

---

# Effet de la déplétion du cholestérol sur les propriétés viscoélastiques des cellules épithéliales alvéolaires évaluées par microscopie à force atomique en grandes déformations

Sophie Féréol, Redouane Fodil

Inserm U955 IMRB, équipe 6, université Paris-Est – Créteil, Créteil, France  
sophie.fereol@inserm.fr, redouane.fodil@inserm.fr

---

**RÉSUMÉ.** L'épithélium alvéolaire joue le rôle de la première barrière physique pour empêcher l'internalisation des molécules nocives ou des germes contenus dans l'air inhalé. Cette fonction est notamment assurée par le maintien de l'intégrité mécanique à l'échelle cellulaire de la membrane plasmique des cellules épithéliales alvéolaires. Le cholestérol est un composant majeur et organisateur de la membrane plasmique, bien connu pour jouer un rôle clé dans les propriétés mécaniques de la cellule et de sa membrane. Cependant, force est de constater que de nos jours, il existe peu de données sur les propriétés mécaniques des cellules épithéliales alvéolaires dans des conditions normales et dans des conditions de déplétion du cholestérol. Dans ce travail, les propriétés viscoélastiques des cellules épithéliales alvéolaires vivantes et adhérentes sont évaluées par une mesure mécanique de la relaxation effectuée par microscopie à force atomique (AFM). Concrètement, pendant une minute une indentation est maintenue dans la cellule, la hauteur piézométrique du cantilever est fixée pendant que la force de relaxation est enregistrée. La première partie de la courbe force–distance obtenue par AFM est ajustée par un modèle basé sur l'approche de Hertz alors que la deuxième partie de la courbe, qui correspond à la phase de relaxation, est analysée via un modèle de Maxwell-Wiechert du second ordre. Les mesures AFM ont été effectuées sur des cellules A549 cultivées pendant 24 h suivant trois conditions de culture différentes : (1) état de base, (2) en présence de méthyle- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) ; cette drogue est connue pour induire une déplétion du cholestérol présent dans la membrane cellulaire et perturber la bicouche lipidique ; et (3) en présence de cytochalasine-D ; cette drogue a pour effet de dépolymériser le cytosquelette d'actine des cellules. Les résultats montrent que (i) comme attendu, la dépolymérisation des filaments d'actine avec la cytochalasine-D diminue la rigidité cellulaire jusqu'à 50 %, et (ii) après 1 heure d'incubation en présence de M $\beta$ CD, la rigidité des cellules A549 augmente jusqu'à 80 % comme cela a déjà été observé pour d'autres types cellulaires. Cette étude met en évidence, d'une part, le rôle clé du cholestérol dans l'intégrité mécanique des cellules épithéliales alvéolaires et, d'autre part, propose un nouveau modèle d'analyse pour extraire les propriétés viscoélastiques cellulaires à partir de données AFM.

**ABSTRACT.** The alveolar epithelium plays the role of the first physical barrier to prevent the internalization of harmful molecules or germs contained in inhaled air. This function is notably assured by the maintenance of the mechanical integrity at the cellular scale of the alveolar epithelial cell plasma membrane. A major component and organizer of the plasma membrane,

*well known to play a key role in mechanical properties of the cell and its plasma membrane, is the cholesterol. But, nowadays there are few data on the mechanical properties of alveolar epithelial cells in normal and in cholesterol-depletion conditions. Thus, in this work, the viscoelastic properties of adherent living alveolar epithelial cells are assessed by a relaxation mechanical assay performed with Atomic Force Microscopy. Concretely, during one minute of indentation in cell, the cantilever piezo height is fixed while the relaxing force is recorded. The first part of the force–distance AFM curve is fitted by a Hertz-based model and the second part of the force–time AFM curve corresponding to relaxation phase is analyzed by a generalized Maxwell-Wiechert model at second order. AFM measurements were performed on A549 cells cultured for 24 h following 3 different culture conditions: (1) baseline condition, (2) Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin condition (M $\beta$ CD); this drug, known to deplete cholesterol in the cell membrane and to disrupt lipid raft, allows to test the role of cortical membrane stiffness in mechanical properties of adherent epithelial cells, and (3) cytochalasin-D condition; this drug depolymerizes the actin cytoskeleton of the cells. The results show that (i) as expected, actin-filament depolymerization with cytochalasin-D decreases cell stiffness up to 50%, and (ii) after 1 hour of M $\beta$ CD incubation, the A549 cell stiffness increases up to 80% as observed in other cell types. This study highlights the key role of cholesterol in the mechanical integrity of alveolar epithelial cells and offers a novel analysis model to extract cellular viscoelastic properties from AFM data.*

**MOTS CLÉS :** *cellules épithéliales alvéolaires, cholestérol, microscopie à force atomique, propriétés viscoélastiques, modèle de Hertz.*

**KEYWORDS:** *alveolar epithelial cells, cholesterol, Atomic Force Microscopy, viscoelastic properties, Hertz model.*

---

DOI: 10.3166/rcma.2017.00004 © 2017 Lavoisier

## **Extended abstract**

### ***Introduction***

The alveolar epithelium, interface area between the environment and the underlying parenchyma, is considered to be a physical and functional barrier actively involved in the clearance of environmental agents. This function is notably assured by the maintenance of the mechanical integrity at the cellular scale of the alveolar epithelial cell plasma membrane. Cholesterol, which is a major lipid component and organizer of the plasma membrane, is well known to play a key role in physical properties of the cytoskeleton and its association with the plasma membrane. But, to our knowledge few studies have described clearly the effect of cholesterol depletion on viscoelastic properties of alveolar epithelial cells. Thus, the aim of this present study is to better characterize the role of cholesterol depletion on the mechanical integrity of cytoskeleton and plasma membrane of alveolar epithelial cells.

