeleton elasticity in the presence of ATP. Measurements are performed in low osmolarity buffer (25 mOsm/kg) with 1 mM ATP. We notice that, after extraction, the skeletons are generally under tension, while no tension is observed on skeletons extracted in low osmolarity buffer without ATP. We must release this tension by reducing the distance between the traps before pulling on the skeletons. The area expansion modulus measured right after extraction and averaged over eight different deformations of four skeletons is $\langle K_C \rangle = 11.0 \pm 4.5 \mu\text{N/m}$. Although there are too few results to infer a reliable value for the elastic moduli of a single sheet, it seems that adding ATP increases the initial tension without significantly changing the elastic moduli.

DISCUSSION

Despite the relative dispersion of the values from one skeleton to another and the variations observed when changing the experimental conditions, all the above results show a relative consistency: both the area expansion and shear moduli have the expected order of magnitude and their ratio is quite comparable to the theoretical predictions. This strengthens the reliability of the technique used to deform the skeletons and the validity of the theoretical approach built to analyze the data.

Nevertheless, the dispersion of the measurements from one skeleton to another and even, for a same skeleton, from one kind of deformation to the other (Table 1) has to be explained. It may have several origins:

1. The RBC has a finite lifetime of ~ 120 days. Many modifications take place in its membrane during this time, among them an increase in the membrane elastic coefficients (Linderkamp and Meiselman, 1982). A recent work (Corsi et al., 1999) has highlighted modifications of α -spectrin during the cell lifetime. The dispersion of the measurements from one skeleton to another can partially be explained by different ages of the skeletons. Variations in the skeleton structure, including variations of the defect density, are a further source of natural dispersion;
2. It has been pointed out that, depending on the bead position at the periphery of the membrane, the deformation may concern either a single sheet or both sheets of the skeleton (Fig. 4). But it may also happen that the two sheets of the skeleton stick together (double counting), or that one of them tears up (single counting), independently of the bead positions. It is even likely that, for the same skeleton, the deformation may be exerted against either one or two sheets, depending on the nature and orientation of the applied forces (pure expansion, pure shear, or a combination of both). This led us to show on a same histogram the values of K_C and μ_C obtained for each deformation (Figs. 7 and 9). For the experiments

performed in low osmolarity buffer, the histograms present two maxima, which supports the above interpretation;

- Variations in the extent of the binding region between the bead and the skeleton is also a possible cause for the dispersion. In this region, the strains and stresses are probably not homogeneous. This effect, which cannot be handled in our analytical theory, may affect the measured values of the elastic coefficients.

One question arising from this study is the difference between a free network and a network embedded into a lipid membrane. We have noticed that, at least in isotonic buffer, the skeleton shrinks after extraction. This is likely due to the larger number of degrees of freedom associated with fluctuations in the third dimension, and thus supports the idea that the skeleton behaves like a three-dimensional fluctuating object. On the contrary, the extracted skeleton slightly expands in hypotonic buffer. In this case, two effects may compensate the shrinking related to fluctuations: the increase of the spectrin persistence length and the possible existence of a pre-stressed state imposed by the lipid bilayer (Svoboda et al., 1992; Discher et al., 1998).

It is interesting to compare the measured values of K_C and μ_C to various predictions found in the literature. Monte Carlo simulations performed on such a free network led to estimates for the network elastic coefficients, namely $\mu_C = 10 \pm 2 \mu\text{N/m}$ and $K_C = 17 \pm 2 \mu\text{N/m}$ (Boal, 1994). These values are larger than our experimental ones in isotonic buffer, but at this stage the agreement is reasonable. Other models relate the macroscopic elastic constants to the stiffness k of a single spectrin filament (Kantor and Nelson, 1987; Boal et al., 1993):

$$K_C = 2\mu_C = \frac{\sqrt{3}}{2} k \quad (6)$$

Although this formula applies to a purely two-dimensional triangular network without defect, an estimate of k can be inferred from our data. In our experiments, the forces exerted on the skeleton (1-8 pN) are definitely too small to allow unfolding of spectrin subunits, for which the required forces per strand are of the order of 25-35 pN (Rief et al., 1999), or 60 pN (Lenne et al., 2000), depending on the nature of the repeats and on the pulling speed. Thus, we assume that the elastic behavior of spectrin tetramers is purely entropic. Therefore, it is possible to relate k to the persistence length ξ of a single spectrin oligomer, and to its maximum extension L , through the worm-like chain model (Marko and Siggia, 1995). In the low stretching limit, one has:

$$k = \frac{3k_B T}{2\xi L} \quad (7)$$

Taking $L \sim 200 \text{ nm}$ and $\langle K_C \rangle \sim 5 \mu\text{N/m}$, as found in hypotonic buffer, we can estimate the persistence length of

a spectrin filament: $\xi \sim 5 \text{ nm}$. This is a quite reasonable value, comparable to the estimate given by Svoboda et al. (1992) from measurements on a free skeleton: $\xi \sim 6 \text{ nm}$. Although the worm-like chain model applies to a free polymer not included in a network, it should give the right order of magnitude for k . Recent simulations (Discher et al., 1998), extending the single chain model to networks, support this assumption.

As mentioned in the Results section, the skeleton partially collapses in isotonic buffer and its structure is probably modified, which makes it difficult to compare the results between isotonic and low osmolarity buffers. Based on values given in Table 2, the area expansion and shear moduli ascribed to a single sheet become greater when the ionic strength of the medium is increased. Svoboda et al. (1992) have also reported that the skeleton gets stiffer as the ionic strength increases. According to Eq. 7, this is consistent with a decrease of the persistence length ξ . It is also likely that the screening of the spectrin-spectrin repulsive interaction causes new in-plane links between the filaments, which lowers the average end-to-end distance L and increases the stiffness.

