

Université de Montréal

**Amélioration des techniques de volumétrie, tant au niveau technique et
numérique, et étude des variations du volume cellulaire lors de chocs hypotoniques**

Par

Nicolas Groulx

Département de Physique, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de maîtrise
En Physique
Option Biophysique

Juillet 2006

©, Nicolas Groulx, 2006

Page d'identification du jury



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Amélioration des techniques de volumétrie, tant au niveau technique que
numérique, et étude des variations du volume cellulaire lors de chocs hypotoniques**

Présenté par :
Nicolas Groulx

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Rikard Blunck
Président-rapporteur
Ryszard Grygorczyk
Directeur de recherche
Jean-Yves Lapointe
Codirecteur
Rémy Sauvé
Membre du jury

SOMMAIRE

Si on soumet une cellule à une solution saline hypotonique, celle-ci va se mettre à augmenter son volume. Il existe plusieurs moyens qui permettent à la cellule de supporter ce genre d'état : la cellule peut changer de forme, elle peut augmenter sa surface en utilisant le surplus de membrane présent à la membrane et aussi en utilisant la membrane provenant de l'exocytose. À ce jour, la source et la contribution relative de ces réserves membranaires ne sont pas bien connues.

Le but de ce projet était d'améliorer une technique d'imagerie qui implique l'acquisition de deux images (profil et base) dans le temps d'une cellule gonflant lorsqu'elle est soumise à un choc hypotonique. Ces images permettent par la suite de reconstruire la cellule en 3D et de mesurer les changements rapides de volume et de surface lors d'un gonflement cellulaire. Grâce à cette technique, nous avons étudié la contribution de membrane provenant de la surface et de l'exocytose lors de gonflements provoqués par des chocs hypotoniques à 50% et à 98%.

La précédente version du montage expérimental ne nous permettait pas d'acquérir simultanément le profil et la base de la cellule. Il était donc impossible d'étudier précisément les augmentations importantes de volume et de surface d'une cellule dont la base et le profil changeaient significativement durant un gonflement extrême. L'utilisation du programme Excel ralentissait l'analyse des résultats. Dans le nouveau montage, nous avons ajouté une seconde vue simultanée et nous avons créé un programme MatLab qui nous a permis d'analyser les résultats plus efficacement et avec plus de précision.

Afin de déterminer l'augmentation maximale qu'une cellule peut supporter, nous les avons soumis à un choc hypotonique extrême à 98% (l'osmolarité de la solution physiologique a été baissée à 2%) afin de les faire gonfler jusqu'à la lyse cellulaire. Nous avons produit les courbes d'augmentation de volume et de surface des cellules de quatre lignées cellulaires différentes (cellules épithéliales de poumons humain

A549 et 16HBE14o⁻ et des cellules fibroblastiques, soit des NIH-3T3 de souris et des cellules d'ovaires de hamster chinois CHO). Ces tests ont révélés de très grandes réserves de membranes pour toutes les cellules des lignées étudiées. En effet, les cellules

ont pu augmenter leur volume initial de 10- à 12- fois, et leur surface initiale de 3.5 fois avant la rupture membranaire.

Afin de déterminer la contribution intracellulaire de membrane, nous avons bloqué l'exocytose en préincubant les cellules avec 1mM de N-ethylmaleimide (NEM), ou en réduisant la température à 10°C. Ces traitements ont été appliqués sur les cellules A549 for les chocs hypotoniques à 50% et 98%. Nous avons trouvé que l'exocytose permettait à la cellule d'augmenter plus de 6 fois son volume initial et plus de 2 fois sa surface initiale durant un gonflement extrême. Curieusement, le blocage de l'exocytose n'a pas vraiment affecté l'augmentation de volume et de surface cellulaire lors d'un choc hypotonique à 50%. Ceci nous révèle que la contribution de membrane provenant de l'exocytose est significative seulement durant les chocs extrêmes. Durant un gonflement plus modéré, les cellules utilisent majoritairement les réserves préexistantes sous forme de villosités à la surface membranaire, alors que l'exocytose n'a pas de contribution significative.

Mots clefs : réserves membranaires, volume cellulaire, exocytose, solution hypotonique, gonflement cellulaire

SUMMARY

During hyposmotic swelling, to accommodate expanding volume (V), animal cells change their shape and increase surface area (SA) by drawing the extra membrane from surface and intracellular reserves. Relative contribution of these processes, sources and extent of membrane reserves are not well defined.

The aim of this project was to ameliorate a dual-view cell imaging technique which involves acquisition of single cell images at two perpendicular directions: side profile and cell base. This enables to reconstruct a single cell shape in 3D and to measure rapid V and SA changes of substrate-attached cells during hypotonic swelling. With this technique, I studied the contribution of surface and intracellular membrane reserves to cell swelling in moderate 50% and extreme 98% hypotonic solutions.

The previous version of the set up did not allow to acquire simultaneously images of the side profile and the base of the cell. Therefore, it was impossible to study large volume and surface increases where both cell base and side profile undergo extensive changes. Data analysis was also slowed down because it was performed with Excel. In the improved set-up I added a second simultaneous view and I created a MatLab code that allowed us to perform analyses more efficiently and with more precision.

To determine the upper limit of V and SA increases, cells were subjected to extreme 98% hypotonic shock and allowed to swell until membrane ruptured. The augmentation of V and SA with respect to time for different cell lines (human lung carcinoma A549 cells, murine NIH/3T3 fibroblasts, human bronchial epithelial 16HBE14o⁻ cells and Chinese hamster ovary (CHO) cells) was plotted. These tests revealed surprisingly large membrane reserves for all cell types tested. Cells could increase their initial volume by 10- to 12- fold, and their SA 3.5-fold before membrane ruptured.

To determine the contribution of intracellular membrane reserves I blocked exocytosis by preincubating cells with 1mM of N-ethylmaleimide (NEM), or by reducing temperature to 10°C. These treatments were performed on A549 cells for both 98% and 50% shocks. I found that exocytosis of intracellular membrane allows the cell

to swell up to 6-folds its initial volume and up to 2-folds its initial SA. Interestingly, blocking exocytosis had no effect on SA and V increase during a 50% hypotonic shock. This reveals that the contribution of membrane exocytosis is significant only during extreme swelling. During moderate swelling, however, cells utilize mainly SA reserves pre-existing on the cell surface, such as unfolding of the membrane, while exocytosis has negligible effects.

Keywords: membrane reserves, cell volume, exocytosis, hypotonic solution, cell swelling

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS	xiv
REMERCIEMENTS	xvii
1 : INTRODUCTION	1
1.1. Le gonflement cellulaire.....	1
1.1.1. Le phénomène	1
1.1.2. La régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique	4
1.2. Les réserves de membranes	5
1.2.1. Accommodation d'une augmentation de volume.....	5
1.2.2. Phénomène de fusion	7
1.3. Organisation cellulaire et réaction lors du gonflement	9
1.3.1 Général	9
1.3.2. Importance de l'actine.....	10
1.3.3. Rôle des filaments d'actine sur la régulation du volume cellulaire	12
1.3.4. Changements extrêmes de volume	14
1.4. Modèles mécaniques	15
1.4.1. La théorie de la tenségrité	15
1.4.2. La spinogénèse	17
1.5. Hypothèses et objectifs.....	17
2 : MÉTHODOLOGIE.....	20
2.1. Culture cellulaire	20

2.2. Montage.....	21
2.3. Expérience.....	22
2.4. Analyses	23
2.4.1. Utilisation de DISUR	23
3 : ARTICLE	25
Abstract	27
Introduction	28
Materials and Methods	30
Results	32
Discussion	36
Acknowledgements	42
Figure and legends.....	43
References	57
4 : DISCUSSION	59
4.1. Les techniques d'études du volume et limitations.....	59
4.1.1. Coulter Counter	59
4.1.2. Micro spectrophotométrie	60
4.1.3. Microscopie optique.....	61
4.1.4. Microscopie confocale (CLSM).....	61
4.1.5. Microscopie à force atomique (AFM).....	62
4.1.6. Microscopie à conductance ionique à balayage (SICM).....	62
4.1.7. Avantages de la technique DISUR.....	63
4.2. Les cinétiques d'augmentation de volume	64
4.2.1. Effet de l'attachement au substrat	69
4.3. Réserves de membranes	72
4.3.1. Réserves membranaires lors d'un choc hypotonique extrême	74
4.3.2. Réserves membranaires lors d'un choc hypotonique modéré.....	76

4.3.3. Implications du cytosquelette.....	78
4.4. Perspectives	80
4.4.1. Implications de la nature des cellules.....	80
4.4.2. Comportement du cytosquelette.....	81
4.4.3. Études reliées.....	81
4.5. Améliorations	82
4.5.1. Sources d'erreurs.....	82
4.5.2. Améliorations techniques.....	83
4.5.3. Améliorations numériques	84
CONCLUSION	85
BIBLIOGRAPHIE	xviii
ANNEXE	xxix

LISTE DES TABLEAUX

DISCUSSION

Tableau 4.1. : Taux d'augmentation de volume et de surface cellulaire67

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1.1. :	Les causes de l'augmentation de volume	3
Figure 1.2. :	Réponses mécaniques d'une membrane suite à une perturbation d'étirement.....	6
Figure 1.3. :	Transport vésiculaire	8
Figure 1.4. :	Polymérisation et dépolymérisation de l'actine	10
Figure 1.5. :	Réseau d'actine durant un mouvement de la cellule.....	11
Figure 1.6. :	Structure de tensegrité.....	16

MÉTHODOLOGIE

Figure 2.1. :	Montage expérimental.....	21
Figure 2.2 :	Interfaces numériques du programme informatique	24

ARTICLE

Figure 1 :	Flow chamber and dual-image microscopy setup	48
Figure 2 :	SA and volume of resting cells	49
Figure 3 :	Time-course of cell volume and surface changes during swelling in 98% hypotonic solution	50
Figure 4 :	SA and volume of maximally-swollen cells at the time of burst in 98% hypotonicity	52
Figure 5 :	Time-course of A549 cell swelling in 98% hypotonicity after blocking exocytosis.....	53
Figure 6 :	Time-course of A549 swelling in 50% hypotonicity	54
Figure 7 :	Effect of blocking exocytosis on maximal A549 cell SA and volume during 50% hypotonic swelling	55
Figure 8 :	Substrate attachement influences cell SA and kinetics of hypotonic	

	swelling	56
Figure 9 :	Relative contribution of cell shape changes and SA reserves to hypotonic volume expansion of A549 cells	57

DISCUSSION

Figure 4.1. :	Augmentation de surface (gauche) et de volume (droite) des cellules dans le temps.....	65
Figure 4.2. :	Comportement sphérique des cellules lors d'un choc hypotonique à 98%	68
Figure 4.3. :	Temps moyen de lyse cellulaire.....	70
Figure 4.4. :	Effets de l'attachement des cellules au substrat sur la surface cellulaire et augmentation de volume extrême.....	71
Figure 4.5. :	Valeurs maximales de surface et de volume des cellules lors d'un choc hypotonique à 98%.....	73
Figure 4.6. :	Volume et surface des A549 lors d'une augmentation de volume après avoir bloqué l'exocytose	74
Figure 4.7. :	Contributions relatives des changements de forme de la cellule, de l'étirement membranaire, de la réserve sous-membranaire et de la réserve de membrane déjà présente à la surface cellulaire au gonflement des A549	75
Figure 4.8. :	Augmentation de volume des A549 lors d'un choc hypotonique à 50%	76
Figure 4.9. :	Valeurs maximales de surface et de volume des A549 lors d'un choc hypotonique modéré à 50% si l'exocytose est bloquée.....	78

ANNEXE

Figure A :	Vue 3D des deux plans d'une cellule adhérente	xxxii
Figure B :	Corrélation entre les images de la base et du profil	xxxiii

Figure C :	Corrélation entre les images de la base et du profil (suite).....	xxxiii
Figure D :	Génération des tranches numériques de cellules.....	xxxiv
FigureE :	Approximation cylindrique permettant d'évaluer une unité de volume.....	xxxv

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

3D	3 dimensions
1G	1 gigaoctet
16HBE14o ⁻	human bronchial epithelial cell line
AA	acides aminés
A549	human lung carcinoma cell
AFM	microscopie à force atomique
Ares	est la surface disponible grâce au réservoir interne de membrane
A _t	section d'aire de la cellule tirée artificiellement
BoNT	<i>Clostridium botani</i>
CHO	ovaire de hamster chinois
CLSM	microscopie confocale à balayage laser
D	distance entre la fin des vecteurs, soit le point A ou le point B, et l'axe passant par nc
DISUR	dual image surface reconstruction
DMEM-MEM	milieu cellulaire
ER	réticulum endoplasmique
F-actine	actine filamenteuse
FBS	sérum de bovin foetal
GTP	guanine triphosphate
G-actine	monomère d'actine
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
int	surface formée par la base de la cellule sur la lamelle

J_v	flux au travers de la membrane cellulaire
kPa	kilo pascal
L	litre
L_p	conductivité hydraulique membranaire
m	mètre
Osm	osmole (unité physique de pression osmotique)
nc	position du noyau
nc'	projection du centre du noyau
NEM	N-ethylmaleimide
NHE	antiporteur Na^+/H^+
NIH-3T3	murine fibroblaste
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
MgCl_2	dichlorure de magnésium
Pen-Strep	pénicilline streptomycine
RAM	mémoire vive
RSD	regulatory surface decrease
r_{max}	rayon maximal
RVD	regulatory volume decrease
SA	surface area
SICM	microscopie à conductance ionique à balayage
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptors
SNAP	soluble NSF adaptor proteins
S_{max}	augmentation totale de surface à la fin du choc hypotonique à 98%

S_0	surface initiale
S_{endo}	augmentation de surface permise par les réserves intracellulaires
S_{surface}	augmentation de surface permise par les repliements membranaires à la surface cellulaire
S_{stretch}	augmentation de surface due à l'étirement de la membrane
t	temps
TeNT	<i>Clostridium tetani</i>
V	volume
V_{max}	augmentation totale de volume à la fin du choc hypotonique à 98%
V_{endo}	augmentation de volume permise par les réserves intracellulaires
V_{surface}	augmentation de volume permise par les repliements membranaires à la surface cellulaire
V_{stretch}	augmentation de volume due à l'étirement de la membrane
V_{shape}	augmentation de volume dû aux changements de forme de la cellule
VSOAC	volume sensitive organic osmolyte anion channel
v_{ij}	vecteur AA'
$v_{(i+1)j}$	vecteur BB'
Δp	gradient de pression hydrostatique
$\Delta \pi$	gradient de pression osmotique
μ	concentration d'électrolytes
γ	tension membranaire (N/m)

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier le Dr. Ryszard Grygorczyck, qui m'a soutenu et conseillé tout au long de ma maîtrise. Il m'a permis de travailler avec son équipe de recherche pour contribuer à ses travaux dans le milieu de la biophysique.