### ***Materials and methods***

The assessments of the viscoelastic properties of alveolar epithelial cell line (A549) were performed by relaxation mechanical assay on 1 minute, using Atomic Force Microscopy (AFM) in large deformation. Concretely, during one minute of indentation in cell, the cantilever piezo height is fixed while the relaxing force is recorded. The first part of the force–distance AFM curve is fitted by a Hertz-based model and the second

part of the force–time AFM curve corresponding to relaxation phase is analyzed by a generalized Maxwell-Wiechert model at second order. AFM measurements were performed on A549 cells cultured for 24 h following 3 different culture conditions: (1) baseline condition, (2) Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin condition (M $\beta$ CD); this latter drug, known to induce cholesterol depletion in the cell membrane and to disrupt lipid raft, allows to test the role of cortical membrane stiffness in mechanical properties of adherent epithelial cells, and (3) cytochalasin-D condition; this drug depolymerizes the actin cytoskeleton of the cells.

### ***Results and discussion***

First of all, this study proposes a novel analysis model to extract cellular viscoelastic properties from experimental AFM data. From the stress-relaxation curves analyzed with a generalized second order Maxwell-Wiechert model, the results show that the cytochalasin-D treatment decreases cellular stiffness of alveolar epithelial cells. These well-known results allow us to validate our novel analysis approach and to assign the viscoelastic properties to the cell membrane or the cell cytoskeleton. Indeed, we propose that the first and the second component of the generalized Maxwell-Wiechert model express mostly the mechanical response of the cell membrane and the mechanical response of the cell cytoskeleton, respectively. Using this novel analysis approach, our results concerning the specific role of the cholesterol in viscoelastic properties of alveolar epithelial cells show that the cholesterol-depletion obtained with addition of M $\beta$ CD induces a stiffening of both cell membrane and cytoskeleton of alveolar epithelial cells.

### ***Conclusion***

In this work, we propose a new approach based on geometrical aspects to analyze AFM data obtained with stress-relaxation assay on living cells and to determine their viscoelastic parameters. The cytochalasin D treatment allows to assign the viscoelastic properties to the cell membrane or the cell cytoskeleton. Moreover, the addition of cholesterol-depletion agent such as M $\beta$ CD induces an increasing of the alveolar epithelial cell viscoelastic properties. The analysis by the generalized second-order Maxwell viscoelastic model allows to show the second component related to the cytoskeleton is also affected by the M $\beta$ CD drug this confirms the key role of cholesterol in mechanical properties of the cytoskeleton and its association with the plasma membrane in alveolar epithelial cells.

## **1. Introduction**

L'épithélium alvéolaire, zone d'interface entre l'environnement extérieur et le parenchyme sous-jacent, est considéré comme une barrière physique et fonctionnelle impliquée activement dans la clairance des agents environnementaux. Cette fonction est notamment assurée par le maintien de l'intégrité mécanique à l'échelle cellulaire de la membrane plasmique des cellules épithéliales alvéolaires. Le cholestérol, composant lipidique majeur et organisateur de la membrane plasmique, est bien connu pour jouer un rôle clé dans les propriétés physiques du cytosquelette et de son association avec la

membrane plasmique. En effet, plusieurs études ont montré que la déplétion du cholestérol (1) augmente la rigidité cellulaire (Byfield *et al.*, 2004, 2006) ainsi que les forces de traction exercées par les cellules endothéliales sur leur substrat (Byfield *et al.*, 2006 ; Norman *et al.*, 2010) et (2) renforce l'adhésion membrane-cytosquelette (Sun *et al.*, 2007). Sachant que l'interaction entre le cytosquelette et la membrane plasmique est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'adhésion cellulaire, l'étalement et la structure et le maintien de la monocouche, le cholestérol apparaît comme un élément clé de ces processus cellulaires (Norman *et al.*, 2010). Plus spécifiquement pour les cellules épithéliales alvéolaires, la déplétion du cholestérol joue un rôle dans l'exocytose (Chintagari *et al.*, 2006) et augmente la probabilité de lésions cellulaires (Vlahakis *et al.*, 2002). À notre connaissance, peu d'études ont décrit clairement l'effet de la déplétion du cholestérol sur les propriétés viscoélastiques des cellules épithéliales alvéolaires. Afin de mieux caractériser cet effet, nous proposons dans cette étude d'évaluer les propriétés viscoélastiques d'une lignée cellulaire épithéliale alvéolaire (A549) en réalisant des tests de compression sur 1 minute en grande déformation à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) en condition contrôle et en présence d'une drogue, la Méthyle- $\beta$ -Cyclodextrine (M $\beta$ CD), bien connue pour diminuer la quantité de cholestérol de la membrane plasmique. À partir des courbes contrainte-temps analysées via le modèle de Maxwell-Wiechert du second ordre, les résultats montrent que la déplétion du cholestérol induit une rigidification de la membrane cellulaire et du cytosquelette de la cellule épithéliale alvéolaire. De plus, cette étude propose un nouveau modèle d'analyse permettant d'extraire les propriétés viscoélastiques des cellulaires à partir de données obtenues par AFM.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Culture cellulaire

Les cellules épithéliales alvéolaires humaines de type A549 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 10 % de SVF, 2 mM de L-glutamine, 50 UL/mL de pénicilline, 50  $\mu$ g/mL de streptomycine et incubées dans une atmosphère humide contenant de l'air à 95 % et du CO<sub>2</sub> à 5 %. Pour les expériences en AFM, les lamelles de verre sont préalablement revêtues de fibronectine à une concentration de 10  $\mu$ g/mL pendant 24 h à température ambiante. Ensuite, les lamelles de verre sont rincées trois fois avec du PBS et séchées à température ambiante. Les cellules A549 sontensemencées à une densité de  $50 \times 10^3$  cellules par lamelle de verre, et cultivées en milieu complet avec du sérum pendant 24 h. Une heure avant l'expérience en AFM, les cellules sont incubées dans un milieu sans sérum contenant 0,1 % de BSA. Pour étudier l'effet de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine et de la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique sur les propriétés viscoélastiques des cellules A549, nous avons utilisé respectivement la cytochalasine-D à une concentration de 1  $\mu$ g/mL pendant 11 min et la méthyle  $\beta$ -CycloDextrine (M $\beta$ CD) à une concentration de 5 mg/mL pendant 1 h avant les mesures en AFM. Trois expériences en AFM différentes ont été réalisées.



