UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Archive ouverte UNIGE
https://archive-ouverte.unige.ch

Article scientifique | Article | 2024

Published version | Open Access

This is the published version of the publication, made available in accordance with the publisher's policy.

Tension membranaire, actine et volume cellulaire : Réponses temporaires à la courbure induite d'une monocouche épithéliale

Tomba, Caterina; Roux, Aurélien

How to cite

TOMBA, Caterina, ROUX, Aurélien. Tension membranaire, actine et volume cellulaire : Réponses temporaires à la courbure induite d'une monocouche épithéliale. In: MS. Médecine sciences, 2024, vol. 40, n° 6-7, p. 511–513. doi: 10.1051/medsci/2024062

This publication URL: https://archive-ouverte.unige.ch/unige:180722
Publication DOI: 10.1051/medsci/2024062

© The author(s). This work is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY 4.0)
https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Tension membranaire, actine et volume cellulaire

Réponses temporaires à la courbure induite d'une monocouche épithéliale

Caterina Tomba[1], Aurélien Roux[2,3]

[1]CNRS, INSA Lyon, École Centrale de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, INL, UMR5270, 69621 Villeurbanne, France.
[2]Département de biochimie, Université de Genève, Genève, Suisse.
[3] Centre national de compétence en recherche : biologie chimique, Université de Genève, Genève, Suisse.
caterina.tomba@cnrs.fr

> Le mouvement est une caractéristique des organismes vivants. Les tissus se plient et se courbent au cours de la morphogenèse pour former les organes. Par exemple, la gastrulation et la neurulation de l'embryon d'une part, et la formation des villosités de l'intestin d'autre part sont induites par contraction polarisée des cellules [1]. En conditions physiologiques, les courbures de l'épithélium sont maintenues tout au long de la vie, même si elles sont soumises à des sollicitations mécaniques. Les tissus doivent notamment s'adapter à certains changements rapides de la forme des organes, par exemple ceux dus au péristaltisme pour les villosités intestinales, ou à la ventilation pour les alvéoles pulmonaires. En revanche, à tout âge peuvent survenir des maladies modifiant la forme des tissus et leur organisation cellulaire, avec des conséquences défavorables sur le fonctionnement de l'organe [2].

L'observation des tissus en mouvement dans les organismes vivants, en particulier chez l'embryon, reste difficile. De plus, à cause du manque d'outils techniques pour mimer *in vitro*, dans des conditions dynamiques contrôlées, la courbure des tissus, son influence sur le comportement cellulaire est mal connue [3]. Les principales difficultés résident dans l'obtention d'un environnement à trois dimensions compatible avec la vie des cellules, qui permette à la fois leur adhérence et l'observation en microscopie. En effet, le substrat mime la matrice extracellulaire, et constitue un intermédiaire pour transmettre et imposer les déformations voulues. Des études récentes ont montré que la courbure des substrats courbes influence plusieurs processus cellulaires, comme la migration, la différenciation, l'adhérence, la contractilité de l'actomyosine et l'expression génique [2, 3], qui nécessitent d'intégrer des contraintes cellulaires locales sur de longues distances *via* l'adhérence des cellules entre elles et au substrat [4]. Cependant, la plupart de ces études utilisent des substrats à courbure fixe, alors que *in vivo*, la courbure change constamment. En outre, plusieurs études de la réponse du tissu épithélial à l'étirement ou à la compression sont effectuées avec des tissus plats. Les avancées techniques récentes dans le domaine des microrobots déformables à structure molle [5] ont ouvert la voie à des dispositifs expérimentaux permettant une modulation temporelle de la courbure *in vitro*.

Pour étudier comment les cellules s'adaptent à un changement anisotrope de la courbure du tissu, nous avons développé des substrats qui s'enroulent spontanément, et qui forcent ainsi une monocouche plate de cellules épithéliales à se déformer en un rouleau [6]. Pour cela, nous avons eu recours à une stratégie précédemment utilisée dans les domaines de l'électronique flexible et des dispositifs biomédicaux [7]. La technique est fondée sur la fabrication d'une membrane intégrant des gradients de stress préformés, qui induisent son enroulement spontané quand la contrainte est relâchée [8]. En pratique, nous avons fabriqué une bicouche d'élastomère (polydiméthylsiloxane) précontrainte (la couche supérieure étant sous tension, alors que la couche inférieure est sous compression), sur laquelle nous avons fait adhérer des cellules d'une lignée dérivée du rein de chien (*Madin-Darby canine kidney*, MDCK). Ces cellules forment des monocouches épithéliales bien organisées, et dont la mécanique cellulaire et le comportement collectif sont parmi les mieux décrits. En coupant la bicouche de polydiméthylsiloxane, et par conséquent la monocouche cellulaire adhérant à sa surface, le substrat forme spontanément un rouleau dans un temps de l'ordre de la seconde (*Figure 1A*).