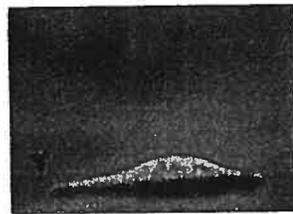
Je remercie aussi très chaleureusement le Dr. Jean Yves Lapointe, pour tout le support technique et moral dont il a fait preuve tout au long de ce projet. Je tiens d'autant plus à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir conseillé lors de la rédaction de mon mémoire.

Je remercie aussi très chaleureusement madame Hélène Chabot, pour tout son support précieux durant la réalisation de mon projet. En plus d'avoir été toujours prête à donner un coup de main quand le besoin s'en faisait sentir, elle m'a beaucoup conseillé dans la rédaction de mon mémoire et a fait preuve d'un grand esprit critique qui m'a évité de commettre des erreurs lors de la rédaction de mon mémoire.

Je remercie aussi très sincèrement monsieur Michel Brunet, qui m'a beaucoup aidé et conseillé lors de la réalisation de la chambre à perfusion et du reste de mon montage expérimental.

Enfin, je tiens à remercier les autres membres de mon jury de correction, Dr. Rikard Blunck et Dr. Rémy Sauvé d'avoir bien voulu prendre de leur temps pour évaluer mon mémoire de recherche.

1. INTRODUCTION



1. Introduction

1.1. Le gonflement cellulaire

1.1.1. Le phénomène

La cellule est l'unité du vivant. Son intégrité est assurée par la membrane plasmique. Cette membrane cellulaire externe est composée d'une double couche de bicouche lipidique, principalement des phospholipides, du cholestérol et des glycolipides, dans laquelle sont insérées diverses protéines tels des récepteurs, des transporteurs et des enzymes. La perméabilité de la membrane plasmique est sélective : les molécules liposolubles et les gaz la traversent facilement, tandis que seulement certaines molécules hydrosolubles la traversent grâce à des transporteurs spécifiques de chacune d'elles (Kusumi & Suzuki, 2005; Alberts B. *et al.*, 2001).

Les forces associées à la cellule dans un système expérimental sont la pression osmotique et les forces générées par le cytosquelette sur la membrane ainsi que des forces externes applicables expérimentalement (comme des forces statiques, cycliques, pressions hydrostatiques, forces de cisaillement, compressions, vibrations à hautes fréquences) (Waters *et al.*, 2002; Banes *et al.*, 1999). La cellule répond à ce genre de stimuli en modifiant son rythme de division, de différenciation, de mouvement, signal de transduction, expression de gènes, de sécrétion, d'endocytose et de mort (Belousov *et al.*, 1975; Belousov *et al.*, 1999; Apodaca, 2002).

Le volume des cellules change quand elles sont exposées à des milieux extracellulaires hyper ou hypotoniques, durant la maturation des cellules, leur croissance, leur différenciation ou encore quand l'apoptose survient. De plus, la migration cellulaire ainsi que les différentes variations de formes que peuvent prendre les cellules nécessitent obligatoirement une certaine régulation du volume. Tout changement dans le volume cellulaire des cellules animales sous ces conditions est, en principe, basé sur la perméabilité de la membrane plasmique à l'eau (ce phénomène étant d'autant plus facilité grâce aux aquaporines) (Wehner *et al.*, 2003).

En effet, les changements rapides dans le volume cellulaire sont causés par un mouvement d'eau au travers de la membrane cellulaire (J_v), qui est dirigé par un gradient de pression hydrostatique (Δp) et osmotique ($\Delta \pi$). Tout cela dépendant de la conductivité hydraulique de la membrane cellulaire (L_p). On obtient ainsi :

$$J_v = L_p(\Delta p - \Delta\pi) \quad (1.1)$$

Il est important de noter que la membrane cellulaire elle-même ne peut pas supporter une grande pression hydrostatique (pas plus de 2kPa). Il faut que la tension provoquée par cette pression soit compensée. La compensation se fait grâce au cytosquelette qui est ancré à la membrane qui agit comme un mécano-protecteur face aux augmentations de tension membranaire. Ainsi, les interactions de la membrane avec le cytosquelette permettent de supporter un grand gradient de pression hydrostatique, et les flux d'eau responsables de l'augmentation de pression sont gouvernés par le gradient osmotique au travers de la membrane. Les aquaporines sont responsables de la conductivité hydrique L_p (équation 1.1.) et leur présence dans la membrane influencera directement le flux hydrique (Hill *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 1998).

Une augmentation de pression hydrostatique entraîne une augmentation de volume cellulaire qui sera régulée par l'activation de plusieurs canaux ioniques et transporteurs. Plus les échanges se feront rapidement, plus la régulation du volume sera efficace. Les canaux ioniques sont particulièrement intéressants lors d'un gonflement de la cellule : en effet, les ions se déplacent jusqu'à 1000 fois plus vite dans un canal spécifique que dans n'importe quelle protéine porteuse connue (transporteurs de sucres, ATPases, symporteurs, antiporteurs...). Il ne faut pas toutefois négliger le rôle des protéines porteuses, car même si elles sont moins efficaces que les canaux ioniques, elles se trouvent en plus grand nombre à la surface. Grâce aux canaux ioniques, des ions tels que Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ou Cl^- peuvent diffuser passivement dans le sens de leurs gradients électrochimiques respectifs à travers la double couche lipidique. La capacité d'une cellule à contrôler les flux ioniques est essentielle à de nombreuses fonctions cellulaires, comme la régulation du volume cellulaire (Alberts B. *et al.*, 2001).

Une cellule a plusieurs voies de transport sensibles au volume. L'augmentation de volume de la cellule ne peut toutefois être induit que de deux manières distinctes :

- augmentation de volume en milieu isotonique : dans un milieu isotonique, l'augmentation a lieu quand la concentration intracellulaire d'électrolytes (μ) augmente (soit par le fait de provoquer l'entrée de sodium par exemple, ou en inhibant d'autres canaux). Le volume augmente avec la force ionique du cytoplasme (Garcia-Romeu *et al.*, 1996).

- augmentation de volume en milieu hypotonique : quand la concentration d'électrolytes du milieu où baigne la cellule diminue. La concentration ionique intracellulaire diminue donc en même temps que la cellule gonfle (Garcia-Romeu *et al.*, 1996).

La cellule répondra à une augmentation de volume en activant des voies de transports sensibles au volume qui balanceront la perte nette de concentration ionique intracellulaire. La phase de régulation de la diminution du volume (RVD) de la cellule s'enclenche. Cette phase est déclenchée par la sortie des ions K^+ et Cl^- de la cellule vers le milieu via soit des canaux ioniques spécifiques, soit des co-transporteurs ou encore des échangeurs travaillant en parallèles (Sarkadi & Parker, 1991). Après avoir grossies, les cellules rejettent aussi des déchets organiques via un canal spécifique, le VSOAC (Volume Sensitive Organic Osmolyte Anion Chanel). On peut aussi voir d'autres voies de régulation activées, comme la perméabilité au Na^+ , à la choline et au tetramethylammonium (Garcia-Romeu *et al.*, 1996).

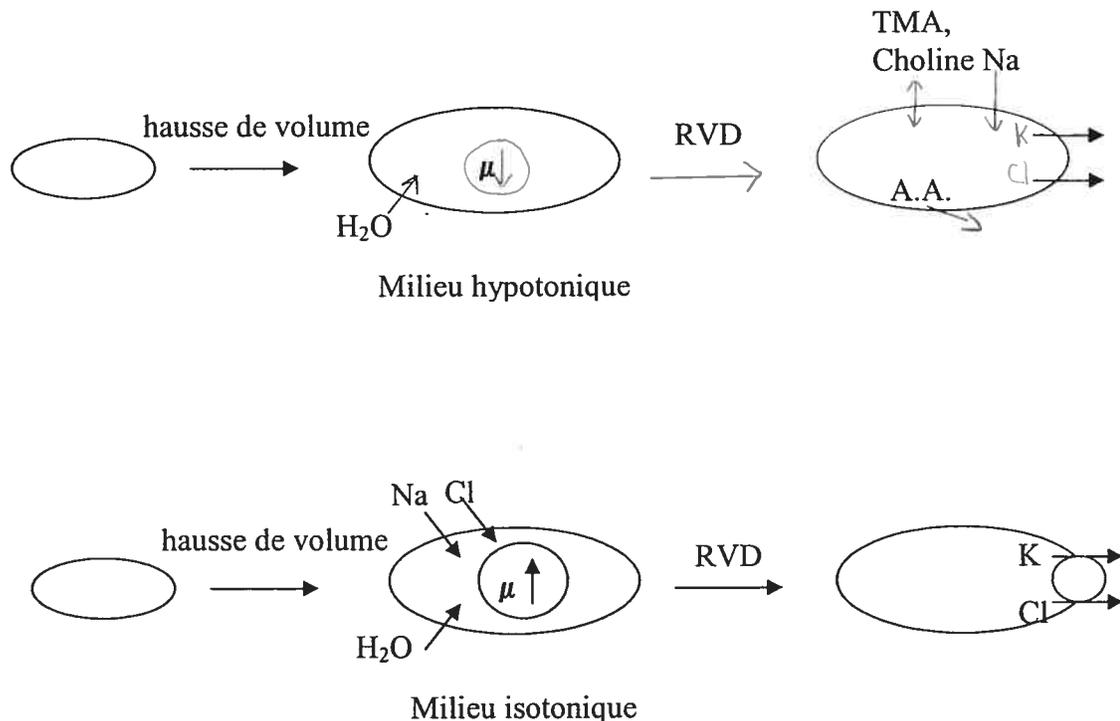


Figure 1.1. : les deux causes de l'augmentation de volume cellulaire (Garcia-Romeu *et al.*, 1996).

1.1.2. La régulation du volume cellulaire lors d'un choc osmotique

Voyons plus en détail le processus d'augmentation de volume. On peut distinguer deux phases très nettes : la phase d'augmentation de volume, qui est le résultat de la diffusion de l'eau à travers la membrane et la phase de diminution du volume qui résulte de l'activation de mécanismes de protection. Ainsi, si l'on soumet une cellule à une osmolarité inférieure à 300 mOsm/litre (hypotonique), l'eau aura tout naturellement tendance à entrer dans la cellule, la déformant et mettant sa membrane sous tension (Benchimol, 1999). En réponse à un stress osmotique, les cellules synthétisent ou accumulent des solutés organiques pour rétablir une pression intracellulaire cytoplasmique favorable à la croissance. Ces solutés sont essentiellement des polyols (glycérol, mannitol), des sucres solubles (glucose, saccharose...), des acides aminés non essentiels (glycine, proline, taurine, acide pipécolique...), des composés à groupements ammonium quaternaire appelés bétaïnes (glycine bétaïne, homobétaïne). On appelle ces solutés des osmolytes. Bien qu'on attribue le terme d'osmolytes à des solutés organiques, il arrive que l'on parle d'osmolytes inorganiques (Cl^- , K^+ ,...) quant aux ions qui sont mis à contribution dans la régulation de l'osmose (Boillot, 1999; Bagnasco *et al.*, 1999; Bagnasco *et al.*, 1986).