## 2.2. Marquage de la F-Actine

Les cellules A549, préparées suivant le protocole décrit ci-dessus, sont marquées en utilisant une procédure de marquage standard. Brièvement, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 20 min, puis perméabilisées avec 0,1 % de Triton X-100 préparé dans du PBS. Ensuite, les cellules sont incubées avec de la rhodamine-phalloïdine (Sigma, France) à une concentration de 1  $\mu\text{g/mL}$  pendant 30 min. Après le marquage, les cellules sont recouvertes d'un milieu de montage et conservées à 4 °C pendant toute une nuit avant observation en microscopie à fluorescence.

## 2.3. Mesure de la viscoélasticité sur cellule unique par AFM

Les propriétés mécaniques des cellules épithéliales alvéolaires sont mesurées avec un microscope à force atomique (Nanowizard<sup>®</sup> I, JPK Instruments, Allemagne) en effectuant des expériences d'indentation et de relaxation. Une sonde conique  $\mu\text{mash}^{\text{®}}$  CS37 de demi-angle d'ouverture de 20° et de constante de raideur du bras de levier de 0,3 N/m a été utilisée. La valeur exacte de la constante de raideur du cantilever a été mesurée suivant la méthode du bruit thermique (Hutter, 1993). Au cours de la mesure, la position de la pointe AFM sur la surface apicale de la cellule est contrôlée à l'aide d'un microscope optique. Ensuite, pendant le cycle d'approche–résidence–retrait de la pointe AFM dans la direction verticale, le mode contrôle de la hauteur a été utilisé. La pointe de l'AFM est d'abord approchée à la surface de la cellule à une vitesse de 500  $\mu\text{m/s}$  et est maintenue en contact avec la cellule pendant 1 minute à une distance verticale de 0,5  $\mu\text{m}$  entre la pointe AFM et le substrat (figure 1b). À l'issue de la minute, la pointe est rétractée de la cellule à la même vitesse et revient à sa position de départ. La relaxation cellulaire s'effectue durant la phase de résidence de la pointe dans la cellule. La déflexion du cantilever, pendant la phase de relaxation, est enregistrée pour obtenir la courbe force–temps (figure 1a). Afin d'extraire les propriétés mécaniques de la cellule, les courbes force–distance et force–temps ont été analysées en utilisant respectivement le modèle de Hertz (figure 1c et d) et le modèle viscoélastique de Maxwell-Wiechert du second ordre (figure 1e). Notons que pour déterminer la solution de la relation contrainte–relaxation, nous avons considéré que la variation de l'indentation au cours de l'expérience définie par :

$$\delta(t) = Pc - z_{\text{cantilever}} - d(t), \quad (1)$$

où  $Pc$ ,  $z_{\text{cantilever}}$  et  $d$  sont respectivement le point de contact, la position  $z$  du cantilever commandé par le moteur piézoélectrique et la déflexion du cantilever, est négligeable. Plus précisément, nous avons observé, comme Darling *et al.* (2006) dans leur étude, que la variation de l'indentation était au maximum d'environ 15 %. On remarquera que le fait de négliger les variations de l'indentation durant la phase de relaxation suggère que les propriétés viscoélastiques, déduites par l'ajustement de la courbe contrainte–relaxation par le modèle de Maxwell-Wiechert contiennent une légère erreur, comme l'ont d'ailleurs déjà mentionné Darling *et al.*

## 2.4. Analyse des données

### 2.4.1. Modèle élastique

La courbe force–distance a été ajustée par une équation basée sur le modèle de Hertz permettant de calculer le module d'élasticité  $E$  (figure 1c). Ce modèle suppose que (i) la cellule est un corps lisse, homogène et considérée comme un matériau purement élastique, (ii) la sonde est axisymétrique et infiniment rigide et (iii) la surface de la cellule est une surface plane signifiant que l'axe principal de la sonde est toujours perpendiculaire à la surface de la cellule. Ce modèle peut être décrit par l'équation de Hertz présenté ci-dessous (Bilodeau, 1992) :

$$F(\delta) = \frac{3}{4} \tan(\alpha) \frac{E}{(1 - \eta^2)} \delta^2, \quad (2)$$

avec  $F$  la force appliquée,  $E$  le module élastique de la cellule,  $\nu$  le coefficient de Poisson,  $\alpha$  le demi-angle d'ouverture de la pointe et  $\delta$  l'indentation. De plus, afin de consolider l'hypothèse selon laquelle la cellule peut être considérée comme un matériau élastique, la courbe module de Young-indentation a été tracée (figure 1d). Ce graphique montre que le module Young reste quasi constant sur la plage d'indentation et donc, valide l'hypothèse initiale. Enfin, nous avons considéré  $\eta = 0,3$  (Maniotis *et al.*, 1997).

### 2.4.2. Modèle viscoélastique

Afin de calculer les propriétés viscoélastiques de la cellule, les courbes contrainte–temps, correspondantes à la partie relaxation de la courbe force–temps (partie II de la figure 1a), ont été analysées à l'aide d'un programme écrit sous Matlab® (MathWorks, MA). Ce dernier décrit un modèle de relaxation de Maxwell-Wiechert composé d'un arrangement en parallèle de deux éléments de Maxwell et d'un ressort (Moreno-Flores *et al.*, 2010) (figure 1e).