Concerning the time evolution after extraction, the observation in low osmolarity buffer is a slow decrease of the elastic moduli, noticeable about 30 min after extraction. This does not necessarily mean that the network becomes intrinsically softer. It is likely that one observes a denaturation of the skeleton, either localized at the complex junctions between the spectrin tetramers, or in the tetramers themselves, or even at the binding sites of the skeleton to the silica beads. On the contrary, in isotonic buffer, the stiffness rapidly increases, probably as the spectrin filaments progressively stick together.

At this preliminary stage it is difficult to give a properly supported interpretation of the measurements obtained with ATP. It seems that ATP increases the tension of the skeleton without significant change of its elastic coefficients. A possible explanation is that, as for the intact membrane, ATP enhances the out-of-plane skeleton fluctuations without modifying its in-plane elastic properties. Further measurements will be necessary to confirm or invalidate this hypothesis.

CONCLUSION

For the first time, both the area expansion and the shear moduli of freshly extracted RBC skeletons have been measured in controlled experimental conditions: in low hypotonic buffer or isotonic buffer, right after extraction or after waiting for a possible time evolution, with and without ATP. All the measurements are consistent and in good agreement with models describing the mechanical behavior of such a polymer network. The most prominent results concern the elastic moduli of the skeleton in low osmolarity buffer, which is an appropriate condition to study the be-

havior of the isolated two-dimensional network. The area expansion and shear moduli are, respectively, $\langle K_C \rangle = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$ and $\langle \mu_C \rangle = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$. In such conditions, the ratio $\langle K_C / \mu_C \rangle$ is found equal to 1.9 ± 1.0 , in good agreement with theoretical and numerical predictions for a triangular network of identical springs. After 30–45 min, denaturation of the structure leads to a mechanical softening. In isotonic buffer, the area expansion modulus is greater, because the two sheets of the skeleton stick together and because the stiffness of each spectrin filament is larger. A major improvement of the technique would be to take into account the actual deformation of the skeleton to extract the elastic moduli and check to which extent the assumptions introduced for the data analysis are fulfilled. However, this is not expected to significantly change the values of the area expansion and shear moduli.

APPENDIX

This part details the algebra and the constructions used to relate the forces ($\mathbf{F}_A, \mathbf{F}_B, \mathbf{F}_C$) exerted at the vertices A, B, C of a triangular membrane to the components of the 2×2 stress tensor $[\boldsymbol{\sigma}]$ introduced in the main text. The membrane is assumed to be a purely two-dimensional, plane, continuous, homogeneous and isotropic elastic medium. The model is restricted to small deformations, so the equations of linear elasticity apply. Moreover, the stress and strain tensors are assumed to be homogeneous over the membrane.

The mechanical equilibrium of the membrane is written as:

$$\mathbf{F}_A + \mathbf{F}_B + \mathbf{F}_C = \mathbf{0} \quad (\text{A1})$$

and

$$\mathbf{M}(\mathbf{F}_A) + \mathbf{M}(\mathbf{F}_B) + \mathbf{M}(\mathbf{F}_C) = \mathbf{0} \quad (\text{A2})$$

where \mathbf{M} is the force momentum calculated at a given point of the plane. Equation A2 is equivalent to the condition that the three straight lines supporting the forces intersect at a single point (Fig. 3). In the following, we determine the configuration of the forces $\mathbf{F}_A, \mathbf{F}_B,$ and \mathbf{F}_C and the associated stresses, in the cases of a pure area expansion deformation, of a pure shear deformation and finally in the most general case (shear + expansion).

Pure area expansion stress

For a limited surface, the relation between the force $d\mathbf{G}$ exerted on an element dl of its boundary and the stress tensor $[\boldsymbol{\sigma}]$ is:

$$d\mathbf{G} = [\boldsymbol{\sigma}]\mathbf{n}dl \quad (\text{A3})$$

Here the unit vector \mathbf{n} defines the external normal to the element of length dl . In the case of pure area expansion, $[\boldsymbol{\sigma}]$ is diagonal and may be written as $[\boldsymbol{\sigma}] = \sigma_e [\mathbf{I}]$, where $[\mathbf{I}]$ is the identity matrix. The resultant force exerted on a segment of length L is $\mathbf{G} = \sigma_e L \mathbf{n}$. In the case of a triangle ABC, the forces $\mathbf{G}_A, \mathbf{G}_B,$ and \mathbf{G}_C generating a pure expansion are respectively oriented along the normals to the segments BC, CA, and AB (Fig. 11 A). Their sum $\mathbf{G}_A + \mathbf{G}_B + \mathbf{G}_C$ is zero and their amplitudes are related to the stress σ_e by:

$$\sigma_e = \frac{G_A}{BC} = \frac{G_B}{AC} = \frac{G_C}{AB} \quad (\text{A4})$$