La phase RVD (Regulatory Volume Decrease) survient lorsque la cellule termine sa phase d'augmentation de volume. Elle va tenter de s'opposer à l'augmentation de volume en déclenchant des mécanismes qui vont aboutir à une diminution du volume de la cellule. Les systèmes de transports sont immédiatement activés afin de régir le largage des ions K^+ et Cl^- . Leurs flux transmembranaires surviennent soit par différentes voies de transport indépendantes, soit par des voies de transport couplées. Voici les principaux responsables de cette phase (Ordaz *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 1998):

- les canaux K^+ et Cl^- : grâce à un courant K^+ dirigé vers l'extérieur dans la majorité des cellules animales, toute augmentation de l'activité des canaux K^+ facilite la sortie de cet ion. De plus, l'augmentation de la conductance membranaire au K^+ va hyperpolariser la membrane, ce qui favorisera également la sortie des ions Cl^- qui suivront le potentiel de la membrane. Ceci augmentera la dépolarisation cellulaire de la membrane, mécanisme qui facilitera par le fait

même la sortie des ions K^+ . Le mécanisme d'activation le plus efficace sera l'activation en parallèle des canaux K^+ et Cl^- (Wehner *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 1998);

- le symporteur $K^+ - Cl^-$: dans la majorité des systèmes, le largage électroneutre des ions $K^+ Cl^-$ semble être le mécanisme le plus important dans la phase RVD;
- les canaux cationiques : un stress hypotonique peut induire l'activation de canaux cationiques non sélectifs. Dans ces conditions, il a été montré que la perméabilité de ces canaux était légèrement plus importante aux ions K^+ qu'aux ions Na^+ (Wehner *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 1998);
- osmolytes organiques dans la phase RVD : après la phase initiale d'augmentation de volume, les cellules commencent presque aussitôt à relâcher des osmolytes organiques, en plus des osmolytes inorganiques. Jusqu'à 50% des osmolytes peuvent être relâchés durant cette phase. Une cellule peut perdre passivement jusqu'à 50% de sa taurine (organique) au courant de cette phase (Wehner *et al.*, 2003).

1.2. Les réserves de membranes

1.2.1. Accommodation d'une augmentation de volume

Une des plus importante fonction de la membrane plasmique est de servir de barrière flexible entre les constituants cellulaires et l'environnement externe (Alberts B. *et al.*, 2001; Raucher & Sheetz, 1999). Lors d'une augmentation de volume, la cellule peut s'adapter en changeant de forme, en étirant sa membrane ou par exocytose de vésicules membranaires fusionnant à la membrane. En effet, lors d'un gonflement, l'accommodation provenant de l'élasticité de la membrane ne représente que 3-4% du gonflement total de la cellule (Evans & Skalak, 1979; Morris & Homann, 2001).

Le processus d'exocytose est le transport de molécules vers l'extérieur de la cellule via des vésicules de sécrétion. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent leur contenu (neuromédiateurs, protéines solubles et autres macromolécules) dans le milieu extracellulaire (Harter & Wieland, 1996). Durant l'exocytose, les vésicules arrivent sous forme de cargo relâchés par le réseau Golgien et

fusionnent à la membrane en réponse à un stimulus, comme la tension (Apodaca, 2002). Par exemple, il est à noter que si on veut augmenter la surface d'une cellule adhérente typique (dont la surface est de $1000 \mu\text{m}^2$ en général) de $1 \mu\text{m}^2$, il faudrait augmenter la tension membranaire de la cellule de 500% (Raucher & Sheetz, 1999). Ce qui veut dire qu'en plus d'une réserve de membrane pré-existante sous forme de villosités, un réservoir interne de membrane doit être utilisé pour empêcher la lyse de la cellule lors du gonflement cellulaire.

Dans les faits, la membrane plasmique va s'étendre graduellement suite à un étirement tonique en incorporant des phospholipides à partir d'un réservoir intracellulaire, réduisant de ce fait la tension membranaire (Cutillas *et al.*, 2005).

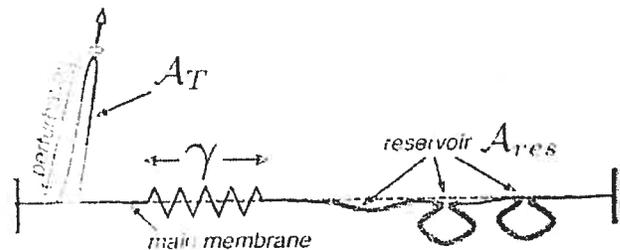


Figure 1.2. : Réponse mécanique d'une membrane suite à une perturbation d'étirement. A_T est la section de la membrane étirée, γ est la tension membranaire et A_{res} est la réserve sous-membranaire (Sens & Turner, 2006).

Certaines études montrent la possibilité que la quantité de membrane présente sous forme d'invaginations soit contrôlée par la tension membranaire (Dulhunty & Franzini-Armstrong, 1975). On retrouve ce phénomène chez les vésicules, qui s'arrondissent pour devenir des sphères (Evans E., 1992), et aussi chez les globules rouges, qui s'arrondissent et se fragmentent après la destruction du cytosquelette suite à un trop gros gonflement. On sait aussi qu'un excédent de membrane est nécessaire au fonctionnement des macrophages, ou de toutes autres cellules phagocytaires (Burwen & Satir, 1977). Des études ont montré qu'une grande tension membranaire favorisait le phénomène de fusion membranaire, abaissant ainsi l'énergie libre du système (énergie disponible pour permettre au système d'adopter certaines configurations) (Hamill & Martinac, 2001).

Une des hypothèses les plus soutenues est que la tension est liée au trafic membranaire et à l'adhésion membrane/cytosquelette. Cela permet de réguler des fonctions cellulaires importantes, incluant l'endocytose, et la motilité (Raucher & Sheetz, 1999).

1.2.2. Phénomène de fusion

L'exocytose est l'un des processus liés à la fusion membranaire (Snyder *et al.*, 2006). La fusion membranaire est présente tout au long du trafic intracellulaire, qui est une succession de bourgeonnements de vésicules, à partir d'un compartiment donneur, qui ensuite fusionnent avec un compartiment cible (Duman & Forte, 2003).

Les mécanismes régissant l'exocytose sont encore mal connus, bien que de très nombreux acteurs protéiques aient été identifiés (activité GTPase, senseurs à calcium, complexe NSF/SNAP/SNAREs). En particulier, les SNAREs sont des molécules clés du mécanisme de fusion membranaire. Ces protéines, présentes à la fois sur la membrane cible et la vésicule, sont capables de s'associer pour former un complexe thermodynamiquement très stable (Duman & Forte, 2003; Thomas Sollner *et al.*, 1993).

La vision actuelle du processus est que les protéines SNAREs sont à la base de la fusion des membranes mais que d'autres protéines, qualifiées d'accessoires, telles que l'ATPase NSF, les SM proteins, rSly ou encore SNAP, doivent les assister dans leur fonction. NSF se fixe aux protéines de fusion SNAREs par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice SNAP. L'ensemble NSF/SNAP joue un rôle important dans le processus de fusion : il facilite la dissociation des complexes SNAREpin (ensemble de trois Q-SNAREs (anciennement appelé v-SNARE) et de deux R-SNAREs (anciennement appelé t-SNARE)) résultant de la fusion de deux membranes ou d'une association accidentelle des Q- et R-SNAREs (Matsushita *et al.*, 2005; Humeau *et al.*, 2000). Les R-SNAREs sont toujours des protéines transmembranaires, alors que les Q-SNAREs sont soit transmembranaires (type II, protéine à N-terminal cytoplasmique et un seul segment transmembranaire) soit membranaires intrinsèques (ancrée à la membrane). En présence d'ATP, tous les composants du complexe SNAP/NSF sont nécessaires pour assurer la fusion de vésicules. On sait que ce sont les SNAREs qui sont responsables de la fusion et les SNAPs et les NSF s servent à garder les Q- et R-

SNARES dans un état dissocié et donc potentiellement disponibles pour la fusion (Thomas Sollner *et al.*, 1993; Wolfram Antonin *et al.*, 2002).

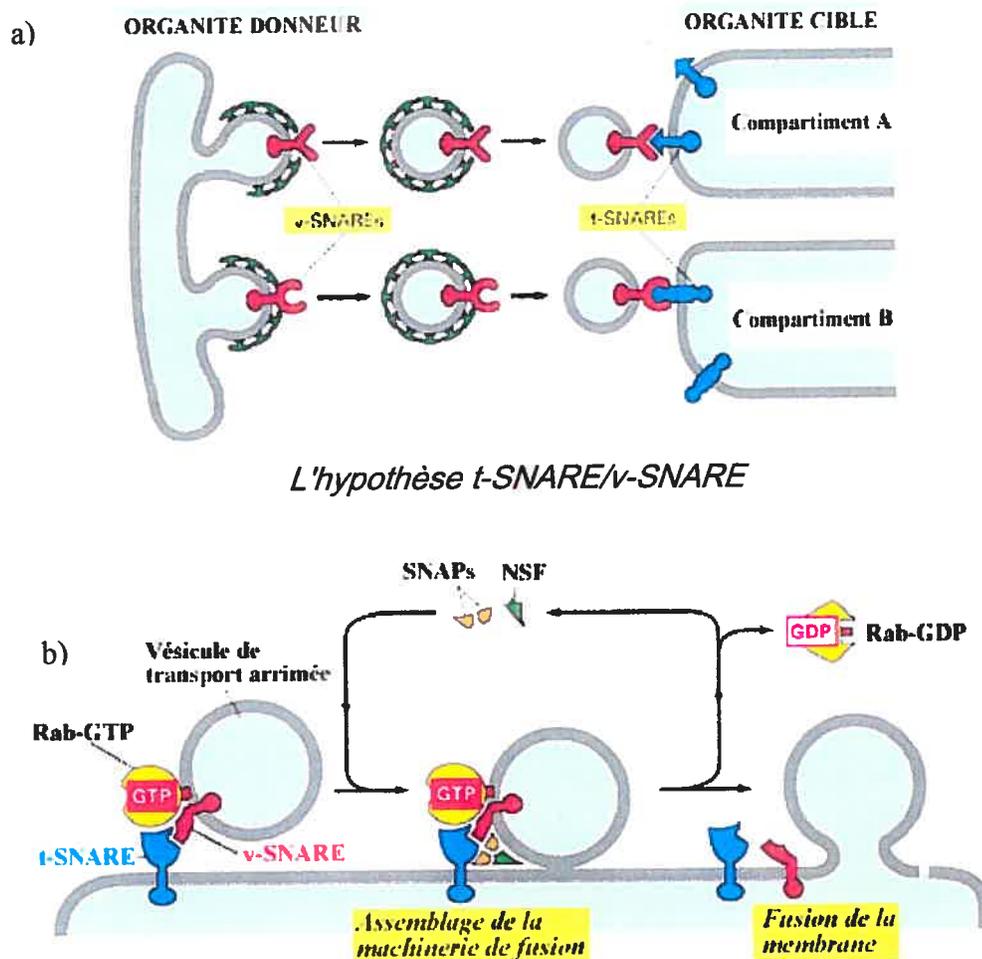


Figure 1.3. : a) figure montrant le ciblage vésiculaire à la membrane grâce à la présence de Q-et R-SNARES.

b) figure montrant l'importance du complexe NSF/SNAP dans le processus de fusion (Alberts B. *et al.*, 2001).

La fusion membranaire est sensible au N-éthylmaléimide (Matsushita *et al.*, 2005), un réactif utilisé pour la détection des groupes sulfhydryl des protéines et dont on a montré l'activité inhibitrice de la libération d'histamine par les mastocytes, processus impliquant de nombreuses fusions membranaires. Au moins un des récepteurs intracellulaires du N-éthylmaléimide impliqué dans la fusion membranaire s'est révélé être une ATPase, la NSF. C'est en inhibant l'activité de cette ATPase que le N-éthylmaléimide bloque l'endo et l'exocytose.

La température agit également sur l'exocytose. Une température basse a pour effet de diminuer de façon très importante le taux de fusion de membrane vésiculaire. On parle d'un facteur 100 si on passe de 37°C à 20°C (Nunes-Correia *et al.*, 2003). Si on perfuse une cellule avec une solution physiologique maintenue à 10°C, on inhibe totalement le phénomène d'exocytose et de fusion membranaire à la surface de la cellule (Vizi, 1998; Renstrom *et al.*, 1996).

Pour bloquer de façon spécifique l'exocytose, on peut traiter les cellules avec des toxines bactériennes produites par *Clostridium tetani* (TeNT) ou *Clostridium botulinum* (BoNT, sérotypes A à G), connues pour se lier spécifiquement sur les différentes protéines impliquées dans la fusion membranaire (Bohnel & Gessler, 2005; Seagar M. *et al.*, 2001).

La fusion de vésicules à la membrane peut aussi être contrôlée grâce à la concentration du calcium intracellulaire. Si on la maintient suffisamment basse, on arrête le processus de fusion (Alberts B. *et al.*, 2001).