En considérant le cas d'un test en relaxation, les équations caractéristiques du modèle sont :

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_1 + \sigma_2 \text{ avec } \sigma_0 = \varepsilon_0 E_\infty, \quad (3)$$

avec  $E_\infty$  module élastique au temps infini.

$$\dot{\varepsilon} = 0 = \frac{\sigma_i}{E_i} + \frac{\dot{\sigma}_i}{\eta_i} \text{ avec } i = 1, 2. \quad (4)$$

En intégrant l'équation (4), la contrainte  $\sigma$  devient :

$$\sigma(t) = \sigma_{i_0} \exp(-E_i \times t/\eta_i) = E_i \varepsilon_0 \exp(-t/\tau_i), \quad (5)$$

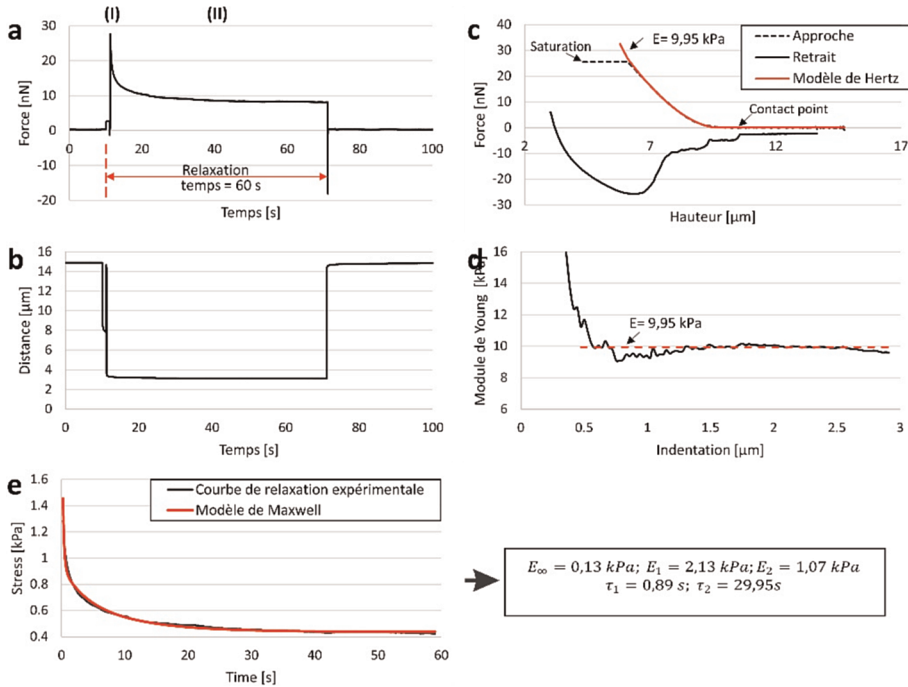


Figure 1. Mesures AFM et ajustement des courbes expérimentales. (a) Force mesurée (liée au mouvement du cantilever) pendant l'essai de relaxation montrant l'indentation rapide dans la cellule (partie I) suivie d'une phase de relaxation de la contrainte sur 1 minute (partie II). D'un point de vue mécanique, la partie I et la partie II décrivent respectivement les réponses élastique et viscoélastique de la cellule. (b) Mesure de la position du cantilever suivant l'axe z en fonction du temps. Cette courbe montre que l'indentation est maintenue quasi constante pendant une minute. (c) Courbe force–distance mesurée pendant la phase d'indentation rapide au départ (partie I) et ajustée par un modèle de Hertz permettant de calculer le module élastique. (d) Variation du module élastique en fonction de l'indentation indiquant que le module élastique reste quasiment constant pendant cette phase. (e) Courbe des variations de la contrainte mesurée par rapport au temps pendant la phase de relaxation (partie II) et ajustée pour le modèle viscoélastique généralisé de Maxwell-Wiechert du second ordre permettant de calculer les modules de compression, et les temps de relaxation

où  $\tau^i = \frac{\eta_i}{E_i}$  est le temps de relaxation.

En remplaçant (5) dans (3), on obtient :

$$\sigma(t) = E_\infty \varepsilon_0 + \sum_{i=1}^2 E_i \varepsilon_0 \exp(-t/\tau_i). \tag{6}$$

Finalement l'équation de Maxwell-Wiechert est obtenue à partir de l'équation (6) en la divisant par  $\varepsilon_0$  :

$$E(t) = E_\infty + \sum_{i=1}^2 E_i \exp(-t/\tau_i). \quad (7)$$

Ainsi, en connaissant la contrainte  $\sigma$  et la déformation  $\varepsilon$ , on peut en déduire par ajustement de la courbe contrainte-déformation, d'une part, le module élastique de compression  $E_\infty$  au temps infini et, d'autre part, les modules élastiques  $E_1$  et  $E_2$ , ainsi que les temps de relaxation du premier et du deuxième compartiment du modèle de Maxwell-Wiechert du second ordre notés respectivement  $\tau_1$  et  $\tau_2$ .

La contrainte est reliée à la force par :

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{S}. \quad (8)$$

Pour déterminer la surface  $S$  sur laquelle la force  $F$  est appliquée, la pointe AFM est considérée comme un cône de rayon  $r$ , de demi angle d'ouverture  $\alpha$  et de hauteur  $\delta$  comme indiqué sur la figure 2a :

$$r = \delta \cdot \tan \alpha \text{ et } S = \pi \cdot r^2 = \pi \cdot [\delta \cdot \tan \alpha]^2. \quad (9)$$

Ainsi :

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{\pi \cdot [\delta \cdot \tan \alpha]^2}. \quad (10)$$

Pour déterminer la déformation  $\varepsilon$ , la cellule est considérée comme un cylindre de rayon  $r$  et de hauteur  $h_{\text{cell}}$  comme indiqué sur la figure 2b.