Lors de déformations induisant une courbure, les matériaux usuels voient leur volume soit se réduire, soit demeurer identique. Dans notre expérience, qui produit des rouleaux dont le rayon est de l'ordre de 100 µm, si les cellules étaient compressibles, leur volume devrait diminuer de 5 %. En revanche, si les cellules sont incompressibles (*i.e.*, à volume constant), leur hauteur devrait augmenter de 25 % et leur largeur diminuer de 20 %. Sur la base de ce raisonnement, nous avons quantifié l'épaisseur et le volume des cellules par microscopie confocale en fluorescence de la membrane cellulaire (*Figure 1B, C*).

Les cellules réagissent activement à un changement de courbure du tissu en augmentant leur volume

Étonnamment, nous avons observé que les cellules vues en coupe perpendiculaire au plan de la monocouche étaient beaucoup plus hautes que la valeur maximale prédite pour un épithélium incompressible (+ 25 %, voir ci-dessus),

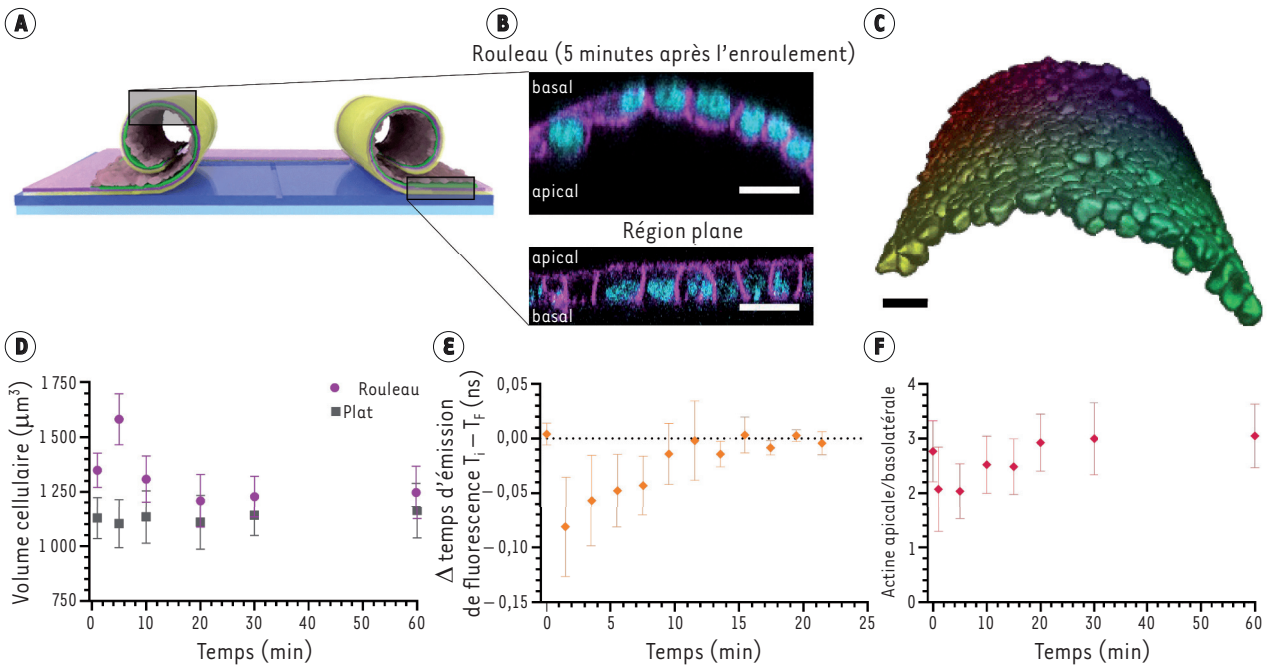

Figure 1. Réponse des cellules épithéliales à un changement global de forme par induction de courbure du tissu. A. Schéma de la bicouche de polydiméthylsiloxane (en jaune et magenta) enroulée spontanément à la suite de sa découpe, qui est facilitée par une couche de polydiméthylsiloxane (en bleu foncé) déposée sur une lamelle de verre (en bleu clair). La monocouche de cellules épithéliales (en rose) adhère au support par l'intermédiaire de la protéine fibronectine (vert). ***B.*** Vues sagittales par microscopie en fluorescence (membrane cellulaire colorée en magenta, noyau cellulaire coloré en cyan) d'une région plane (en bas) et d'une région enroulée 5 minutes après l'enroulement (en haut), montrant le gonflement des cellules du côté apical. Barre d'échelle : 20 µm. ***C.*** Segmentation des cellules pour quantifier le volume cellulaire par l'emploi du module d'extension de logiciel LimeSeg [12]. Barre d'échelle : 20 µm. ***D.*** Quantification du volume cellulaire au cours du temps après enroulement du tissu (ronds : région enroulée ; carrés : région plane). Points et barres verticales : moyenne pondérée ± erreur standard pondérée avec les poids calculés sur la variance. ***E.*** Variation Δ entre la valeur initiale (T_i) et finale (T_F) du temps d'émission de fluorescence, qui est proportionnel à la tension membranaire, mesuré par la sonde Flipper-TR™ au cours du temps après enroulement. Le temps « 0 » représente la zone plane avant enroulement. Points et barres verticales : moyenne ± écart-type. ***F.*** Rapport d'intensité de fluorescence de l'actine entre les parties apicale et basolatérale des cellules au cours du temps après enroulement. Le temps « 0 » représente la zone plane avant enroulement. Points et barres verticales : moyenne ± écart-type.