1.3. Organisation cellulaire et réaction lors du gonflement

1.3.1. Général

L'actine et la tubuline sont des polymères dynamiques dont l'unité de base (G-actine ou l'hétérodimère de la tubuline) permet de polymériser ou de dépolymériser un filament d'actine ou un microtubule. Un microtubule est un tube dont la paroi est constituée de plusieurs protofilaments de tubuline. En général on en compte 13 par microtubule. Chaque protofilament est lui-même constitué de dimères de tubuline, tubuline-alpha et tubuline-bêta. Cet assemblage polymérique est extrêmement dynamique : les extrémités des microtubules polymérisent et dépolymérisent en permanence. Les deux extrémités des microtubules ont des propriétés différentes. Il existe une extrémité plus (+) où les dimères s'ajoutent et une extrémité moins (-) qui au contraire perd progressivement ses dimères (à moins d'être stabilisée). La polymérisation met en jeu l'hydrolyse du GTP (guanosine triphosphate). Les microtubules jouent un rôle très important dans la division cellulaire (mitose) et dans les mouvements du cytoplasme dans la cellule grâce à la coopération entre les microfilaments d'actine (Boal, 2003; Alberts B. *et al.*, 2001).

Les filaments d'actine sont responsables de la structure de la cellule et sont dynamiques également. Chaque extrémité d'un filament grossit et se réduit à des rythmes différents : l'extrémité qui grossit rapidement est appelée l'extrémité plus (+), et l'extrémité qui grossit lentement s'appelle moins (-). Les monomères s'attachent au bout plus et voyagent à travers le filament pour être rejetés dans le milieu cellulaire par le bout moins. Le monomère est transformé dans la cellule pour recommencer la réaction (Boal, 2003; Alberts B. *et al.*, 2001).

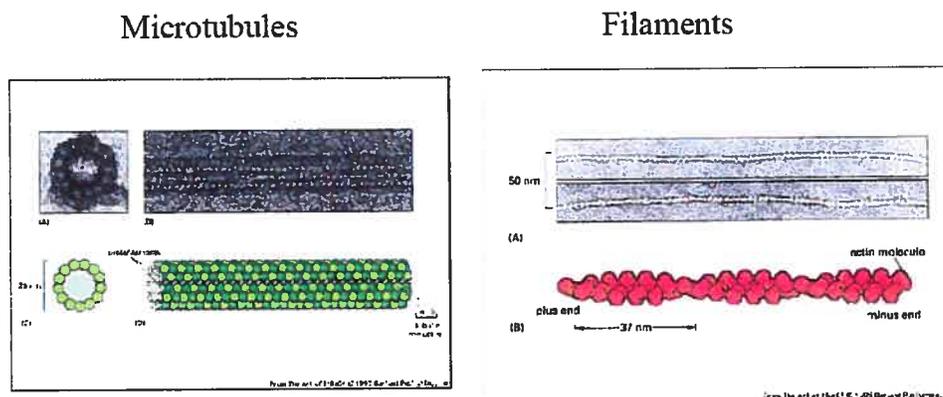


Figure 1.4. : Que ce soit pour des filaments d'actine ou de tubuline, le principe de polymérisation reste le même, soit une extrémité où elle se produit rapidement (+) et une autre où elle se produit lentement (-) (LMD physiopathologie cellulaire, 2004).

Les filaments jouent également un rôle dans la locomotion de la cellule. Par exemple, les fibroblastes se déplaçant sur un substrat grâce aux pseudopodes formés par ces filaments (Boal, 2003; Alberts B. *et al.*, 2001).

1.3.2. Importance de l'actine

Le cytosquelette est constitué de filaments d'actine associés à des protéines qui, une fois assemblés, forment un réseau intracellulaire dynamique essentiel à la régulation de la stabilité de la forme cellulaire, et de la mobilité cellulaire. En condition physiologique et en présence d'une concentration ionique adéquate et d'ATP, les filaments d'actine peuvent se polymériser en de longs filaments hélicoïdaux. L'actine peut être trouvée dans plusieurs états dans la cellule. Des transitions dynamiques

peuvent entraîner le changement d'une conformation à l'autre et seraient le mécanisme central du déplacement cellulaire, l'arrondissement de la cellule, l'étalement cellulaire sur un substrat et le transport de protéines à la membrane cellulaire (Cantiello, 1997). Ce sont les protéines spécifiques à la liaison de l'actine qui sont responsables des différentes conformations qu'elle peut prendre, car elles aident à modifier la conformation tridimensionnelle des filaments d'actine en liant les filaments d'actine soit en réseaux qui forment des gels ou encore en paquets serrés comme dans les microvillosités (Matsudaira, 1991). Les protéines de liaison à l'actine peuvent se lier soit à l'actine filamenteuse (F-actine) ou encore au monomère d'actine (G-actine), ce qui régularise la polymérisation de l'actine, et permet aussi de lier les filaments à des structures cellulaires comme les microtubules et la membrane plasmique. La plupart des protéines pouvant se lier à la F-actine possèdent au moins deux domaines de liaison, ce qui permet à plus d'un filament d'actine de s'entrecroiser. La distance entre ces domaines de liaison détermine la conformation que prendra l'actine, car ils vont permettre la formation de paquets serrés, comme pour les microvillosités, ou encore, la conformation tridimensionnelle nécessaire pour former un gel d'actine.

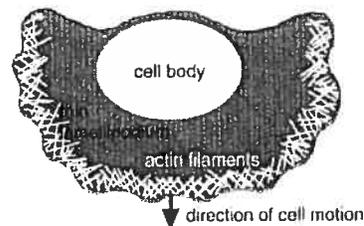


Figure 1.5. : Filaments d'actine qui apparaissent à haute densité aux bordures de la membrane pour produire un mouvement de la cellule sur un substrat (Boal, 2003).

Les arrangements tridimensionnels de F-actine typique des gels d'actine ont la caractéristique de résister aux déformations. Ceci implique une stabilité dans la balance dynamique entre interaction et opposition de forces, incluant une pression osmotique, positive ou négative, l'élasticité des polymères...

Le cytosquelette d'actine, est couplé à une grande variété de protéines transmembranaires, incluant des molécules de transport ionique, comme la Na^+ , K^+ - ATPase épithéliale (elle stimule cette dernière : l'actine augmenterait son affinité au Na^+) (Morrow, 1989), le co-transporteur Na^+ , K^+ , Cl^- , l'échangeur Na^+/H^+ , et des canaux ioniques spécifiques au Na^+ et K^+ . Ceci montre l'importance des filaments d'actine dans le contrôle des fonctions membranaires. En plus de réguler l'activité de nombreux canaux K^+ (Pedersen *et al.*, 2001), le cytosquelette d'actine joue aussi un rôle auprès de certains canaux ioniques : il y a des interactions entre des canaux ioniques activés par l'étirement membranaire et les filaments d'actine. Le changement des propriétés élastiques du cytosquelette affecte l'activité de ces canaux, surtout les canaux Na^+ , les canaux K^+ et une grande variété de canaux non sélectifs (Cantiello, 1997).

1.3.3. Rôle des filaments d'actine sur la régulation du volume cellulaire

L'interaction des filaments d'actine avec les protéines de transport ionique montre l'importance des changements de l'organisation structurale des filaments d'actine sur le contrôle des fonctions membranaires.

Les différentes structures du cytosquelette agissent donc comme des effecteurs de fonctions cellulaires spécifiques. Elles organisent les interactions entre les filaments d'actine (c'est-à-dire le croisement de protéines liantes à l'actine) et elles permettent ainsi que les différents phénomènes résultant de la réponse aux différents signaux de l'environnement, tels le changement de forme de la cellule et sa mobilité, puissent survenir (Pedersen *et al.*, 2001; Cantiello, 1997). On ne connaît pas beaucoup les différents mécanismes impliquant le contrôle du volume de l'actine sous forme de gel qui pourrait affecter le volume cellulaire (Cantiello, 1997).

De plus, si l'on considère que le cytosquelette est composé de microfilaments d'actine et que ceux-ci sont connus pour être des systèmes dynamiques qui supportent et organisent les mécanismes et les fonctions membranaires (Mills *et al.*, 1994; Luna & Hitt, 1992; Papakonstanti *et al.*, 2000), le cytosquelette d'actine joue un rôle de senseur et de contrôleur des changements de volume cellulaire (Hoffman E.K. & Dunham PB, 1995).

En fait, comme nous le verrons plus loin, le réseau de filaments d'actine peut former, grâce à des protéines de liaisons spécifiques, un gel d'actine (Cantiello, 1997), lequel est sensible à la force ionique. Ce gel serait un lien direct avec les transports ioniques à travers la membrane plasmique. Les changements dans la balance osmotique et ionique affectent l'équilibre de ce gel, activant de ce fait les processus de régulation volumique (Papakonstanti *et al.*, 2000).

De plus on a découvert que les filaments d'actine se dépolymérisaient durant le gonflement cellulaire. Un effet attribuable partiellement au Ca^{2+} intracellulaire. En effet, la concentration de calcium intracellulaire augmente après un gonflement cellulaire. Ce qui provoque la dépolymérisation des filaments d'actine à cause de la liaison Ca^{2+} /gelsoline (Bibby & McCulloch, 1999). Ces fragments de filaments vont interagir par la suite avec le cytosquelette et des canaux Na^+ sensibles à ces fragments pour réguler le volume cellulaire. Il est à noter que la dépolymérisation du réseau d'actine peut aussi participer à l'activation des canaux ioniques mécano sensitifs (Lang *et al.*, 1998). De plus, la dépolymérisation du réseau d'actine pourrait faciliter la fusion de canaux contenus dans les vésicules de membranes avec la membrane plasmique (Aunis & Bader, 1988). On pense que le cytosquelette joue un rôle important dans la régulation du volume cellulaire et surtout au niveau de la polymérisation de l'actine, processus aussi très dépendant des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire (Hoffman, 2000; Mills *et al.*, 1994). Ainsi, la réponse à la régulation du volume cellulaire implique aussi des changements dynamiques dans l'organisation des filaments d'actine (Cantiello, 1997).

On sait que la capacité des cellules à changer de forme, à se mouvoir sur un substrat ou tout autre façon de bouger est largement due à la capacité de la cellule à faire subir des changements de transformation gel/solide à son cytosquelette d'actine. En fait, même si les changements du cytosquelette sont associés à plusieurs activations cellulaires, la plupart des phénomènes de régulation, et spécialement ceux concernant l'homéostasie sel/eau intracellulaire, sont contrôlés par la membrane plasmique. Mais évidemment, ceci ne peut survenir qu'en étant synchronisé avec les changements de structure du cytosquelette, c'est-à-dire les différentes conformations du gel d'actine (Strange, 2004).

Les réseaux intracellulaires d'actine sont des structures de gel élastiques qui peuvent soit augmenter de volume (ou diminuer de volume) en accompagnant des flux hydrauliques. Ce comportement est gouverné par la présence des protéines de liaison spécifiques à l'actine et aussi par la capacité qu'ont ces réseaux à se fragmenter mécaniquement en petits morceaux. Au fur et à mesure que la structure du gel se transforme, un nouvel équilibre va affecter la capacité du gel à accommoder les différents mouvements de fluides (qui provoquent des changements de concentration en électrolytes) entraînant des changements de volume cellulaire. Plus le réseau d'actine est solide, plus la cellule aura de la difficulté à gonfler et plus il est souple, plus il sera facile à la cellule de gonfler.

Un couplage entre le cytosquelette d'actine et les mécanismes de transport membranaire des ions au niveau de la membrane plasmique est nécessaire afin de préserver une certaine homéostasie hydroélectrique intracellulaire, et donc du volume cellulaire (Cantiello, 1997).

1.3.4. Changements extrêmes de volume

Si on considère une cellule dans une situation dans laquelle elle aurait gonflé jusqu'à la limite de la lyse cellulaire, il n'est pas trop difficile d'imaginer une cellule dont la forme rappelle celle d'une sphère. Dans cette situation, les tensions qui s'exercent sur la membrane sont évidemment énormes et dans ces conditions, la F-actine joue un rôle dans la création d'une force résistive afin de contrer l'augmentation de volume et donc afin de réduire la tension ressentie par la membrane (Linshaw *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 1994). Pour la plupart des lignées cellulaires étudiées, le gonflement cellulaire ne serait pas limité par l'augmentation de la tension membranaire, mais plutôt par un manque de membrane pouvant s'insérer à la surface via les invaginations, qui semblent modulés par le cytosquelette d'actine (F-actine). Le facteur limitant du gonflement serait donc le réseau d'actine formant le cytosquelette (qui permet aux vésicules membranaires de se diriger à la surface de la cellule) plutôt que la résistance de la membrane (Okada, 1997).

1.4. Modèles mécaniques

Les filaments du cytosquelette et les membranes des cellules sont soumises à des stress de différentes sources :

- pression osmotique ;
- déformation du cytosquelette qui provoque une certaine tension sur le réseau de membrane auquel il est lié ;
- mouvements des moteurs moléculaires qui peuvent tirer ou pousser une vésicule le long d'un filament par exemple.