Le volume du cylindre est :

$$V_{\text{cyl}} = S \cdot h_{\text{cell}}. \quad (11)$$

Et le volume du cône est :

$$V_{\text{cone}} = \frac{1}{3} \cdot S \cdot \delta. \quad (12)$$

Le volume cellulaire pendant l'indentation est donné par :

$$V = V_{\text{cyl}} - V_{\text{cone}}. \quad (13)$$

La déformation peut être définie par :

$$\varepsilon = \frac{V_0 - V}{V_0}. \quad (14)$$

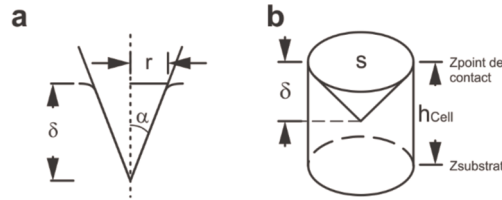


Figure 2. (a) Vue schématique de la pointe AFM de rayon  $r$  et de demi angle d'ouverture avec la profondeur d'indentation notée  $\delta$ . (b) Vue schématique d'une pointe AFM indentant une cellule supposée cylindrique de hauteur  $h_{cell}$

On en déduit que :

$$\varepsilon = \frac{V_{cyl} - (V_{cyl} - V_{cone})}{V_{cyl}} = \frac{V_{cone}}{V_{cyl}} = \frac{1}{3} \cdot \frac{\delta}{h_{cell}}. \quad (15)$$

Ainsi,  $\sigma(t)$  et  $\varepsilon(t)$  peuvent être directement calculés à partir des données expérimentales.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Aucun effet de la déplétion du cholestérol sur la structure de l'actine F

Des études précédentes montrent que l'effet de la déplétion du cholestérol sur la structure de l'actine F est dépendant du type cellulaire. En effet, dans les spermatozoïdes la déplétion du cholestérol induit la polymérisation de l'actine F (Brenner *et al.*, 2003) alors qu'aucun effet n'a été observé dans les cellules endothéliales (Byfield *et al.*, 2004). Dans un premier temps, il était donc important d'étudier plus spécifiquement l'effet de la déplétion du cholestérol dans les cellules épithéliales alvéolaires. Pour ce faire, les cellules A549 ont été incubées avec 5 mM de la M $\beta$ CD pendant une heure avant de les fixer et de marquer leur cytosquelette d'actine (figure 3).

L'analyse des résultats, basée sur une comparaison de la structure de l'actine F des A549 à l'état basal (figure 3a) et après traitement avec la M $\beta$ CD (figure 3b), montre que dans les deux conditions, les cellules sont bien étalées et présentent un cytosquelette d'actine organisé en fibres de stress. Aucune accumulation de l'actine F n'est observée dans les cellules A549 traitées avec la M $\beta$ CD. Ainsi, nous pouvons conclure que la déplétion du cholestérol n'induit ni réorganisation spécifique ni accumulation de l'actine F dans les cellules épithéliales alvéolaires, ce qui est cohérent avec ce qui a déjà été observé dans les cellules endothéliales (Byfield *et al.*, 2004).

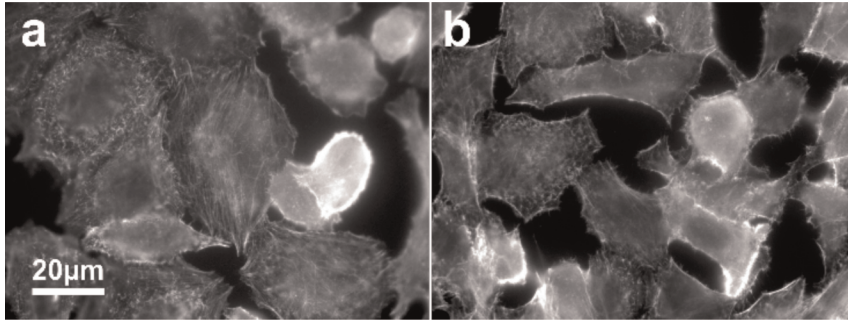


Figure 3. Images prises en microscopie à fluorescence de cellules A549 montrant l'actine F marquée à la rhodamine-phalloïdine après 24 h de culture. En (a) sont présentées les cellules à l'état de base et (b) les cellules appauvries en cholestérol par la présence de la M $\beta$ CD pendant une heure à une concentration de 5 mM. Dans chaque cas, le milieu de culture utilisé est sans sérum. Ces images ont été prises à l'objectif  $\times 63$ .

### 3.2. Aucun dommage cellulaire n'est induit par la mesure en AFM en grande déformation

L'indentation réalisée dans les cellules épithéliales alvéolaires lors de la mesure en AFM étant importante, il fallait s'assurer au préalable que cette déformation n'induisait pas de dommage dans la cellule. Ainsi, pour chaque expérience AFM, l'état de la cellule épithéliale alvéolaire a été suivi par microscopie à contraste de phase pendant toute la durée de la sollicitation dont un exemple est présenté sur la figure 4. Plus spécifiquement, en (figure 4a) l'image montre l'état d'une cellule avant la phase d'indentation, en (figure 4b) l'état de la cellule pendant la phase d'indentation de 1 min, en (figure 4c) l'état de la cellule immédiatement après la fin de la phase d'indentation et fixation de la cellule au paraformaldéhyde, et enfin en (figure 4d) l'état de la cellule 30 secondes après la fin de l'indentation.

Ces images montrent que la cellule ne se rétracte pas pendant l'expérience AFM et que son état reste inchangé. Cependant, un point sombre est visible sur la cellule au niveau du site de l'indentation par la pointe AFM (indiqué par la flèche blanche sur la figure 4d). À partir des images prises en microscopie en contraste de phase, il a été estimé que ce point sombre disparaît totalement en moins d'une minute (données non présentées). Ces observations concordent avec les résultats de Afrin *et al.* (2009). En effet, leur étude montre que la survie de la cellule n'est pas affectée par l'indentation et met en évidence la présence d'un point sombre à la surface des cellules au niveau du site de l'indentation dont la taille est de 1–2  $\mu\text{m}$  juste après la fin de l'indentation et réduite de moitié après 1 min seulement. Ces résultats sont obtenus alors même que la force d'indentation utilisée est 2,5 à 4 fois plus importante que celle utilisée pour notre étude (environ 80–120 nN), ce qui conforte la validité de nos observations. Afin de caractériser la déformation de la cellule induite par