et qu'en outre, leur largeur n'avait pas changé. De fait, le volume augmentait jusqu'à 40 % cinq minutes après l'enroulement (*Figure 1D*). Il s'agit là d'une réponse inhabituelle aux contraintes de flexion, car elle n'est observée que pour de rares matériaux à compressibilité négative, tels que certains cristaux ou mousses polymères. Mais contrairement à ces matériaux rares, l'augmentation du volume des cellules était suivie d'un retour progressif à leur volume initial après environ 20 minutes. Ces observations suggèrent que l'enroulement déclenche des processus actifs (*i.e.*, consommateurs d'énergie) d'adaptation. Pour tester cette hypothèse, nous avons fixé chimiquement (par un traitement à la paraformaldéhyde) les monocouches cellulaires avant l'enroulement, ce qui tue les cellules tout en maintenant leur forme : dans ce cas, aucune augmentation du volume cellulaire n'était constatée après l'enroulement.

Les canaux ioniques, le cytosquelette d'actine et la tension membranaire sont à l'origine du gonflement cellulaire induit par la courbure

Dans notre système expérimental, le gonflement des cellules se produisait dans la région apicale, comme cela se produit aussi pour des cellules placées dans un milieu hypotonique, c'est-à-dire dont la concentration d'osmolytes est inférieure à celle de la cellule. Ainsi, pour tester si l'osmose était effectivement impliquée dans l'augmentation transitoire du volume cellulaire que nous observions, nous avons tenté de contrecarrer cet effet en effectuant la même expérience dans un liquide hypertonique (au lieu du liquide isotonique utilisé précédemment), faisant ainsi subir aux cellules un choc osmotique concomitant à l'enroulement. Et dans ce cas en effet, les cellules s'aplatissaient considérablement, empêchant l'augmentation transitoire du volume observée dans des conditions isotoniques. Pour étayer davantage l'hypothèse de l'implication de l'osmose dans

la réponse des cellules à la courbure, nous avons étudié la réponse, à l'enroulement de l'épithélium, de la tension de la membrane plasmique des cellules, une grandeur physique sensible aux modifications de l'équilibre osmotique. Pour cela, nous avons utilisé un rapporteur de tension lipidique fluorescent (*Flipper-TR*), dont le temps d'émission de fluorescence est modifié par des variations du degré de compaction lipidique, qui dépend notamment de la tension membranaire [9]. Par cette technique FLIM (*fluorescence lifetime imaging microscopy*), nous avons constaté que le temps d'émission de fluorescence, et donc la tension membranaire, diminuait instantanément lors de l'enroulement, avant que la cellule atteigne son volume maximum, et revenait à sa valeur initiale en 10 minutes environ, c'est-à-dire quand le volume cellulaire commençait à diminuer (*Figure 1E*). Comme le gonflement cellulaire concernait la région apicale et que l'actine est impliquée dans le contrôle de la tension membranaire, nous nous sommes demandé si la ceinture d'actine apicale, caractéristique des cellules épithéliales, variait pendant l'enroulement, et nous avons en effet constaté une diminution rapide du rapport de fluorescence de l'actine apicale et de l'actine basolatérale, corrélée à la baisse de la tension membranaire, suivie d'un rétablissement des valeurs initiales en 20 minutes environ (*Figure 1F*). En outre, lorsque la dépolymérisation de l'actine était inhibée par un traitement des cellules avec le jasplakinolide, ou induite avant l'enroulement par un traitement avec la latrunculine A, l'augmentation du volume cellulaire ne se produisait pas lors de l'enroulement. Ces expériences ont montré que la dépolymérisation de l'actine était nécessaire, mais pas suffisante, pour que se produise le changement de volume cellulaire. Nous avons également montré l'implication de certains canaux ioniques et des complexes mTORC1 & 2 (*mammalian target of rapamycin 1 & 2*), qui contribuent au contrôle du volume et de la surface cellulaires [10, 11], dans l'augmentation du volume cellulaire provoquée par l'enroulement, car l'inhibition de ces canaux ou de ces complexes perturbait à la fois l'augmentation du volume et son retour aux valeurs initiales.