1.4.1. La théorie de la tenségrité

La tenségrité est un modèle de structure qui utilise des tensions et des compressions pour soutenir d'autres structures. Le modèle de tenségrité cellulaire propose de considérer que toute la cellule a une structure de tenségrité pour s'opposer à des précontraintes. En principe, la construction de systèmes de tenségrité se caractérise avec deux éléments de base : des barres et des câbles. Les barres restent entre elles discontinues tandis que les câbles forment une configuration continue. Les barres travaillent exclusivement à la compression et les câbles à la traction. Les premières sont insérées dans les seconds pour obtenir un ensemble équilibré. Ainsi, compressions et tractions s'équilibrent dans un cycle vectoriel fermé tout en écartant et solidarissant chacun des éléments entre eux. Ces systèmes sont très légers par rapport à leurs performances mécaniques. Dans des conditions infinitésimales, ces systèmes montrent une grande souplesse et leur comportement s'apparente à celui de systèmes pneumatiques, ce qui leur permet d'absorber des chocs (Canadas *et al.*, 2006; Ingber, 2003; Ingber, 1993).

C'est l'architecte Fuller qui fit pour la première fois une description du modèle de tenségrité, en 1961. C'est Ingber, en 1993, qui proposa d'utiliser le modèle de la tenségrité pour représenter le cytosquelette (Ingber, 1993). L'unité élémentaire du cytosquelette (selon Ingber) a été proposée comme étant constituée de 6 éléments rigides représentant les microtubules reliés entre eux et de 24 câbles représentant les filaments d'actine. Il existe maintenant d'autres configurations proposées (Ingber, 2003).

Toutes les études démontrent que ces systèmes possèdent un comportement élastique et réversible, mais que la relation action/déformation est non-linéaire. Les variations de rigidité doivent être considérées en fonction de la contrainte initiale intrinsèque à la structure et aussi en fonction des actions ou déformations imposées à la structure (Ali el Smaili, 2003).

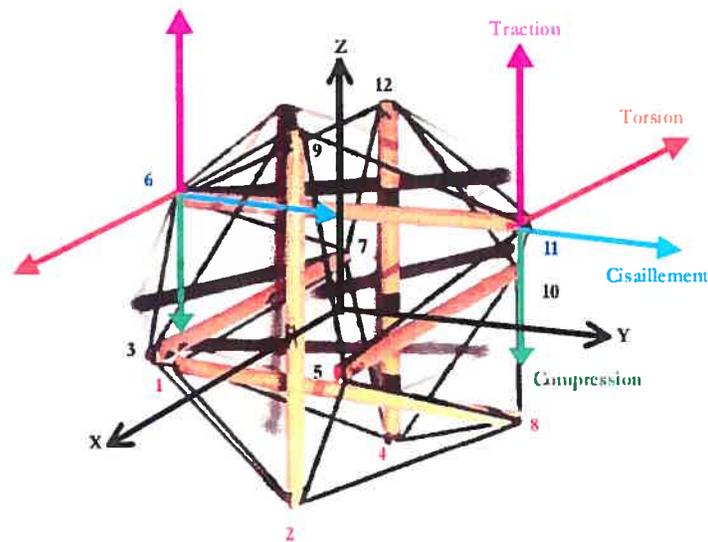


Figure 1.6. : Structure de tensegrité composée de 6 barres (couleur bois) et de 24 câbles (noirs). Les nœuds indiqués en bordeaux (1, 2, 4, 8) sont fixés par la base orthonormée directe (X,Y,Z) et les nœuds marqués en indigo (6 et 11) sont soumis à des efforts de traction, compression, cisaillement et torsion (Canadas Patrick, 2003).

Les câbles obéissent à une loi de comportement viscoélastique de type <<solide de Voigt>> (modèle composé d'un élément ressort associé à un module d'élasticité, monté en parallèle avec un élément amortisseur associé à un module de viscosité).

Les éléments barres sont considérés comme des éléments purement élastiques et quasi-rigides, supportant essentiellement des efforts de compression dus à la tension des câbles.

1.4.2. La spinogénèse

Les filipodes sont émis par le cytosquelette et sont de fines extensions riches en actine. L'émission de ces filipodes précède le mouvement ou la déformation d'une cellule. Elle permet également à une cellule de se spécialiser (prenons le cas des épines dendritiques chez les neurones). La spinogénèse est l'étude de la création de ces épines dendritiques. Cette étude a permis notamment de montrer que la dépendance de la tension de membrane vis à vis de la densité de membrane est cruciale pour obtenir de grandes déformations. De même, l'ajout de membrane est optimal s'il a lieu de part et d'autre de la poussée d'actine. Il a de plus été noté que lorsque la membrane s'accumule, un gradient de tension se forme, provoquant ainsi un déplacement de la membrane vers les zones de forte tension.

Le problème de cette approche est qu'elle est numérique et qu'elle permet de faire des prédictions au-delà des paramètres physiologiques, c'est-à-dire des résultats qui ne sont pas représentatifs de la réalité. Dans certains cas, on ne peut pas dire si cette technique répond à une question en rapport avec un phénomène biologique ou si elle donne des résultats qui ne sont pas physiologiques (Huc, 2004).

1.5. Hypothèses et objectifs

Les dernières études faites par notre groupe dans le domaine de la volumétrie cellulaire étaient basées sur des techniques moins fiables. L'un des premiers objectifs de cette étude fut de réaliser un montage expérimental permettant d'augmenter l'efficacité du travail de l'expérimentateur. Voici les limites du précédent montage :

1. Premièrement, il n'était pas possible de prendre des photos simultanées de la base et du profil lors du choc osmotique, il fallait prendre une photo de la base avant de procéder au choc et ensuite basculer la chambre pour procéder à l'expérience et prendre des photos du profil qui gonfle. Cela limite le champ d'étude possible, car il fallait faire des chocs supposant une variation infime de la base durant l'expérience. Hors les chocs extrêmes induisent des changements considérables sur la forme de la base de la cellule lors de l'expérimentation. Par conséquent, il était impossible d'étudier les réserves de membranes d'une cellule adhérente avec l'ancien montage ;

2. Deuxièmement, le précédent montage était aussi moins efficace au niveau de la recherche des cellules sur la lamelle : il fallait trouver une cellule sur la prise de vue de la base et ensuite prendre les coordonnées exactes de cette cellule grâce à un vernier de précision. Une fois la chambre basculée, il fallait utiliser ces coordonnées pour retrouver la cellule sur un nouveau plan dans lequel les cellules étaient vues de côté. Ce travail était exigeant et pouvait amener l'expérimentateur à faire des erreurs telle l'utilisation du mauvais profil à cause d'une erreur sur la cellule (utiliser une cellule différente lors du gonflement du profil).

3. Enfin, les manipulations numériques étaient prises en charge avec le logiciel EXCEL. Or, les calculs fait avec un nombre limité de profils associés à une seule base exigeaient un travail important de la part de l'expérimentateur. Ainsi, le nombre de reconstructions numériques envisageables pour une expérience donnée était limité.

L'autre objectif de cette étude est d'étudier les réserves de membrane lorsque la cellule est soumise à un choc extrême. On va soumettre les cellules à une solution physiologique dont on a réduit l'osmolarité à 2% (solution hypotonique à 98%) et étudier les courbes d'augmentation du volume et de la surface de la cellule dans le temps.

On va comparer la cinétique d'augmentation de volume de quatre lignées cellulaires différentes (soit les A549, les 16HBE14o-, les NIH - 3T3 et les CHO).

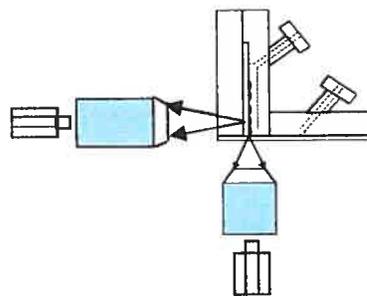
On va utiliser des conditions expérimentales visant à réduire l'influence de l'exocytose afin de déterminer l'origine de l'apport de membranes lors d'un choc osmotique.

Si l'on tient compte du modèle de la spinogénèse (Huc, 2004), le choc extrême devrait induire une augmentation de volume maximal et donc la membrane devrait être insérée massivement à la surface cellulaire. On prévoit, lorsque les réserves seront épuisées, des courbes d'augmentation du volume et de la surface de type exponentiel.

Sur la base des études faites sur le réservoir interne de membrane dépendant de la tension membranaire (Fisher *et al.*, 2004; Raucher & Sheetz, 1999; Dai & Sheetz, 1999) et les études sur les réserves déjà présentes à la surface membranaire sous forme

de villosité de membrane (Sens & Turner, 2006; Morris & Homann, 2001), alors on peut prévoir de grandes réserves de membranes permettant à la cellule de survivre longtemps dans des conditions extrêmes de tonicité.

2. MÉTHODOLOGIE



2. Méthodologie

2.1. Culture cellulaire

Des cellules épithéliales A549 carcinoma et ainsi que des fibroblastes de souris NIH-3T3 ont été cultivés dans du milieu (DMEM, catalogué #12100-046) dans lequel nous avons ajouté 10% de FBS, 20 mM de L-glutamine, 60 U/mL de pénicilline-G et 60 $\mu\text{g/mL}$ streptomycine (Pen-Strep). Des cellules épithéliales de bronches humaines (16HBE14o⁺) ont été cultivées avec le même milieu (Cozens *et al.*, 1994).

Des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) ont été cultivées dans du α -MEM (cat. # 12000-022) contenant de la L-glutamine et dans lequel nous avons ajouté 8% de FBS, 1% de Pen-Strep et 100 μM de Metrotraxite.

Les cellules 16HBE14o⁻ ont été cultivées dans du MEM dans lequel on a ajouté 10% de FBS, 1% de Pen-Strep, 1% de L-glutamine, et 2.2 g/l de NaHCO_3 .

Tous les constituants des différents milieux cellulaires viennent de INVITROGEN (Burlington, ON). La morphologie cellulaire a été étudiée avec des cellules plaquées à très basse confluence sur des lamelles de verre 22 x 22 mm.

Afin de bloquer l'exocytose, nous avons pré-incubé les A549 avec 1 mM de N-ethylmaleimide (NEM; SIGMA CATALOGUÉ # E3876) pendant 15 minutes à température ambiante. L'augmentation de volume et de surface membranaire associée au pool intracellulaire sera ainsi découplée de celui provenant des villosités membranaires (van der *et al.*, 2003). Une fois lavées, les cellules ont été utilisées dans le montage à 37°C.

La solution physiologique contient 140 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl_2 , 1 mM de CaCl_2 , 10 mM de glucose et 10 mM de HEPES. Le pH de la solution a été ajusté à 7.4 avec du NaOH.

La solution hypotonique à 50% a été préparée en baissant la concentration de NaCl de la solution physiologique. La solution hypotonique à 98% (l'osmolarité de la solution physiologique est baissée à 2%) contient 1 mM de MgCl_2 et 1 mM de CaCl_2 .

Les cellules sont passées tous les 3-4 jours, selon leur confluence dans le pétri, et les milieux cellulaires sont changés tous les deux jours pour garder un milieu frais, à pH physiologique. Entre temps, les cellules sont gardées dans un incubateur à 37°C, en présence de 5% de CO_2 .

2.2. Montage

Il faut obtenir une reconstruction 3D d'une cellule grâce aux images obtenues en microscopie optique conventionnelle afin de pouvoir par la suite connaître les variations de volume et de surface qu'occupe une cellule adhérente lors d'un choc hypotonique. Pour ce faire, nous avons utilisé une version améliorée du montage et de la méthode d'analyse qui constituait notre technique d'imagerie 3D étudiée dans nos derniers travaux (Boudreault & Grygorczyk, 2004a).