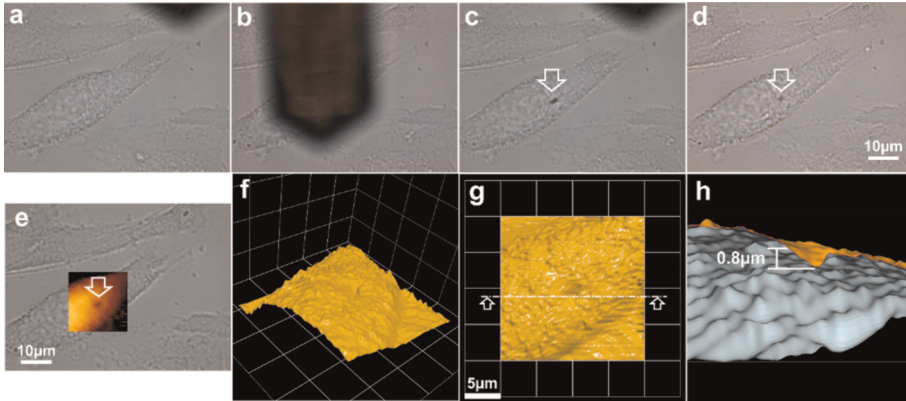


Figure 4. Images prises en microscopie à contraste de phase montrant une cellule épithéliale alvéolaire (a) avant l'indentation, (b) pendant l'indentation où la pointe AFM apparaît en noir sur l'image, (c) à la fin de l'indentation, c'est-à-dire au moment de la fixation cellulaire au PFA et (d) 30 secondes après la fin de l'indentation. En (e) est montrée la superposition de l'image (c) et du scan de surface de la cellule réalisée par AFM à l'endroit où l'indentation a été réalisée. Les flèches blanches indiquent la zone où l'indentation AFM a été effectuée. Reconstruction 3D de la surface de la cellule issue du scan de surface avec en (f) la vue en perspective, en (g) la vue du dessus et en (h) la vue du plan de coupe. À partir de l'image (h), la profondeur de la déformation induite par l'indentation a été évaluée à  $0,8 \mu\text{m}$ .

l'indentation AFM, un scan de la surface de la cellule, fixée immédiatement à la fin de l'indentation, a été réalisé au niveau du site de l'indentation. Ainsi, l'image de la figure 4e montre la superposition de ce scan de surface avec l'image prise en microscopie en contraste de phase de la même cellule. À partir de ce scan, nous avons réalisé une reconstruction 3D de la surface de la cellule présentée sur la figure 4f–h suivant les vues en perspective (figure 4f), du dessus (figure 4g) et du plan de coupe (figure 4h). La reconstruction 3D de la surface cellulaire nous permet d'estimer la profondeur de l'indentation à  $0,8 \mu\text{m}$  et d'en déduire que la déformation de la cellule reste locale (figure 4h). Contrairement à l'étude de Afrin *et al.*, nous considérons que cette déformation n'induit pas de trou dans la membrane, d'une part, car nos courbes force–distance ne présentent pas de discontinuité caractéristique d'une rupture de la membrane comme ce qui a été rapporté par Afrin *et al.* (2009) et, d'autre part, après avoir fixé la cellule et marqué sa membrane plasmique avec un marqueur spécifique à la fin de l'indentation, aucune trace relative à un trou n'a été observé par immunofluorescence au niveau du site de l'indentation (données non présentées). L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que notre essai de relaxation cellulaire par AFM n'induit aucun dommage pour les cellules épithéliales alvéolaires.



### 3.3. Validité et interprétation des modèles théoriques utilisés

Pour cette étude, nous proposons une nouvelle méthode de détermination expérimentale des modules de compressions en fonction du temps en tenant compte des aspects géométriques du système pour déterminer la contrainte et la déformation (figure 2 et équations (10) et (15)). Nos résultats, obtenus à partir de l'ajustement de nos courbes expérimentales forces–distances par des courbes théoriques basées, d'une part, sur le modèle de Hertz et, d'autre part, sur le modèle viscoélastique généralisé de Maxwell-Wiechert au second ordre, sont présentés respectivement sur la figure 5a–d et résumés dans le tableau 1.

En premier lieu, nous pouvons noter que les ajustements des courbes expérimentales par les courbes théoriques issues des modèles de Hertz et de Maxwell-Wiechert sont parfaitement cohérents.

Dans un premier temps, nous analyserons plus spécifiquement les résultats présentés dans le tableau 1 pour la condition à l'état de base. Les résultats obtenus par ajustement avec le modèle de Hertz montrent que les cellules épithéliales alvéolaires ont un module de Young de  $11 \pm 1,6$  kPa. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Li *et al.* (2016), qui donne un module d'Young pour ces mêmes cellules de  $\sim 2,5$  kPa évalué également par AFM. Nous supposons que la légère différence observée entre les résultats est probablement due à la vitesse d'approche qui est plus petite ( $12,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) dans l'étude de Li *et al.* (2016) comparée à notre étude ( $500 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Concernant les modules de compression obtenus par ajustement avec le modèle généralisé de Maxwell-Wiechert, nous obtenons que  $E_1$  est égal à  $2,8 \pm 0,3$  kPa et  $E_2$  égal à  $1,5 \pm 0,2$  kPa (tableau 1). Ces valeurs sont dans la même gamme de valeurs que celles obtenues par Moreno *et al.* pour des cellules de carcinome du sein (MCF-7) évaluées par AFM en appliquant le même test de relaxation mais sur 2 secondes (Moreno-Flores *et al.*, 2010), ce qui suggère que nos valeurs caractéristiques sont cohérentes avec celles déjà observées pour d'autres types cellulaires.

En ce qui concerne les temps de relaxation, nous obtenons que  $\tau_1$  et  $\tau_2$  sont respectivement égaux à  $\sim 1$  s et 14 s, tandis que Li *et al.* (2016) ont obtenu, pour les mêmes cellules, des valeurs pour  $\tau_1$  et  $\tau_2$  respectivement égales à  $\sim 0,05$  s et 0,55 s. Ces différences observées peuvent être dues au temps de relaxation lors de l'essai mécanique qui est de 2 s dans l'étude de Li *et al.* (2016) et de 1 min pour notre présente étude.