Biophysical Journal 81(1) 43–56

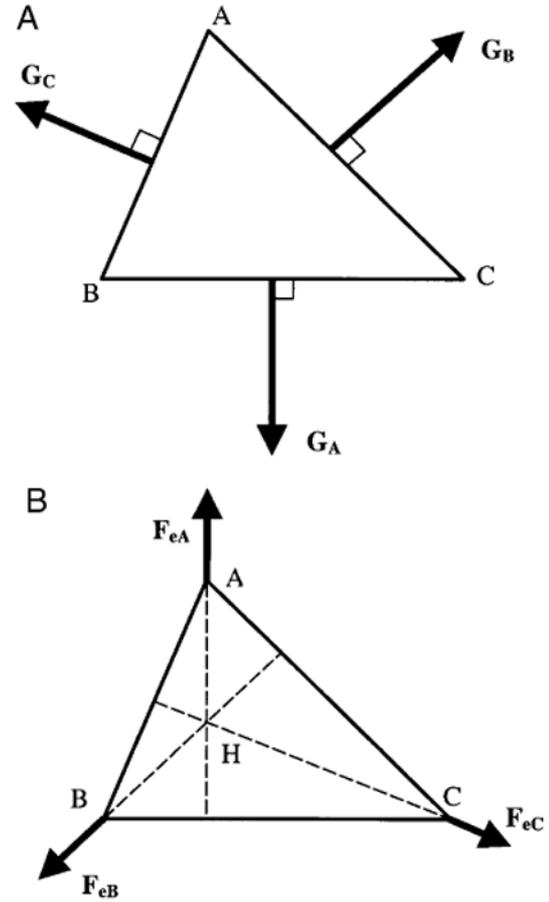


FIGURE 11 (A) Configuration of three forces $\mathbf{G}_A, \mathbf{G}_B,$ and \mathbf{G}_C generating a pure expansion stress on the triangle ABC. They are oriented along the normals to the segments BC, CA, and AB, and their sum $\mathbf{G}_A + \mathbf{G}_B + \mathbf{G}_C$ is zero. (B) The three forces $\mathbf{F}_{eA}, \mathbf{F}_{eB},$ and \mathbf{F}_{eC} applied at the vertices A, B, and C exert a pure expansion stress equivalent to the one generated by $\mathbf{G}_A, \mathbf{G}_B,$ and \mathbf{G}_C . They are supported by the triangle heights and their amplitude is given by equations A5–A7.

For an elementary triangle ABC of surface dS , it is equivalent to replace the force \mathbf{G}_A exerted in the middle of BC by a pair of two forces equal to $\mathbf{G}_A/2$, exerted in B and in C. This construction also holds for a triangle ABC of finite surface, as soon as the strain and the stress are assumed homogeneous over the triangle. Similar constructions are valid in B and C for \mathbf{G}_B and \mathbf{G}_C . Then $\mathbf{G}_A, \mathbf{G}_B,$ and \mathbf{G}_C can be replaced by three forces $\mathbf{F}_{eA}, \mathbf{F}_{eB},$ and \mathbf{F}_{eC} exerted at the vertices A, B, and C, generating the same stress σ_e and given by (see Fig. 11 B):

$$\mathbf{F}_{eA} = \frac{\mathbf{G}_B + \mathbf{G}_C}{2} = -\frac{\mathbf{G}_A}{2} \quad (\text{A5})$$

$$\mathbf{F}_{eB} = \frac{\mathbf{G}_C + \mathbf{G}_A}{2} = -\frac{\mathbf{G}_B}{2} \quad (\text{A6})$$

$$\mathbf{F}_{eC} = \frac{\mathbf{G}_A + \mathbf{G}_B}{2} = -\frac{\mathbf{G}_C}{2} \quad (\text{A7})$$

Their amplitudes are related to σ_e by:

$$\sigma_e = 2 \frac{F_{eA}}{BC} = 2 \frac{F_{eB}}{AC} = 2 \frac{F_{eC}}{AB} \quad (\text{A8})$$

In conclusion, the forces F_{eA} , F_{eB} , and F_{eC} generating a pure area expansion are supported by the triangle heights, intersecting at point H, and their sum is zero.

Pure shear stress

For a pure shear stress there is a system of coordinates (e_x , e_y) (called the principal system of coordinates in the following) in which $[\sigma]$ is diagonal and may be written as $[\sigma] = \sigma_s [J]$, with $[J] = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}$. The resultant forces K_A , K_B , and K_C exerted on the respective sides BC, CA, and AB are given by integrating Eq. A3 and are represented in Fig. 12 A. The direction of K_A is such that the angles (n_A , e_x) and (e_x , K_A) are equal (here n_A represents the unit vector normal to BC and directed out of the triangle). The same construction applies for K_B and K_C . As in the pure area expansion case, their respective amplitudes are related to the shear stress σ_s by:

$$\sigma_s = \frac{K_A}{BC} = \frac{K_B}{AC} = \frac{K_C}{AB} \quad (\text{A9})$$

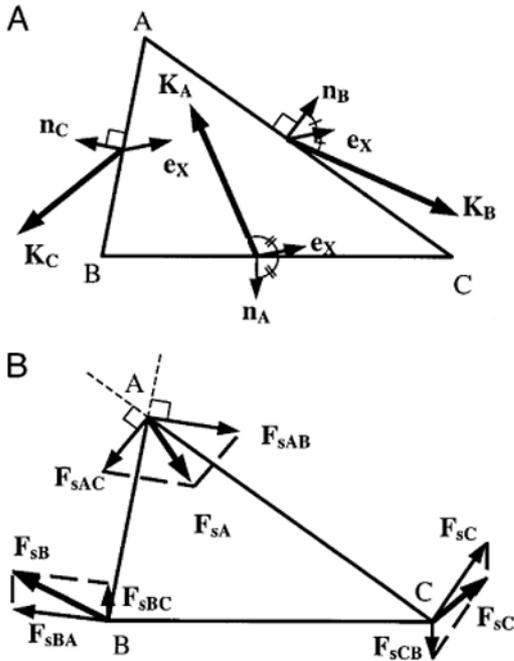


FIGURE 12 (A) Configuration of three forces K_A , K_B , and K_C generating a pure shear stress on the triangle ABC. Their sum $K_A + K_B + K_C$ is zero. They are oriented in such a way that the angles (n_A , e_x) and (e_x , K_A) are equal (and equivalent relations by permutation). (B) The three forces F_{sA} , F_{sB} , and F_{sC} applied at the vertices A, B, and C exert a pure shear stress equivalent to the one generated by K_A , K_B , and K_C . They intersect at a single point located on the circle passing through the points A, B, and C, and their amplitude is given by equations A10–A12. They are the result of the superposition of three torques (F_{sAB} , $F_{sBA} = -F_{sAB}$), (F_{sAC} , $F_{sCA} = -F_{sAC}$), and (F_{sBC} , $F_{sCB} = -F_{sBC}$).