Le montage fixé sur le plateau d'un microscope inversé à contraste de phase (NIKON TE300, Nikon Canada Inc., Montreal., QC) comme le montre la figure suivante :

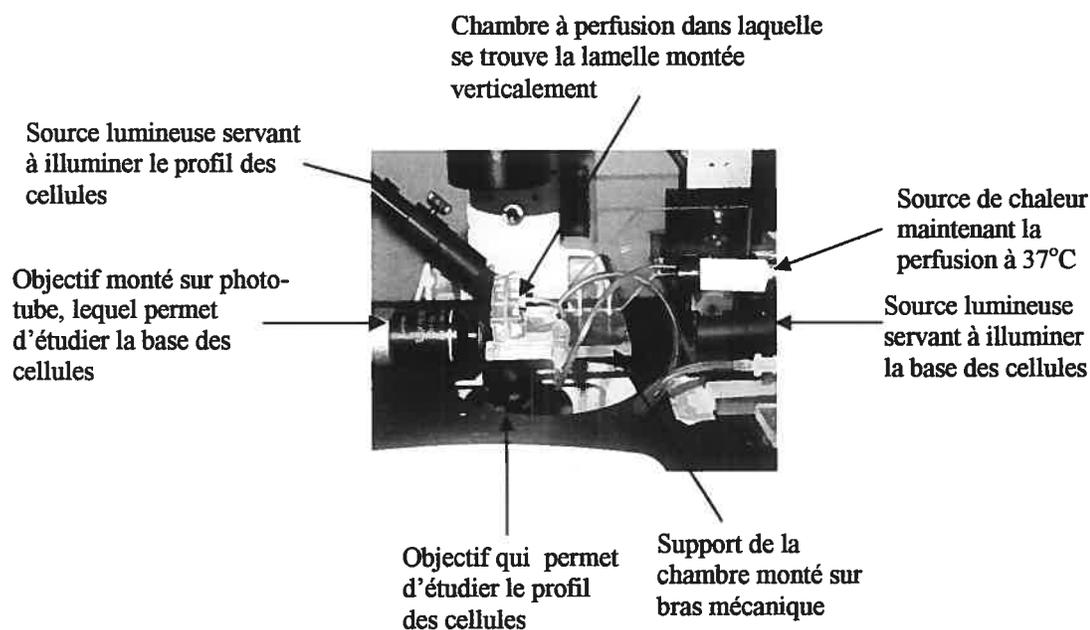


Figure 2.1. : Photo montrant les principales composantes du montage expérimental

La chambre à perfusion est illuminée par une lampe INTRALUX 4000 (VOLPI) à laquelle on a fixé une extension double qui permet de diviser le faisceau en deux (intensité lumineuse demeurant inchangée). Le premier bras est placé à 45° afin d'illuminer la vue de côté et le second illumine directement la base de la cellule (figure 2.1). Ce montage permet la prise simultanée de photos de la base et du profil d'une cellule adhérente à un substrat. En effet, les cellules sont plaquées à très basse confluence sur une lamelle 22 x 22 mm. Cette lamelle est par la suite insérée verticalement dans

une chambre à perfusion artisanale que l'on pose sur un support permanent soutenu par un bras articulé de haute précision (Newport). La chambre est perfusée en faisant circuler un fluide de tonicité arbitraire à l'aide d'une pompe péristaltique afin de provoquer un choc osmotique qui induira un gonflement de la cellule. La vitesse de perfusion est maintenue à 1.3 ml/min. Des caméras montées sur les objectifs (Moticam 350, Motic Instruments Inc. B.C., Canada) permettront de prendre des photos simultanées à intervalles réguliers (10 à 60 sec avant le choc et de 5 à 30 sec. pendant le choc). Les résolutions des caméras sont de 0.14- $\mu\text{m}/\text{pixel}$ et de 0.18- $\mu\text{m}/\text{pixel}$ pour la vue de côté et la base respectivement. Les images sont prises en charge par le logiciel Motic et sont traitées ultérieurement.

2.3. Expérience

Pour une expérience, on retire la lamelle de son milieu afin de le mettre dans la solution physiologique à 37°C. On trace une légère croix sur le bord de la lamelle avec une pointe de diamant, ainsi il sera plus facile de retrouver une cellule selon la vue de la base et la vue du profil si la croix sert de référence spatiale. La lamelle est montée dans la chambre à perfusion. Il est absolument primordial que la chambre soit totalement hermétique et qu'il n'y ait aucune fuite, afin de limiter l'entrée de bulles d'air, chose qui causerait la mort des cellules. Une fois la lamelle en place et la chambre montée sur son support, il faut calibrer les deux caméras en se servant de la croix que l'on a tracée, pour être sûr de voir la même chose avec les deux caméras. Cette étape explique pourquoi il faut une faible confluence des cellules et un tracé de la croix sur la lamelle : il est bien plus facile de retrouver une cellule sur deux points de vue différents si le nombre de cellules est faible et s'il existe un point de référence pour nous retrouver sur la lamelle. On peut trouver non loin de la croix une cellule de forme particulière pour faire un calibrage plus fin. Ensuite, il suffit de trouver la cellule qui suscite l'intérêt voulu pour l'expérience à l'aide du manipulateur mécanique et s'assurer que les deux caméras captent les mêmes images.

Une fois que la cellule est trouvée, il faut procéder au choc. Premièrement, il faut perfuser avec de la solution physiologique à 37°C pendant au moins 5 minutes afin de stabiliser les fonctions cellulaires et de s'assurer que la cellule se trouve en condition

physiologique. Ensuite, on perfuse avec la solution hypotonique, jusqu'à ce que la cellule lyse dans le cas d'un choc hypotonique à 98% ou jusqu'à ce que la phase RVD soit terminée dans le cas d'un choc hypotonique à 50%.

Une fois l'expérience terminée, on sort la lamelle et on lave la chambre à perfusion.

2.4. Analyse

Il faut créer un répertoire qui contiendra le graphe donnant la cinétique d'augmentation de volume cellulaire tant pour le volume que pour la surface d'augmentation de la cellule lors du choc hypotonique. Ce répertoire contiendra aussi les fichiers ASCII de toutes les valeurs numériques des reconstructions : l'augmentation de volume, de surface et de hauteur. C'est ce dossier qui permettra ultérieurement de manipuler les résultats pour en faire l'analyse numérique.

Le répertoire nommé <<*TopViews*>> est le répertoire dans lequel le logiciel Motic enregistre par défaut les différentes images de la base de la cellule prises lors d'un gonflement cellulaire.

Le répertoire nommé <<*SideViews*>> sera le répertoire dans lequel le logiciel Motic enregistre par défaut les différentes images du profil de la cellule prises lors d'un gonflement cellulaire. Pour les besoins de notre montage et surtout à cause des limitations du programme MOTIC, il nous a fallu avoir recours à un deuxième ordinateur pour enregistrer les images de cette vue, lesquelles ont été rajoutées par la suite au bon répertoire dans l'ordinateur avec lequel l'analyse se fait.

2.4.1. Utilisation de DISUR

L'analyse des images se fait grâce à un programme numérique codé en MatLab (The MathWorks Inc., MA, U.S.A.). Disur (dual image surface reconstruction) est une méthode de calcul approximative qui a déjà été utilisée par (Boudreault & Grygorczyk, 2004b). Une description de la méthode se retrouve dans cet article. Le programme que nous avons créé permet d'avoir une interface graphique dans laquelle on peut associer chaque base avec son profil respectif à un moment donné de l'expérience. Il suffit après coup de numériser la base ainsi que son profil respectif. Le programme se charge

d'associer base et profil afin de procéder à la reconstruction numérique de la cellule selon les normes imposées par la méthode de DISUR (voir annexe).

Premièrement, il faut actionner le fichier *DISUR.m* dans les fichiers MatLab. Une fois l'analyse commencée, on choisit la première base et profil associé que l'on numérise dans le temps. On commence toujours par numériser la base et ensuite on va numériser le profil. On demande ensuite au programme d'associer ces deux numérisations pour reconstruire la cellule. Le programme finit par donner le pourcentage d'augmentation de la hauteur, de la surface ainsi que du volume de la cellule par rapport aux valeurs mesurées. Il donne également tous les graphes de cinétique d'augmentation de volume de la hauteur, de la surface et du volume de la cellule lors du gonflement. Toutes les données numériques sont enregistrées automatiquement dans le dossier <<*results*>> préalablement créé.

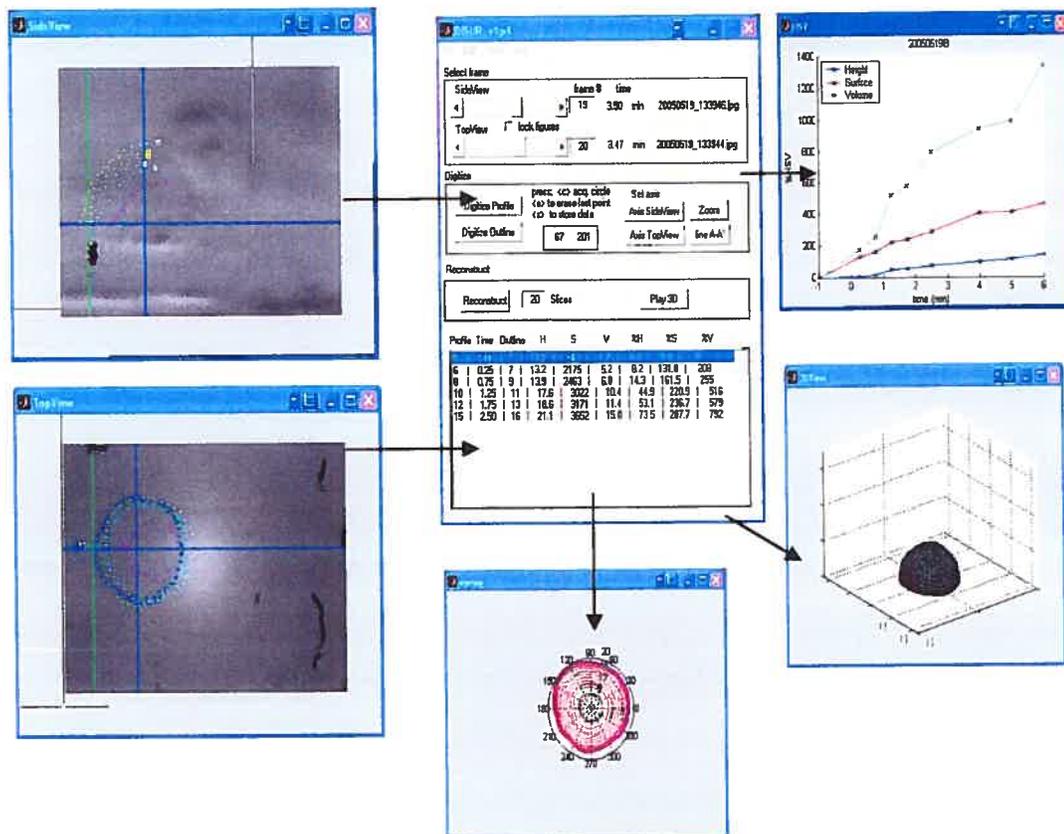


Figure 2.2. : Interfaces graphiques de l'analyse À gauche, on voit les photos de la base et du profil numérisés (sur ces photos apparaissent aussi les précédents profils et bases déjà numérisés). À droite, sont présentées les courbes de cinétiques d'augmentation de volume, la reconstruction volumique et la topologie de la base. Dans la fenêtre principale apparaissent les valeurs du pourcentage d'augmentation du volume, de la surface ainsi de la hauteur.

3. ARTICLE

Membrane reserves and hypotonic cell swelling

Nicolas Groulx, Francis Boudreault, Sergei N. Orlov, and Ryszard Grygorczyk

Soumis à The Journal of Membrane Biology, 2006

Membrane reserves and hypotonic cell swelling

Nicolas Groulx, Francis Boudreault, Sergei N. Orlov, and Ryszard Grygorczyk

Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) – Hôtel-Dieu,
and Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: Cell membrane reserves

Address for correspondence:

Ryszard Grygorczyk

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Hôtel-Dieu

3850 Saint-Urbain, Montréal, Québec, Canada, H2W 1T8

Tel: (514) 890-8000 ext.15089 Fax: (514) 412-7204



Keywords: cell volume, membrane unfolding, membrane stretch, 3D cell imaging

Abstract

To accommodate expanding volume (V) during hyposmotic swelling animal cells change their shape and increase surface area (SA) by drawing the extra membrane from surface and intracellular reserves. Relative contribution of these processes, sources and extent of membrane reserves are not well defined. In this study SA and V of single substrate-attached A549, 16HBE14o⁺, CHO and NIH 3T3 cells were evaluated by reconstructing cell 3D topology based on conventional light microscopy images that were acquired simultaneously at two perpendicular directions. We found that resting, flat cells show large SA/V ratio and have the capacity to increase volume up to 3.3 ± 0.7 -fold by changing shape without SA increase. To evaluate the size of SA reserves and their contribution to volume expansion, we examined the time-course of rapid SA and V changes during swelling in extreme 98% hypotonic (~ 6 mOsm) solution until membrane rupture. All cell types examined demonstrated existence of surprisingly large membrane reserves and were capable to increase their SA 3.6 ± 0.2 -fold and volume 10.7 ± 1.5 -fold. To investigate contribution intracellular SA reserves, A549 cell swelling was examined after blocking exocytosis by reducing temperature to 10°C or by treatment with N-ethylmaleimide (NEM, 1 mM, 15 min). Under these conditions capacity of A549 cells to increase SA and V in 98% hypotonicity was reduced to 1.7 ± 0.2 -fold and 4.4 ± 0.3 -fold respectively, indicating that surface reserves could add $\sim 70\%$ of initial SA. During moderate swelling in 50% hypotonicity, volume of A549 cell increased by $\sim 90\% \pm 5\%$ and SA by $\sim 29\% \pm 14\%$. Interestingly, blocking exocytosis had negligible effect on V and SA increase during moderate swelling. Our study demonstrated that animal cells accommodate moderate (< 2 -fold) volume increase mainly by shape changes and by drawing membrane from pre-existing surface reserves, while significant endomembrane insertion is observed only during extreme swelling. The large size of membrane reserves found in our study suggests that during most cellular processes the tension of animal cell membrane is unlikely to increase to near-lytic levels and to activate mechano-gated channels, unless it is locally constrained by specialized structures.