Nous nous sommes ensuite demandé si la réponse cellulaire pouvait être induite par la compression ou l'étirement se produisant lors de l'induction de la courbure. Après avoir estimé à moins de 15 % la compression théorique de la bicouche en polydiméthylsiloxane lors de l'enroulement, nous avons appliqué une telle compression ou étirement sur une monocouche épithéliale plate en moins de 10 secondes, c'est-à-dire aussi rapidement que lors de l'enroulement : le volume cellulaire, l'actine et la tension membranaire sont restés inchangés. La principale différence par rapport aux rouleaux, où les cellules sont étirées d'un côté et comprimées du côté opposé selon l'axe apico-basal, est que dans une monocouche plate étirée ou comprimée, la déformation est homogène. Enfin, il est remarquable que le gonflement cellulaire et la dépolymérisation de l'actine se produisaient également quand le substrat était enroulé dans le sens inverse, indiquant que cette réponse cellulaire est indépendante du signe de la courbure.

En conclusion, l'augmentation temporaire du volume cellulaire lors de l'induction rapide d'une courbure de l'épithélium est déclenchée par une diminution de la tension membranaire et une dépolymérisation de l'actine, que la cellule perçoit comme analogues aux conséquences d'un choc osmotique hypertonique. Nous avons formulé l'hypothèse que cette réponse active transitoire des cellules à la courbure tissulaire sert à rétablir la tension membranaire, tandis que l'actine se réorganise pour permettre la modification du champ de forces au sein de l'épithélium. Ensuite, la reformation de la ceinture d'actine des cellules dans la nouvelle forme participe au retour au volume cellulaire initial et au rétablissement du champ de forces qui maintient la cohésion des cellules épithéliales. Enfin, il convient de noter que le gonflement cellulaire se produit à la suite de l'induction de courbure sur une distance de plusieurs centaines de µm, ce qui conforte l'idée selon laquelle une réaction collective des cellules à la courbure est nécessaire pour déclencher cette augmentation transitoire du volume de chaque cellule. ◊

Membrane tension, actin and cell volume: temporary responses to induced curvature of an epithelial monolayer

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le consortium SystemsX EpiPhysX, le Fonds national suisse de la recherche (requêtes N°31003A_130520, N°31003A_149975 et N°31003A_173087), ainsi que le Conseil européen de la recherche (requête Consolidator N° 311536) et l'Agence nationale de la recherche française (requête N° ANR-17-CE18-0021-01 BioCaps).

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Sawyer JM, Harrell JR, Shemer G, *et al.* Apical constriction: a cell shape change that can drive morphogenesis. *Dev Biol* 2010 ; 341 : 5-19.
2. Luciano M, Tomba C, Roux A, *et al.* How multiscale curvature couples forces to cellular functions. *Nat Rev Phys* 2024 ; 6 : 246-68.
3. Schamberger B, Ziege R, Anselme K, *et al.* Curvature in biological systems: its quantification, emergence, and implications across the scales. *Adv Mater* 2023 ; 35 : 2206110.
4. Broaders KE, Cerchiari AE, Gartner ZJ. Coupling between apical tension and basal adhesion allow epithelia to collectively sense and respond to substrate topography over long distances. *Integr Biol* 2015 ; 7 : 1611-21.
5. Hu C, Pané S, Nelson BJ. Soft micro-and nanorobotics. *Annu Rev Control Robot Auton Syst* 2018 ; 1 : 53-75.
6. Tomba C, Luchnikov V, Barberi L, *et al.* Epithelial cells adapt to curvature induction *via* transient active osmotic swelling. *Dev Cell* 2022 ; 57 : 1257-70.
7. Cheng X, Zhang Y. Micro/nanoscale 3D assembly by rolling, folding, curving, and buckling approaches. *Adv Mater* 2019 ; 31 : 1901895.
8. Egunov AI, Korvink JG, Luchnikov VA. Polydimethylsiloxane bilayer films with an embedded spontaneous curvature. *Soft matter* 2016 ; 12 : 45-52.
9. Colom A, Derivery E, Soleimanpour S, *et al.* A fluorescent membrane tension probe. *Nat Chem* 2018 ; 10 : 1118-25.
10. Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 2009 ; *89* : 193-277.
11. Eltschinger S, Loewith R. TOR complexes and the maintenance of cellular homeostasis. *Trends Cell Biol* 2016 ; 26 : 148-59.
12. Machado S, Mercier V, Chiaruttini N. LimeSeg: a coarse-grained lipid membrane simulation for 3D image segmentation. *BMC bioinformatics* 2019 ; 20 : 1-12.