Following the same procedure as above, an equivalent configuration is obtained by replacing K_A by a pair of two forces equal to $K_A/2$, exerted in B and C, and similar constructions for K_B and K_C . The equivalent forces exerted in A, B, and C are, respectively:

$$F_{sA} = \frac{K_B + K_C}{2} = -\frac{K_A}{2}; \sigma_s = 2 \frac{F_{sA}}{BC} \quad (\text{A10})$$

$$F_{sB} = \frac{K_C + K_A}{2} = -\frac{K_B}{2}; \sigma_s = 2 \frac{F_{sB}}{AC} \quad (\text{A11})$$

$$F_{sC} = \frac{K_A + K_B}{2} = -\frac{K_C}{2}; \sigma_s = 2 \frac{F_{sC}}{AB} \quad (\text{A12})$$

Due to the orientation of F_{sA} , F_{sB} , and F_{sC} , the angles (F_{sA} , F_{sB}) and (CA , CB) are equal. Similar relations are obtained by permutation. As a consequence, the three forces intersect at a single point located on the circle drawn around the triangle ABC.

Another useful transformation consists in splitting this triplet of forces into a set of three torques. In A for instance, one projects F_{sA} onto the normals n_B and n_C to the sides AC and AB. The same construction in B and C leads to (see Fig. 12 B):

$$F_{sA} = F_{sAC} + F_{sAB} \quad (\text{A13})$$

$$F_{sB} = F_{sBA} + F_{sBC} \quad (\text{A14})$$

$$F_{sC} = F_{sCB} + F_{sCA} \quad (\text{A15})$$

Using the mechanical equilibrium condition $F_{sA} + F_{sB} + F_{sC} = 0$, the equality between the angles (n_A , e_x) and (e_x , F_{sA}), and the relations obtained by permutation, it is possible to show that $F_{sAC} = -F_{sCA}$, $F_{sAB} = -F_{sBA}$, and $F_{sBC} = -F_{sCB}$ (the geometrical demonstration presents no difficulty). Consequently, the configuration of forces generating a pure shear stress may be seen as a triplet of torques (F_{sAB} , $-F_{sAB}$), (F_{sAC} , $-F_{sAC}$) and (F_{sBC} , $-F_{sBC}$), respectively, exerted on the sides AB, AC, and BC, as shown in Fig. 12 B.

General case: simultaneous expansion and shear stress

In the most general case, one can use the tools developed in the above sections to calculate the stresses associated to the three forces (F_A , F_B , F_C). As shown in the main text and in Fig. 3, the first step is to project $F_A = F_{AB} + F_{AC}$ along the normals n_C and n_B to AB and AC, and make the equivalent constructions in B and C. The pair of forces (F_{AB} , F_{BA}) is then split into a pair of identical forces ($-F_{eC}$, $-F_{eC}$) exerted in A and in B, and a torque (F_{sAB} , $F_{sBA} = -F_{sAB}$), defined by:

$$F_{AB} = -F_{eC} + F_{sAB} \quad F_{BA} = -F_{eC} + F_{sBA} \\ = -F_{eC} - F_{sAB} \quad (\text{A16})$$

Similar definitions are obtained by permutation:

$$F_{AC} = -F_{eB} + F_{sAC} \quad F_{CA} = -F_{eB} + F_{sCA} \\ = -F_{eB} - F_{sAC} \quad (\text{A17})$$

$$F_{BC} = -F_{eA} + F_{sBC} \quad F_{CB} = -F_{eA} + F_{sCB} \\ = -F_{eA} - F_{sBC} \quad (\text{A18})$$

The three forces \mathbf{F}_{eA} , \mathbf{F}_{eB} , and \mathbf{F}_{eC} are oriented toward the normals \mathbf{n}_A , \mathbf{n}_B , and \mathbf{n}_C . Moreover, like \mathbf{F}_A , \mathbf{F}_B , and \mathbf{F}_C , their sum is zero. Then, according to the first section, they generate a pure area expansion stress of amplitude σ_e given by Eq. A8.

In the same way, the three torques $(\mathbf{F}_{sAB}, \mathbf{F}_{sBA})$, $(\mathbf{F}_{sAC}, \mathbf{F}_{sCA})$ and $(\mathbf{F}_{sBC}, \mathbf{F}_{sCB})$ generate a pure shear stress. The equivalent forces exerted in A, B, and C are \mathbf{F}_{sA} , \mathbf{F}_{sB} , and \mathbf{F}_{sC} given by Eqs. A13–A15 and the amplitude σ_s is determined from formulas A10–A12:

$$\sigma_s = 2 \frac{\|\mathbf{F}_{sA}\|}{BC} = \frac{\|\mathbf{F}_A - \mathbf{F}_{BA} - \mathbf{F}_{CA}\|}{BC} \quad (\text{A19})$$

and equivalent relations by permuting A, B, and C. As in the second section, the axes of the principal system of coordinates (\mathbf{e}_x , \mathbf{e}_y) are determined by writing the equality of the two angles (\mathbf{n}_A , \mathbf{e}_x) and (\mathbf{e}_x , $-\mathbf{F}_{sA}$).