Dans un deuxième temps, nous analyserons plus spécifiquement les résultats présentés dans le tableau 1 pour la condition cytochalasine-D dont les effets largement décrits dans la littérature consistent en la dépolymérisation du cytosquelette d'actine F induisant une diminution de la rigidité cellulaire des cellules épithéliales alvéolaires (Féréol *et al.*, 2009). Son utilisation nous permet ainsi de vérifier la validité de notre approche dans l'analyse de nos données AFM. Avec le modèle de Maxwell-Wiechert, nous montrons que la cytochalasine-D induit bien une diminution de  $E_1$  et  $E_2$  respectivement de 45 % et 54 % après avoir incubé les cellules épithéliales alvéolaires avec cette drogue pendant 11 minutes. Ces résultats concordent avec l'étude de Moreno

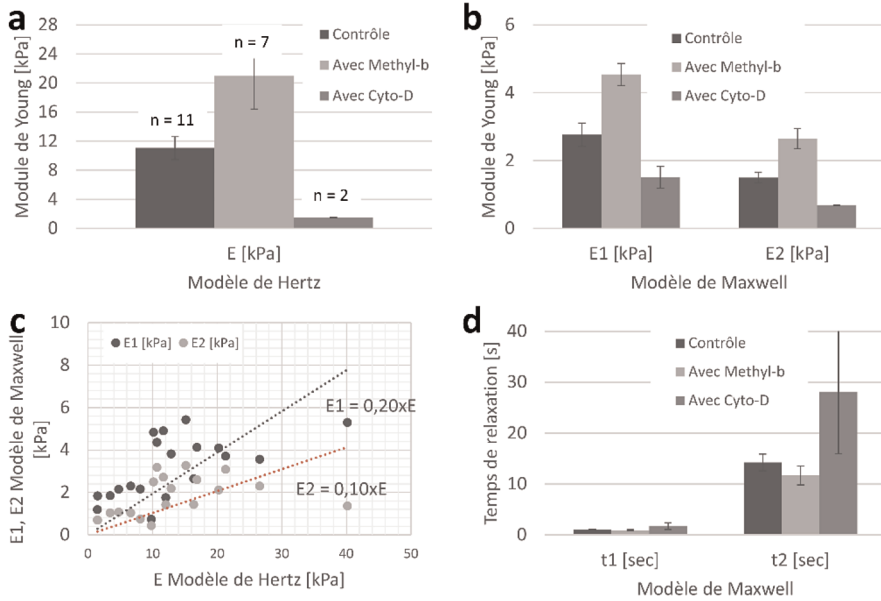


Figure 5. Changements des propriétés mécaniques des cellules épithéliales alvéolaires après un traitement de 11 min avec la cytochalasine-D et d'une heure avec la MβCD calculée avec (a) un modèle basé sur Hertz et (b, d) un modèle généralisé de Maxwell-Wiechert. En (c) sont reportées les valeurs de E1 et E2 en fonction de E

Tableau 1. Caractéristiques mécaniques des cellules épithéliales alvéolaires cultivées dans trois conditions de culture différentes : à l'état de base, en présence de MβCD ou de cytochalasine-D. Les résultats sont obtenus en ajustant les données expérimentales avec le modèle de Hertz pour E<sub>hertz</sub> ou avec le modèle de relaxation de Maxwell-Wiechert du second ordre pour les autres paramètres du tableau

	État de base	MβCD	Cyto-D
$E_{\text{hertz}}$ [kPa]	11,1 ± 1,6	21,0 ± 4,6	1,5 ± 0,1
$E_{\infty}$ [kPa]	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1
$E_1$ [kPa]	2,8 ± 0,3	4,5 ± 0,3	1,5 ± 0,3
$E_2$ [kPa]	1,5 ± 0,2	2,6 ± 0,3	0,7 ± 0,1
$\tau_1$ [s]	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,7
$\tau_2$ [s]	14,2 ± 1,7	11,7 ± 1,9	28,1 ± 12,1

*et al.*, qui montrent que les modules de compression  $E_1$  et  $E_2$  des cellules MCSF-7, évalués par l'AFM et après un traitement des cellules avec la cytochalasine-D pendant 15 min, diminue de 36 % et 70 %, respectivement (Moreno-Flores *et al.*, 2010). De plus, comme le suggère Moreno *et al.*, nous montrons que l'effet de la cytochalasine-D est plus élevé sur la deuxième composante du modèle de Maxwell-Wiechert que sur la première composante. Connaissant les effets de la cytochalasine-D sur le cytosquelette d'actine F, nous proposons que la deuxième composante du modèle de Maxwell-Wiechert exprime principalement la réponse mécanique du cytosquelette et la première composante exprime principalement la réponse mécanique de la membrane, comme l'ont déjà suggérés Moreno-Flores *et al.* (2010).

À présent, comparons le module élastique obtenu à partir du modèle de Hertz et les modules de compression,  $E_1$  et  $E_2$ , obtenus avec le modèle de Maxwell-Wiechert. Pour ce faire, nous avons reporté sur la figure 5c les évolutions de  $E_1$  et de  $E_2$  en fonction de  $E_{\text{Hertz}}$ . En première approximation, nous avons ajusté les résultats par une fonction linéaire. Il apparaît que les rapports  $E_1/E_{\text{Hertz}}$  et  $E_2/E_{\text{Hertz}}$  sont égaux respectivement de 0,2 et 0,1. Ce calcul donne des informations sur l'ordre de grandeur qui sépare  $E_1$ ,  $E_2$  et  $E_{\text{Hertz}}$ .

Finalement, l'ensemble de ces résultats montre que notre approche pour calculer  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $\tau_1$  et  $\tau_2$  à partir de mesures AFM est cohérente avec d'autres études de la littérature, ce qui valide notre méthode. Ce résultat est d'autant plus important que le formalisme, permettant de calculer la contrainte  $\sigma$  et la déformation  $\varepsilon$ , n'exige que la connaissance des données géométriques du système, faciles à obtenir par la mesure AFM.