Introduction

Despite lack of a rigid wall animal cells are capable of controlling their shape, volume and surface area (SA) and respond to physical perturbations by triggering appropriate regulatory mechanisms. In particular, osmotic stress-induced volume changes, which disrupt the optimal concentration of intracellular enzymes and metabolites, activate a cell-specific set of membrane transporters leading to regulatory volume decrease (RVD) or increase (RVI) (McManus *et al.*, 1995; Strange, 2004). Because swelling may involve stretching of surface membrane and increase lateral membrane tension, activation of mechanosensitive channels is often suggested as a possible cell volume sensor and trigger of RVD, reviewed in (Mongin & Orlov, 2001). Membrane lipid bilayer can expand ~3% in area before rupture (Nichol & Hutter, 1996; Hamill & Martinac, 2001b) and thus, offers very limited room for SA and volume increase. But, irregular-shaped substrate adherent cells, could utilize several other processes to adopt expanding volume including, shape changes and increase of SA, by drawing the extra membrane from intracellular reserves or from excess plasma membrane, i.e. SA reserves pre-existing on the cell surface. This may engage smoothing out surface irregularities, membrane folds and protrusions. The size of membrane reserves reported in the literature vary considerably depending on cell type and measurement method; <1% was measured in fibroblast by pulling a membrane tether with optical tweezers (Raucher & Sheetz, 1999c), up to ~70% was detected in lymphocytes by measuring capacitance changes in the whole-cell patch clamp experiments (Ross *et al.*, 1994b), ~50% up to ~300% was found in neurons by morphometry (Zhang & Bourque, 2003; Wan *et al.*, 1995) and, >500% in *Xenopus* oocytes (Zhang & Hamill, 2000) estimated from EM images, reviewed in (Morris & Homann, 2001d; Hamill & Martinac, 2001a). The SA reserves allow animal cells to buffer rapid fluctuations in membrane tension and to maintain it well below the lytic level. It is speculated, however, that local tension could reach sub-lytic levels, sufficient to activate mechano-sensitive channels if membrane is locally constrained by a specialized, as yet hypothetical structures (Morris & Homann, 2001c; Hamill & Martinac, 2001f). Such localized changes of membrane tension could regulate cell SA via tension-dependent exo-/endocytosis (Morris & Homann, 2001b).

With a few exceptions, to our knowledge, it has not been systematically tested, to what extent different animal cells could increase their volume and SA before significant surface membrane tension develops and membrane rupture occurs. How much of SA could be drawn from intracellular reserves or by unfolding the surface membrane? Determining contribution of these different processes to SA increase during cell swelling will help to better understand how cells respond to physical stresses and whether increased membrane tension could play a role in SA and volume regulation. In this study we used recently developed in our laboratory imaging technique which allows reconstruction of cell 3D topography, based on the conventional light microscopy images acquired at two perpendicular directions (Boudreault & Grygorczyk, 2004k). From the reconstructed 3D cell model the area of optically resolved cell surface and cell volume could be calculated. Using this approach, we found that A549, 16HBE14o-, NIH 3T3 and CHO cells could increase their volume more than 10-fold and SA more than 3.5-fold by drawing excess membrane from reserves. Although intracellular membrane reserves are larger than surface reserves, they do not play a significant role during modest (<2-fold) cell swelling. Large membrane reserves in epithelial cells and fibroblasts suggest, that in most physiological situations the tension of unconstrained lipid bilayer is unlikely to rise significantly, e.g. to levels required for activation of mechano-gated channels. Unless, specialized structures are present, enabling local membrane bilayer stress to rise significantly above that of the rest of the cell surface membrane.

Materials and Methods

Cells

All constituents of the culture media were from Invitrogen (Burlington, ON). Human lung carcinoma A549 cells and murine NIH/3T3 fibroblasts were grown in DMEM media (cat.#12100-046) supplemented with 10% FBS, 20 mM L-glutamine, 60 U/mL penicillin-G and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (penn-strep). Human bronchial epithelial 16HBE14o⁻ cells, a generous gift from Dr. D. Gruenert, were cultured in MEM, 10% FBS, 1% Pen-Strep, 1% L-glutamine and 2.2 g/l NaHCO_3 , as described (Cozens *et al.*, 1994). Chinese hamster ovary (CHO) cells were cultured in α -MEM (cat.# 12000-022) containing L-glutamine and complemented with 8% FBS, 1% Pen-Strep and 100 μM Metrotraxite. Cellular morphology was analyzed from cells plated at low density on 22x22 mm glass coverslip. To block exocytosis A549 cells were pre-treated with 1 mM N-ethylmaleimide for 15 min at room temperature and, after wash cell swelling was examined at 37°C.

Evaluation of cell volume and surface

To evaluate surface area (SA) and volume (V) changes of substrate-attached cells, we used an upgraded version of 3D imaging technique described in our previous work (Boudreault & Grygorczyk, 2004j). The following is a brief description of the improved method.

Top and side-view images. The method involves 3D reconstruction of cell shape based on the conventional light microscopy cell images acquired at two perpendicular directions. Cells grown on glass substrate were mounted in a custom-designed side-view chamber placed on the stage of a NIKON TE300 inverted microscope (Nikon Canada Inc., Montreal, QC) and continuously perfused with pre-warmed saline (37°C, 1.3 mL/min), Figure 1. Vertical mounting of the coverslip permitted visualization of the lateral shape of the cell of interest close to the lower edge via a 20x phase contrast objective. In addition, a top-view image of the same cell were also recorded via a second microscope objective (10x) attached to a phototube and mounted on a mechanical micromanipulator (Newport) perpendicularly to the first objective, Figure 1. Side-view and top-view cell images were acquired simultaneously at 10 to 60 s interval prior to hypotonic challenge and, at 5 to 30 s interval during the challenge, to closely follow

rapid cell volume changes. Images of cell side-view profile and the top-view of cell base were recorded for 100 ms with two independent miniature CCD cameras (Moticam 350, Motic Instruments Inc. B.C., Canada) and Motic software at a $0.14\text{-}\mu\text{m}/\text{pixel}$ and $0.18\text{-}\mu\text{m}/\text{pixel}$ resolution for side-view and top view images respectively. Images were saved on hard disk and analyzed off-line.

Cell surface reconstruction and visualization. The 3D topography of the cell surface was reconstructed by a dual image surface reconstruction (DISUR) technique (Boudreault & Grygorczyk, 2004i). This technique generates a set of topographical curves of the cell surface from its digitized profile and base outline. Cell volume, surface and height were calculated from such a reconstructed cell topographical model. All calculations were carried out entirely with Mat Lab (The Math Works Inc., MA, U.S.A.). To visualize the reconstructed cell model in 3D perspective, data obtained with the help of the DISUR technique were used to generate a 2D matrix containing approximate z-coordinates of points on the membrane surface. The 3D perspective of the model cell was then plotted with Mat Lab or ORIGIN (Microcal Software, Northampton, MA).

Solutions and chemicals

Physiological saline solution contained (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 glucose and 10 HEPES, pH 7.4 adjusted with NaOH. 50% hypotonic media was prepared by reducing NaCl concentration while keeping divalent cation concentration constant. 98% hypotonic solution (~6 mOs) contained only 1 MgCl₂, 1 CaCl₂. All reagents, including N-ethylmaleimide (NEM, cat.# E3876), were from Sigma Aldrich. For experiments at low temperatures, a custom made in-line cooler was used. It consisted of a small container filled with ice-saturated water which allowed reducing solution temperature down to 10°C at the inlet of the experimental chamber.

RESULTS

Resting cell SA and volume

Example images of A549, 16HBE14o⁻, 3T3 and CHO cell side profiles observed under isotonic resting conditions and the perspective view of their reconstructed 3D models are shown in Figure 2A. The epithelial A549 and 16HBE14o⁻ cells tended to be more flat compared to CHO and 3T3 fibroblasts, which tend to be more rounded especially when in a group of cells. Figure 2B summarizes the average initial surface area (SA_0 , in μm^2) and initial cell volume (V_0 , in pL, $1\text{pL}=1,000\ \mu\text{m}^3$) for the four cell types studied. All cell types had comparable SA_0 and V_0 , but these parameters varied significantly between individual cells; the SA_0 values were in the range of $1,000\ \mu\text{m}^2$ to $3,500\ \mu\text{m}^2$, while V_0 were in the range of 2 pL to 7 pL. The SA_0 to V_0 ratios were significantly higher compared to that of spherical cells of similar volume, indicating that resting cells have significant room for volume increases by changing their shape without SA augmentation.

Cells have large membrane reserves

The two principle strategies to accommodate cell volume expansion are to change cell shape and/or to increase SA, utilizing membrane from the reserves. To evaluate the size of membrane reserves, cells were swollen in extreme 98% hypotonic solution and their SA and V were monitored in a dual-view chamber until cell membrane rupture. In the top of Figure 3A examples of A549 cell side-view images recorded during such swelling experiment are shown. The time-course of SA and volume changes for 6 individual cells and an average from $n=10$ experiments, are shown on the graphs below. After the onset of 98% hypotonic shock (at $t=0$), cells swell rapidly at the rate of $>100\%$ volume increase per minute. During this initial swelling phase cells were undergoing significant shape changes rounding up and, at ~ 7.5 -fold volume increase ($t \approx 3.5$ min), started to partially detach from the substrate, as seen by significant changes of an outline of a cell base in a top view cell images. After reaching a near-spherical shape, i.e. of the highest volume/surface ratio, cells continue to swell until membrane ruptured, typically between ~ 7 min to ~ 15 min. The membrane rupture was determined based on several criteria: (i) a subtle but sudden drop of cell volume, occasionally associated with a partial release of

intracellular content, (ii) sudden change in nucleus image contrast and, (iii) Trypan Blue uptake could be observed only after events (i) and (ii), consistent with membrane rupture at this point. The maximal A549 cell SA increase at the time of cell burst was 3.8 ± 1 -fold ($n=10$) and volume 12.9 ± 1.7 -fold ($n=10$). Similar results were obtained with the three other cell types examined in this study: 16HBE140⁻, CHO and NIH 3T3 fibroblasts, Figure 3B, C and D, respectively. Figure 4 summarizes the results of these experiments for the four cell lines and shows the average values (\pm S.D.) of the maximal cell SA and volume increase at the time of cell burst, Figure 4A and B respectively. Total cell SA reserves were very large, the average for all cell types was 3.6 ± 0.2 -fold of the initial SA₀ ($n=38$). All cell types also showed similar maximal volume increase of 10.7 ± 3.2 -fold ($n=38$). Figure 4C shows that A549 and 16HBE140⁻ cells could sustain such shock typically for approximately 10 min, while the two fibroid cell lines, NIH 3T3 and CHO, showed approximately 2-fold shorter time of burst. Because the final volumes of all cells at the burst were similar, this is consistent with higher average swelling rate of fibroblast compared to epithelial A549 and 16HBE140⁻ cells. As could be noticed from the time-course of volume changes shown in Figure 3, the initial swelling rates of all cell lines were comparable, between 1.5-fold/min to 2.3-fold/min, Table 1. However, they significantly declined during the course of swelling for epithelial cells, while fibroblast showed more linear swelling time-course and higher final swelling rates, Table 1.

Contribution of exocytosis to total cell SA reserves during 98% hypotonic cell swelling

During volume expansion cells could draw extra membrane from surface structures, such as membrane folds and protrusions, and from intracellular pool by exocytosis. To evaluate the relative contribution of intracellular and surface pool of membrane reserves, A549 cells were swollen in 98% hypotonic solution after blocking exocytosis. Two approaches were used to block exocytosis, low temperature and treatment with NEM. Figure 5A shows that at 10°C A549 cell swell at a significantly slower rate of 6% to 10% per min, compared to $\sim 100\%$ /min at 37°C. Cells ruptured after 50 to 60 min. At the time of burst the maximal increase of cell SA and volume were 1.9 ± 0.4 -fold and 4.6 ± 0.4 -fold respectively, Figure 5C. These values are significantly reduced compared to

those observed at 37°C. When exocytosis was blocked by NEM treatment and cells were swollen at 37°C, 8 out of 10 cells examined showed only limited swelling, however, several membrane blebs developed. These blebs often, during the experiment, fused into a single large bleb, which increased in size until rupture. Assuming that NEM treatment completely blocked exocytosis, the bleb formation is only possible from the pre-existing surface membrane. The size of the membrane bleb at the time of its rupture would then indicate the amount of membrane available on the cell surface. We found that the maximal SA increase of the cell plus the bleb was 1.6 ± 0.3 -fold, while the corresponding volume increase was 4.2 ± 1.5 -fold at the time of burst, Figure 5B and C. This was very similar to the SA and cell volume enlargement observed at 10°C. The 2 out of 10 cells which did not develop a visible blebs during swelling, showed smaller <3-fold volume increase when ruptured, likely because large bleb formation was restricted by the rigid cell carcass, therefore these two experiments were excluded from further analysis. The above experiments showed that during extreme 98% hypotonic swelling significant, approximately 2/3 of total cell SA increase, is due to membrane recruitment from intracellular pool via exocytosis, while the remaining SA augmentation could be attributed to unfolding of excess surface membrane.