REFERENCES

- Aronovitz, J. A., and T. C. Lubensky. 1988. Fluctuations of solid membranes. *Phys. Rev. Lett.* 60:2634–2637.
- Bennett, V., and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:27–66.
- Boal, D. H. 1994. Computer simulation of a model network for the erythrocyte cytoskeleton. *Biophys. J.* 67:521–529.
- Boal, D. H., U. Seifert, and J. C. Shillcock. 1993. Negative Poisson ratio in two-dimensional networks under tension. *Phys. Rev. E.* 48:4274–4283.
- Corsi, D., M. Paiardini, R. Crinelli, A. Bucchini, and M. Magnani. 1999. Alteration of α -spectrin ubiquitination due to age dependent changes in the erythrocyte membrane. *Eur. J. Biochem.* 261:775–783.
- Discher, D. E., D. H. Boal, and S. K. Boey. 1998. Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. II. Micropipette aspiration. *Biophys. J.* 75:1584–1597.
- Discher, D. E., N. Mohandas, and E. A. Evans. 1994. Molecular maps of red blood cell deformation: hidden elasticity and in situ connectivity. *Science.* 266:1032–1035.
- Engelhardt, H., and E. Sackmann. 1988. On the measurement of shear elastic moduli and viscosities of erythrocyte plasma membranes by transient deformation in high frequency electric fields. *Biophys. J.* 54:495–508.
- Evans, E. A. 1973. New membrane concept applied to the analysis of fluid shear- and micropipette-deformed red blood cells. *Biophys. J.* 13:941–954.
- Evans, E. A. 1983. Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipette aspiration tests. *Biophys. J.* 43:27–30.
- Hansen, J. C., R. Skalak, S. Chien, and A. Roger. 1996. An elastic network based on the structure of the red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 13:146–166.
- Hansen, J. C., R. Skalak, S. Chien, and A. Roger. 1997. Influence of the network topology on the elasticity of the red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 72:2369–2381.
- Hénon, S., G. Lenormand, A. Richert, and F. Gallet. 1999. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.* 76:1145–1151.
- Hochmuth, R. M., and R. E. Waugh. 1987. Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. *Annu. Rev. Physiol.* 49:209–219.
- Kantor, Y., and D. R. Nelson. 1987. Phase transition in flexible polymeric surfaces. *Phys. Rev. A.* 36:4020–4032.
- Lelièvre, J. C., C. Bucherer, S. Geiger, C. Lacombe, and V. Vereycken. 1995. Blood cell biomechanics evaluated by the single-cell micromanipulation. *J. Phys. III France.* 5:1689–1706.
- Lenne, P.-F., A. J. Raae, S. M. Altmann, M. Saraste, and J. K. H. Hörber. 2000. States and transitions during unfolding of a single spectrin repeat. *FEBS Lett.* 476:124–128.
- Levin, S. V., and R. Korenstein. 1991. Membrane fluctuations in erythrocytes are linked to MgATP-dependent dynamic assembly of the membrane skeleton. *Biophys. J.* 60:733–737.
- Linderkamp, O., and H. J. Meiselman. 1982. Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red blood cells. *Blood.* 59:1121–1127.
- Liu, Y., D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, C. F. Chapman, and B. J. Tromberg. 1995. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers. *Biophys. J.* 68:2137–2144.
- Liu, S., L. Derick, and J. Paleck. 1987. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J. Cell Biol.* 104:527–536.
- Manno, S., Y. Takakuwa, K. Nagao, and N. Mohandas. 1995. Modulation of erythrocyte membrane mechanical functions by β -spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270:5659–5665.
- Marko, J., and E. Siggia. 1995. Stretching DNA. *Macromolecules.* 28:8759–8770.
- Mohandas, N., and E. Evans. 1994. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:787–818.
- Peterson, M. A., H. Strey, and E. Sackmann. 1992. Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker: amplitudes. *J. Phys. II France.* 2:1273–1285.
- Rief, M., J. Pascual, M. Saraste, and H. E. Gaub. 1999. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats: low unfolding forces in helix bundles. *J. Mol. Biol.* 286:553–561.
- Simmons, R. M., J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudis. 1996. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys. J.* 70:1813–1822.
- Stokke, B. T., A. Mikkelsen, and A. Elgsaeter. 1986. The human erythrocyte membrane may be an ionic gel. III. Micropipette aspiration of unswollen erythrocytes. *J. Theor. Biol.* 123:205–211.
- Svoboda, K., and S. M. Block. 1994. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:247–285.
- Svoboda, K., C. F. Schmidt, D. Branton, and S. M. Block. 1992. Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 63:784–793.
- Tuvia, S., S. Levin, A. Bitler, and R. Korenstein. 1998. Mechanical fluctuations of the membrane-skeleton are dependent on F-actin ATPase in human erythrocytes. *J. Cell. Biol.* 141:1551–1561.
- Ursitti, J. A., D. W. Pumphlin, J. B. Wade, and R. J. Bloch. 1991. Ultrastructure of the human erythrocyte cytoskeleton and its attachment to the membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 19:227–243.
- Ursitti, J. A., and J. B. Wade. 1993. Ultrastructure and immunocytochemistry of the isolated human erythrocyte membrane skeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 25:30–42.
- Yu, J., D. A. Fishman, and T. L. Steck. 1973. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by non-ionic detergents. *J. Supramol. Struct.* 1:233–248.