#### **3.4. Effet de la déplétion du cholestérol sur les propriétés mécaniques des cellules épithéliales alvéolaires**

Nos résultats montrent que la déplétion du cholestérol induit une augmentation du module Young de 89 % évalué par le modèle Hertz et une augmentation des modules de compression  $E_1$  et  $E_2$  de 64 % et de 77 % respectivement, évalués par le modèle Maxwell-Wiechert. Ces résultats sont cohérents avec l'étude de Byfield *et al.* (2004) qui montrent que la déplétion du cholestérol induit une augmentation de la rigidité des cellules endothéliales évaluée par aspiration par micropipette. Par ailleurs, Vlahakis *et al.* (2002) montrent qu'une déplétion du cholestérol induit une diminution non significative de la rigidité des cellules A549. Ce résultat semble être contraire aux nôtres. Cependant, les résultats de Vlahakis *et al.* (2002) sont obtenus avec une autre technique de micromanipulation cellulaire appelée cytométrie de torsion magnétique qui utilise une microbille liée spécifiquement au cytosquelette pour évaluer le module de Young. En outre, le module Young obtenu avec cette technique est un module de Young moyen représentatif de toute une population cellulaire et, par conséquent, l'effet de la déplétion du cholestérol peut être atténué, cela pourrait expliquer les différences observées.

Finalement, nous montrons qu'une déplétion du cholestérol induit une rigidification des cellules épithéliales alvéolaires. Plus précisément, puisque nous avons attribué les

propriétés mécaniques de la première composante du modèle de Maxwell-Wiechert à la membrane cellulaire et la seconde au cytosquelette, nos résultats semblent indiquer que le cytosquelette est également affecté par une déplétion du cholestérol montrant ainsi le lien étroit entre le cytosquelette et la membrane plasmique.

#### 4. Conclusion

Dans cette présente étude, nous proposons une nouvelle approche basée sur des considérations géométriques pour analyser les données issues d'un test de relaxation en contrainte réalisé en AFM sur des cellules vivantes et en déduire les caractéristiques viscoélastiques de ces dernières. Il s'avère que le traitement par la cytochalasine-D permet d'attribuer des propriétés viscoélastiques à la membrane ou au cytosquelette de la cellule. De plus, la présence d'un agent aboutissant à la déplétion du cholestérol, tel que la M $\beta$ CD, induit une augmentation des modules de Young des cellules épithéliales alvéolaires. L'analyse, via le modèle généralisé de Maxwell-Wiechert du second ordre, permet de montrer que le deuxième compartiment supposé être lié au cytosquelette, est également affecté par la présence de la M $\beta$ CD. Ceci confirme le rôle clé du cholestérol dans les propriétés mécaniques du cytosquelette et de son lien avec la membrane plasmique des cellules épithéliales alvéolaires.

#### Remerciements

*Ce travail a été soutenu par une subvention de type « Projet Exploratoire Premier Soutien » proposé par le Centre National de Recherches Scientifiques.*

#### Bibliographie

- Afrin R., Zohora U.S., Uehara H., Watanabe-Nakayama T., Ikai A. (2009). Atomic force microscopy for cellular level manipulation: imaging intracellular structures and DNA delivery through a membrane hole. *J. Mol. Recognit.*, vol. 22, p. 363-372.
- Bilodeau G.G. (1992). Regular pyramid punch problem. *J. Appl. Mech.*, vol. 59, p. 519-523.
- Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J., Breitbart H. (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, vol. 68, p. 837-845.
- Byfield F.J., Aranda-Espinoza H., Romanenko V.G., Rothblat G.H., Levitan I. (2004). Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys. J.*, vol. 87, p. 3336-3343.
- Byfield F.J., Tikku S., Rothblat G.H., Gooch K.J., Levitan I. (2006). OxLDL increases endothelial stiffness, force generation, and network formation. *J. Lipid Res.*, vol. 47, p. 715-723.
- Chintagari N.R., Jin N., Wang P., Narasaraaju T.A., Chen J., Liu L. (2006). Effect of cholesterol depletion on exocytosis of alveolar type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 34, p. 677-687.

- Darling E.M., Zauscher S., Guilak F. (2006). Viscoelastic properties of zonal articular chondrocytes measured by atomic force microscopy. *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 14, p. 571-579.
- Féréol S., Fodil R., Laurent V.M., Balland M., Louis B., Pelle G., Hénon S., Planus E., Isabey D. (2009). Prestress and adhesion site dynamics control cell sensitivity to extracellular stiffness. *Biophys. J.*, vol. 96, p. 2009-2022.
- Hutter J.L.B.J. (1993). Characterization of atomic-force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 64, p. 1868-1873.
- Li M., Liu L., Xiao X., Xi N., Wang Y. (2016). Effects of methotrexate on the viscoelastic properties of single cells probed by atomic force microscopy. *J. Biol. Phys.*
- Maniotis A.J., Chen C.S., Ingber D.E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, p. 849-854.
- Moreno-Flores S., Benitez R., Vivanco M., Toca-Herrera J.L. (2010). Stress relaxation and creep on living cells with the atomic force microscope: a means to calculate elastic moduli and viscosities of cell components. *Nanotechnology*, vol. 21, p. 445101.
- Norman L.L., Oetama R.J., Dembo M., Byfield F., Hammer D.A., Levitan I., Aranda-Espinoza H. (2010). Modification of cellular cholesterol content affects traction force, adhesion and cell spreading. *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 3, p. 151-162.
- Sun M., Northup N., Marga F., Huber T., Byfield F.J., Levitan I., Forgacs G. (2007). The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J. Cell Sci.*, vol. 120, p. 2223-2231.
- Vlahakis N.E., Schroeder M.A., Pagano R.E., Hubmayr R.D. (2002). Role of deformation-induced lipid trafficking in the prevention of plasma membrane stress failure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 166, p. 1282-1289.