Références

- Alderman, E. M., H. H. Fudenberg, and R. E. Lovins. 1981. Isolation and characterization of an age-related antigen present on senescent human red blood cell. *Blood*. 58:341-349
- Allemand, J. F. 1997. Micro-manipulations de molécules d'ADN isolées. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie
- Ashkin, A. 1970. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* 24:156-59
- Ashkin, A., J. M. Dziedzic, and T. Yamane. 1987. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* 330:769-771
- Ashkin, A. 1992. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.* 61:569-582
- Barrat, J. -L., and J. -F. Joanny. 1993. Persistence length of polyelectrolyte chains. *Europhys. Lett.* 24:333-338
- Bennett, V., and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:27-66
- Boal, D. H., U. Seifert and A. Zilker. 1992. Dual network model for red blood cell membranes. *Phys. Rev. Lett.* 69: 3405-09.
- Boal, D. H., U. Seifert, J. C. Shillcock. 1993. Negative Poisson ratio in two-dimensional networks under tension. *Physical Review E.* 48:4274-83
- Boal, D. H. 1994. Computer simulation of a model network for the erythrocyte cytoskeleton. *Biophys. J.* 67:521-529
- Bronkhorst, P. J. H., G. J. Streekstra, J. Grimbergen, E. J. Nijhof, J. J. Sixma, and G. J. Brakenhoff. 1995. A new method to study shape recovery of red blood cells using multiple optical trapping. *Biophys. J.* 69:1666-1673

- Bucherer, C., C. Lacombe, and J. C. Lelièvre. 1991. Cell micromanipulation. Influence of an ionic contrast medium on the erythrocyte membrane elastic modulus. in “The living cell in four dimensions”, ed. G. Pallotin, AIP Conference Proceeding. 226:378-384
- Bustamante, C., J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith. 1994. Entropic elasticity of λ -Phage DNA. *Science*. 265:1599-1600
- Caro, C. G., T. J. Pedley, R. C. Schroter, and W. A. Seed. 1978. The mechanics of the circulation. Oxford University Press.
- Carslaw, H. S., and J. C. Jaeger. 1959. Conduction of heat in solids. Oxford University Press. UK. 261-263
- Corsi, D., M. Paiardini, R. Crinelli, A. Bucchini, and M. Magnani. 1999. Alteration of α -spectrin ubiquitination due to age dependent changes in the erythrocyte membrane. *Eur. J. Biochem*. 261:775-783
- Chen, S. and L. A. Sung. 1990. Molecular basis on red cell membrane rheology. *Biorheol*. 27:327-344
- Danon, D., and Y. Marikovsky. 1988. The aging of the red blood cell. A multifactor process. *Blood Cells*. 14:7-15
- Delaunay, J., and P. Boivin. 1990. Le squelette du globule rouge. *La Recherche*. 223(21):845-852
- Discher, D. E., N. Mohandas, and E. A. Evans. 1994. Molecular maps of red blood cell deformation: hidden elasticity and *in situ* connectivity. *Science*. 266:1032-1035
- Discher, D. E., D. H. Boal, and S. K. Boey. 1998. Simulations of the erythrocyte cytoskeleton at large deformation. II. Micropipette aspiration. *Biophys. J*. 75:1584-1597
- Drochon, A., D. Barthès-Biezel, C. Lacombe, and J. C. Lelièvre. 1990. Determination of the red blood cell apparent membrane elastic modulus from viscometric measurements. *J. Biomech. Eng*. 112:241-249
- Engelhardt, H., and E. Sackmann. 1988. On the measurement of shear elastic moduli and viscosities of erythrocyte plasma membranes by transient deformation in high frequency electric fields. *Biophys. J*. 54:495-508

- Evans, E. A., and Y. C. Fung. 1972. Improved measurements of the erythrocyte geometry. *Microv. Res.* 4:335-347
- Evans, E. A. 1973. New membrane concept applied to the analysis of fluid shear - and micropipette - deformed red blood cells. *Biophys. J.* 13:941-954
- Evans, E. A., R. Waugh, and L. Melnik. 1976. Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophys. J.* 16:585-595
- Evans, E. A. 1983. Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipette aspiration tests. *Biophys. J.* 43:27-30
- Evans, E. A., and D. Needham. 1987. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.* 91:4219-4228
- de Gennes, P. -G. 1979. Scaling concepts in polymer physics. Cornell University Press. Ithaca. NY
- Flory, P. J. 1988. Statistical mechanics of chain molecules. Hanser Publishers. The Oxford University Press. NY
- Hansen, J. C., R. Skalak, S. Chien, and A. Roger. 1996. An elastic network based on the structure of the red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 13:146-166
- Hansen, J. C., R. Skalak, S. Chien, and A. Roger. 1997. Influence of the network topology on the elasticity of the red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 72:2369-2381
- Happel, J., and Brenner H. 1991. Low Reynolds number hydrodynamics, Kluwer Academic Publishers
- Hénon, S., G. Lenormand, A. Richert, and F. Gallet. 1999. A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.* 76:1145-51
- Hochmuth, R. M., N. Mohandas and P. L. Blackshear, Jr. 1973. Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.* 13:747-762
- Hochmuth, R. M., and R. E. Waugh. 1987. Erythrocyte membrane elasticity and viscosity. *Ann. Rev. Physiol.* 49:209-219

- Kantor, Y., and Nelson D. R. 1987. Phase transition in flexible polymeric surfaces. *Physical Review A*. 36:4020-32
- Kuo, S. C. 1998. A simple assay for local heating by optical tweezers. *Methods in cell biology*. 55:43-45
- Landau, L. D., and E. M. Lifshitz. 1959. *Theory of Elasticity*, Pergamon Press
- Laser tweezers in cell biology. 1998. *Methods in cell biology*. Academic Press. Vol. 55
- Lelièvre, J. C., C. Bucherer, S. Geiger, C. Lacombe, and V. Vereycken. 1995. Blood cell biomechanics evaluated by the single-cell micromanipulation. *J. Phys. III France*. 5:1689-1706
- Lenne, P. -F., A. J. Raae, S. M. Altmann, M. Saraste, and J. K. H. Hörber. 2000. States and transitions during unfolding of a single spectrin repeat. *FEBS Letters*. 476:124-128
- Lenormand, G., S. Hénon, A. Richert, J. Siméon, and F. Gallet. 2001. Direct measurement of the area expansion and shear moduli of the human red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J*. 81:43-56
- Levin, S. V., and R. Korenstein. 1991. Membrane fluctuations in erythrocytes are linked to MgATP-dependent dynamic assembly of the membrane skeleton. *Biophys. J*. 60:733-737
- Linderkamp, O., and H. J. Meiselman. 1982. Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red blood cells. *Blood*. 59:1121-1127
- Liu, S., P. Windisch, S. Kim, and J. Palek. 1984. Oligomeric states of spectrin in normal erythrocyte membranes: biochemical and electron microscopy studies. *Cell*. 37:587-594
- Liu, S., L. Derick, and J. Palek. 1987. Visualization of the hexagonal lattice in the erythrocyte membrane skeleton. *J. Cell Biol*. 104:527-536
- Liu, Y., D. K. Cheng, G. J. Sonek, M. W. Berns, C. F. Chapman, and B. J. Tromberg. 1995. Evidence for localized cell heating induced by infrared optical tweezers. *Biophys. J*. 68:2137-2144
- Lux, S. E. 1988. Disorders of the red cell membrane in : hemetological disorders of the infancy and childhood. Saunders, Philadelphia. Second ed. 1:443-544

- Marko, J., and E. Siggia. 1995. Stretching DNA. *Macromolecules*. 28:8759-8770
- Mehta, A. D., J. T. Finan, and J. A. Spudich. 1998. Reflections of a lucid dreamer: optical trap design considerations. *Methods in Cell Biology*. 55:47-69
- Mohandas, N., and E. Evans. 1994. Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:787-818
- Moumni, J., 1997. Un modèle de treillis mécanique s'appliquant au squelette du globule rouge humain. Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie
- Odijk, T. 1977. Polyelectrolyte near the rod limit. *J. Polym. Sci.* 15:477-483
- Peterson, M. A., H. Strey, and E. Sackmann. 1992. Theoretical and phase contrast microscopic eigenmode analysis of erythrocyte flicker: amplitudes. *J. Phys. II France* 2:1273-1285
- Rief, M., J. Pascual, M. Saraste, and H. E. Gaub. 1999. Single molecule force spectroscopy of spectrin repeats : low unfolding forces in helix bundles . *J. Mol. Biol.* 286:553-561
- Sackmann, E. 1994. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. *FEBS Letters*. 346:3-16
- Shen, B. W., R. Josephs, and T. L. Steck. 1986. Ultrastructure of the intact skeleton of the human erythrocyte membrane. *J. Cell. Biol.* 102:997-1006
- Simmons, R. M., J. T. Finan, S. Chu, and J. A. Spudich. 1996. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys. J.* 70:1813-1822
- Simon, A. J. 1992. Localization, escape, and synchronization of a stochastic process. Thèse de doctorat de l'université de Chicago
- Skalak, R., A. Tozeren, R. P. Zarda, and S. Chien. 1973. Strain energy function of red blood cell membranes. *Biophys. J.* 13:245-264
- Sholnick, J., and M. Fixman. 1977. Electrostatic persistence length of a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules*. 10:944-948

- Schmid-Schönbein, G. W., T. Fisher, G. Driessen, and H. Rieger. 1979. Microcirculation. *Clinical Research Applications of Engineering Principales*. 333-417
- Stokke, B. T., A. Mikkelsen, and A. Elgsaeter. 1985. Human erythrocyte spectrin dimer intrinsic viscosity: temperature dependence and implications for the molecular basis of the erythrocyte membrane free energy. *Bioch. Biophys. Acta*. 816:102-110
- Stokke, B. T., A. Mikkelsen, and A. Elgsaeter. 1986. The human erythrocyte membrane may be an ionic gel. III. Micropipette aspiration of unswollen erythrocytes. *J. theor. biol.* 123:205-211
- Sutera, S. P., R. A. Gardner, C. W. Boylan, G. L. Carroll, K. C. Chang, J. S. Marvel, C. Kilo, B. Gonen, and J. R. Williamson. 1985. Age-related changes in deformability of human erythrocytes. *Blood*. 65:275-282
- Svoboda, K., C. F. Schmidt, D. Branton, and S. M. Block. 1992. Conformation and elasticity of the isolated red blood cell membrane skeleton. *Biophys. J.* 63:784-793
- Svoboda, K., and S. M. Block. 1994. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23:247-285
- Tuvia, S., S. Levin, A. Bitler, and R. Korenstein. 1998. Mechanical fluctuations of the membrane-skeleton are dependent on F-actin ATPase in human erythrocytes. *J. Cell. Biol.* 141:1551-1561
- Ursitti, J. A., D. W. Pumplin, J. B. Wade, and R. J. Bloch. 1991. Ultra-structure of the human erythrocyte cytoskeleton and its attachment to the membrane. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 19:227-243
- Ursitti, J. A., and J. B. Wade. 1993. Ultrastructure and immunocytochemistry of the isolated human erythrocyte membrane skeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 25:30-42
- Visscher, K. 1993. Optical micromanipulation and confocal microscopy. Thèse de doctorat de l'Université d'Amsterdam
- Visscher, K., P. Gross, and S. M. Block. 1996. Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing. *IEEE Journal of selected topics in quantum electronics*. 2(4):1066-1076

- Waugh, R. E., and E. A. Evans. 1979. Thermoelasticity of red blood cell membrane. *Biophys. J.* 26:115-131
- Waugh R. E., and P. Agre. 1988. Reductions of erythrocyte membrane viscoelastic coefficients reflect spectrin deficiencies in hereditary spherocytosis. *J. Clin. Invest.* 81:133-141
- Winkelmann, J. C., and B. G. Forget. 1993. Erythroid and nonerythroid spectrins. *Blood.* 81(12):3173-3185
- Yu, J., D. A. Fishman, and T. L. Steck. 1973. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by non-ionic detergents. *J. Supramol. Struc.* 1:233-248

Elasticity of the human red blood cell skeleton – an optical tweezers study –

The red blood cell (RBC) is able to undergo great shear deformations, mainly when it passes through capillaries with a diameter smaller than its own. This resistance to shear deformations is attributed to its membrane. This membrane is made of a flexible bidimensional protein network which reinforces the inner face of the lipid bilayer. This skeleton is mainly composed of long spectrin filaments (~ 200 nm) linked together and to the bilayer by junction complexes.

In the first part of this work, we measured the shear modulus μ of the intact membrane (lipid bilayer and skeleton) using optical tweezers micromanipulations. Two silica beads bound to the membrane are trapped and used to apply calibrated forces to the membrane. The shear modulus is inferred from the measured deformations and the applied stresses. We found $\mu = 2.5 \pm 0.4$ $\mu\text{N/m}$, a value comparable but smaller than the ones obtained by other methods.

In a second part, the area expansion K_C and the shear moduli μ_C of the free spectrin skeleton – freshly extracted from the membrane – are measured. A RBC is trapped by three silica beads bound to its membrane and the lipid bilayer is dissolved by injection of a detergent. The skeleton remains attached to the beads and is deformed by applying calibrated forces to the beads. The elastic moduli of the two-dimensional spectrin network are inferred from the deformations and the applied stresses. Ones found $K_C = 4.8 \pm 2.7$ $\mu\text{N/m}$ and $\mu_C = 2.4 \pm 0.7$ $\mu\text{N/m}$ for a 25 mOsm/kg buffer. From this measurements, we can infer the spectrin persistence length, here $\xi = 5$ nm. The measured values are consistent with estimates deduced from experiments carried out on the intact membrane, and agree with theoretical and numerical predictions concerning two-dimensional networks of entropic springs. The influence of the ionic strength and the aging of the skeleton after its extraction are studied in the last part.

Key words: red blood cell – optical tweezers – micromanipulation – spectrin network – cytoskeleton – bidimensional elasticity – shear modulus – area expansion modulus

Élasticité du squelette du globule rouge humain – une étude par pinces optiques –

Résumé : Le globule rouge a une grande faculté à se déformer, notamment lorsqu'il traverse des capillaires dont le diamètre peut être inférieur au sien. Cette résistance au cisaillement est attribuée à sa membrane particulière. Celle-ci est constituée d'une bicouche lipidique sur laquelle est fixé un réseau bidimensionnelle de protéines : le squelette. Ce squelette est principalement constitué de longs filaments de spectrine (~200 nm) reliés entre eux et à la bicouche lipidique par des complexes de jonction.

Dans la première partie de ce travail, nous avons mesuré le module de cisaillement μ de la membrane (bicouche lipidique + squelette) à l'aide de deux pinces optiques. Deux billes de silice attachées à la membrane sont utilisées pour lui appliquer des forces connues. Le module de cisaillement est déduit de la déformation mesurée en fonction de la contrainte appliquée. Nous avons trouvé $\mu = 2.5 \pm 0.4 \mu\text{N/m}$, valeur du même ordre de grandeur, mais inférieure, à celles obtenues par d'autres techniques.

Dans une seconde partie, nous mesurons les modules d'extension K_C et de cisaillement μ_C du squelette seul. Un globule rouge avec trois billes un piégé, et une solution de détergent est injectée afin de dissoudre la bicouche lipidique. Le squelette reste attaché aux billes et il est ensuite déformé en déplaçant les billes les unes par rapport aux autres. Les modules élastiques sont déduits de la mesure des contraintes et des déformations. Nous trouvons $K_C = 4.8 \pm 2.7 \mu\text{N/m}$ et $\mu_C = 2.4 \pm 0.7 \mu\text{N/m}$ dans une solution d'osmolarité égale à 25 mOsm/kg. De ces mesures, nous pouvons déduire la longueur de persistance de la spectrine, ici $\xi = 5 \text{ nm}$. Ces valeurs sont en bon accord avec des prédictions théoriques et numériques réalisées sur des réseaux bidimensionnels de ressorts. L'influence de la force ionique et du vieillissement du squelette après l'extraction sont étudiés dans la dernière partie.

Mots clés : globule rouge humain – pinces optiques – micromanipulation – réseau de spectrine – cytosquelette – élasticité bidimensionnelle – module de cisaillement – module d'extension