Contribution of exocytosis to cell SA reserves during 50% hypotonic swelling

We then asked what is the relative contribution of the two processes, i.e. exocytosis and membrane unfolding to SA and volume increase during moderate cell swelling in 50% hypotonicity. Figure 6A shows the time course of A549 cell SA and volume increases under control conditions at 37°C. Cells reached a peak volume at approximately 2 min, followed by RVD, which was completed within the next 15 to 20 min. The maximal volume expansion was $\sim 82\% \pm 12\%$, while SA increased by $\sim 29\% \pm 14\%$, similar to that observed in our previous studies (Boudreault & Grygorczyk, 2004h; Boudreault & Grygorczyk, 2004c). When exocytosis was blocked by reducing the temperature to 10°C cells swell at a reduced rate reaching a peak volume of 76% at 4 to 6 min. RVD was also abolished at this temperature, Figure 6B. When cells were pretreated with NEM and swelling was examined at 37°C, Figure 6C, rate of swelling and the average peak volume (1.7-fold) were not significantly affected. The cell SA increase was also

comparable to untreated cells, Figure 7. Interestingly, NEM treatment completely impaired the RVD; after a peak at 2 to 3 min, cell volume dropped only slightly from 160% at the peak to 150% and remained unchanged during the remaining 15 min of the experiment. The SA and volume changes induced by 50% hypotonic shock under different experimental conditions are summarized in Figure 7. These experiments demonstrate that during moderate \approx 2-fold swelling cells increase their SA by approximately \sim 30% mainly by unfolding the surface membrane, while contribution of intracellular membrane pool is negligible under these conditions.

Role of substrate attachment in cell swelling

The initial rate and the time-course of swelling varied significantly between individual cell and this may be in part due to differences in the initial cell shape, SA and substrate attachment. Substrate attachment may influence the rate of swelling in several ways, e.g. by restricting water fluxes across the cell base and, hypothetically, providing a greater mechanical support for cell membrane to resist volume expansion. To determine if substrate attachment influences the initial rate and time-course of hypotonic swelling, A549 cells were mounted in a dual-view perfusion chamber and briefly exposed to trypsin (0.05%, 3- to 5-min, 37°C) in a Ca^{2+} -free solution. When cells rounded up and almost completely detached from the substrate, except for a small adherence area that kept them still in place, Figure 8A, trypsin was washed away. We found that during trypsinization cell volume remained constant, but interestingly, cell SA was reduced by $25\% \pm 12\%$ ($n=6$), Figure 7B, C. The same reduction was observed for the portion of the cell SA that is directly facing the extracellular medium ($26\% \pm 10\%$). This confirms that resting, substrate attached cells have a substantial excess of SA, and thus have a potential to significantly increase volume by simple shape changes. The subsequent exposure to 98% hypotonic solution resulted in a rapid swelling with the initial rate of swelling slower compared to substrate-attached cells (0.98-fold/min versus 2.3-fold/min), but it declined less during the course of swelling, Table 1. Furthermore, the time-course of swelling showed less variability between individual cells. Cell membrane ruptured at 9.2 ± 2.4 -fold initial volume i.e. similar to that observed with non-trypsinized

cells. The average time of burst had a tendency to shorten, from 10.4 ± 4.7 to 8.5 ± 2.6 min ($n=7$), but this difference was statistically not significant.

Discussion

In this study we measured SA and volume of substrate-attached cells using dual image 3D cell reconstruction technique developed in our laboratory. We have determined the upper limits of SA and volume increase by swelling cells in extreme ~ 6 mOsm hypotonic solution and found that all four cell types tested A549, 16HBE14o $\bar{}$, NIH 3T3 and CHO, have surprisingly large capacity to increase their SA, more than ~ 3.5 fold and volume more than ~ 10 -fold. Large part of SA increase in A549 cells is due to exocytotic insertion of endomembranes. Interestingly, this mechanism has negligible contribution to SA increase during modest ≤ 2 -fold cell swelling.

Sources of cell SA and their contribution to volume expansion.

To accommodate volume expansion cells utilize two principal strategies: shape changes and increase of SA. The increase of SA could involve: (i) drawing the extra membrane from cell surface reserves by unfolding and smoothing out excess surface membrane, (ii) exocytotic insertion of endomembranes and, (iii) stretching lipid bilayer, see cartoon in Figure 9. Based on our experimental data with A549 epithelial cells we could estimate relative contribution of these processes to SA and volume changes during extreme (98% hypotonic) and moderate (50% hypotonic) swelling. During extreme swelling, assuming that at the time of plasma membrane rupture, the lipid bilayer of maximally swollen (≥ 10 -fold) cells is stretched to its limit ($\sim 3\%$ area expansion), this would correspond roughly to 11% extra SA relative to the initial SA_0 of a resting cell. Contribution of surface and intracellular reserves could be estimated from experiments in which exocytosis was blocked by low temperature (10°C) or NEM-treatment. These two approaches produced very similar results, at 10°C the maximal SA increase was reduced from 3.8 ± 1.0 -fold ($\Delta SA \approx 280\%$) to 1.9 ± 0.4 -fold ($\Delta SA \approx 90\%$) and, in experiments at 37°C after NEM treatment, it was reduced to 1.6 ± 0.3 -fold ($\Delta SA \approx 60\%$), Figure 5C. Thus, on average after blocking exocytosis, A549 cells were still capable to increase their SA during extreme hypotonic swelling approximately by 75%, likely by utilizing membrane reserves pre-existing on the cell surface. From these experiments we could also conclude, that exocytosis of endomembranes contributes approximately 200% to SA increase. Estimates of relative contribution of different SA sources are summarized

in Figure 9A, while Figure 9B shows estimated contribution of these processes to volume increase. Contribution of shape changes were evaluated based on initial SA_0 of a resting cells, shown in Figure 2, by calculating volume of a spherical cell of the same SA. All other calculations were made for such a spherical cell by taking into account SA increase due to endomembrane exocytosis, use of surface reserves and lipid bilayer stretch. Thus, the largest ~200% contribution to SA increase, is due to endomembrane exocytosis and, corresponds to >600% volume increase. These are the upper limits that these processes could contribute and were determined by swelling cells under extreme 98% hypotonic conditions. In contrast, during moderate, e.g. ~2-fold swelling in 50% hypotonicity, we found that majority of A549 cell SA increase could be attributed to unfolding the existing surface membrane, while exocytosis of endomembranes had negligible contribution that was below detection limit in our experiments ($\leq 5\%$), Figure 7. This is consistent with similar observation with e.g. astrocytes and hepatocytes, which during moderate swelling also did not recruit additional membrane, and no changes in electrical membrane capacitance were detected (Graf *et al.*, 1995; Olson & Li, 1997). Lymphocyte could also swell at fixed capacitance up to 2-fold, beyond that swelling recruits new membrane (Ross *et al.*, 1994a). Thus, cells use different pools of SA reserves, depending on the extent of cell volume changes. Moderate volume expansions are accommodated by shape changes and use of surface reserves, while endomembrane recruitment seems to predominate during extreme >2-fold swelling.

Large intracellular and surface membrane reserves found in our study contrasts with a number of earlier reports. While it was recognized that some cell types, such as oocytes, macrophages or mast cells have large excess surface membrane, this was not anticipated for other cells, such as fibroblasts or epithelial cells, that respond to frequent changes of passive stretch or osmotic swelling (Hamill & Martinac, 2001c). Previous studies indicated much smaller SA reserves, e.g. fibroblasts were reported to have small bilayer reservoir of 0.3-1% of total surface area as measured by pulling bilayer tether (Raucher & Sheetz, 1999b). The difference could be attributed to the fact that tether measurements rely on the assumption that membrane tension is continuous over the entire plasma membrane, which may not be fully satisfied, especially for adherent cells, where local perturbation (pulling the tether) could be spatially restricted (Morris &

Homann, 2001a). By contrast, in our experiments we used osmotic pressure which was acting on the entire plasma membrane. It should be noted, that our SA reserve estimates are only qualitative, based on several assumptions and subject to several limitations. For example, contribution of surface reserves might be underestimated because maneuvers that we used to block exocytosis, low temperature and NEM may also, at least partially, impair cell's ability to draw membrane from surface reserves. This would also result in overestimation of endomembrane contribution. Furthermore, we measured cell SA as resolved by light microscopy, thus submicroscopic membrane structures, such as microvilli, membrane folds and other irregularities, could not be detected and we consider them as a reservoir of cell SA. Therefore, our SA estimates may differ from SA measured in the whole-cell patch-clamp experiments as cell membrane electrical capacitance. Finally, we observed large variability of SA and volume between individual cells, which were chosen randomly for the experiments. Such variability is expected, as SA and volume vary during many cellular processes, including cell cycle. For example, during mitosis cells need to double their SA therefore, cells with clearly visible two nuclei were rejected from our analysis.

Role of substrate attachment in cell swelling

Our experiments showed that after trypsinization of A549 cells, the total SA and its fraction that is directly facing the extracellular medium were significantly reduced. This could explain the observed reduction of the initial swelling rate of such cells by reducing osmotic water flux. Additional factor(s), not investigated in the present study, could involve changes in membrane mechanical resistance to volume expansion which, in the context of tensegrity model, may be influenced by membrane-cytoskeleton interactions and substrate attachment (Ingber, 2003). In substrate-attached cells, SA varies during swelling, especially in 98% hypotonic solution, when cells undergo significant shape changes and partially detach from the substrate. Therefore, differences in the initial cell shape and extent of substrate attachment may contribute to large variability of the swelling time-course observed between individual cells. Consistent with this view, trypsinized A549 cells showed more uniform swelling time-course similar to fibroblasts, which are less firmly attached to the substrate.

Large SA reserves suggest a unifying mechanism to protect membrane integrity

To prevent membrane rupture during diverse cellular processes cells need to keep plasma membrane tension below the lytic level. The two mechanisms often considered in this context are: (i) insertion of endomembranes, e.g. via tension-dependent exocytosis (Raucher & Sheetz, 1999a; Morris & Homann, 2001i); and (ii) compensatory volume adjustment (Morris & Homann, 2001h).

(i) *Tension-dependent SA regulation.* Animal cells are believed to rely on vesicle recruitment to accommodate stretch and cell volume changes (Hamill & Martinac, 2001d), and tension-sensitive membrane traffic was proposed as a principal mechanism for SA regulation in animal cells (Morris & Homann, 2001g). For example, neurons continuously shuttle membrane between endomembrane system and plasma membrane to adjust SA and volume (Morris & Homann, 2001j). Similar mechanism operates in guard cells, which reversibly internalize membrane to maintain cell integrity (Shope *et al.*, 2003). Our study demonstrates existence of large SA reserves that are already present on the cell surface and we provide evidence that these reserves are the main source of SA increase during moderate (≤ 2 -fold) volume expansion. Endomembrane insertion, however, dominates SA regulation during extreme stresses and this process may have a tension-dependent component. Use of cell surface reserves by reversible unfolding of excess plasma membrane likely also requires some lower-level membrane tension and could be considered as another component of tension-dependent SA regulation.

(ii) *RVD is too slow to counteract acute volume changes.* Another mechanism often suggested for keeping plasma membrane tension sublytic is to pump and leak osmolytes (Morris & Homann, 2001e). Our study of the kinetics of cell swelling contradicts this view, we found that in response to acute 50% hypotonic shock cells swell passively to the limits dictated by the imposed osmotic gradient, that is about 2-fold volume increase, typically within 1.5-3 min, (Boudreault & Grygorczyk, 2004g; Boudreault & Grygorczyk, 2004b) and Figure 6A. The RVD is a much slower process that is initiated only after cell is already maximally-swollen and, often after a short delay, resulting in volume plateau, at 3-5 min. In A549 cells the RVD is fully completed in about 15 min,

but it requires more than 30 min in 3T3 fibroblasts (Boudreault & Grygorczyk, 2004a). Thus, RVD process is too slow to counteract acute volume increase and cells need a different mechanism to avoid membrane rupture. Our study suggests, that such mechanism involves, in addition to extensive shape changes, use of large excess of plasma membrane. The subsequent compensatory transport of osmolytes during RVD is an independent and much slower process whose primary goal is to restore optimal intracellular concentrations of enzymes and metabolites. In this context, resetting cell's volume back to its initial level might be simply a consequence of regulatory adjustment of intracellular environment rather than goal in itself. Interestingly, our data also show that after initial swelling in 50% hypotonic solution, both cell volume and SA return close to their initial levels, but their regulatory processes i.e. the RVD and regulatory surface decrease (RSD) are not directly connected. This is exemplified by the fact that in A549 cells volume returns close to its initial level in 10 to 15 min, while SA remains elevated significantly even after 20 min, Figure 6A. Similar observation we made in our previous study (Boudreault & Grygorczyk, 2004d; Boudreault & Grygorczyk, 2004f). Thus, our data support the view that RVD and RSD are two independent cellular processes, as previously proposed by Morris & Homann (Morris & Homann, 2001f).

The unexpected finding of our study that all four cell types examined have huge membrane reserves ($\Delta SA \approx 280\%$), which includes large excess membrane that is present on the cell surface (60% to 90% in A549 cells), sheds a new light on how cells could maintain membrane integrity during rapid volume expansion. We propose that such large SA reserves may provide a unifying explanation for the ability of animal cells to sustain sudden mechanical perturbations and to accommodate extensive morphological changes. Large SA reserves may also account for the difficulty to activate mechanosensitive channels in animal cells by buffering membrane tension changes. Therefore, in many physiological situations membrane tension is unlikely to reach levels required to activate such channels, except special circumstances, such as localized pre-stressed bilayer regions that may act as a hypothetical mechanosensor (Hamill & Martinac, 2001e), or at the cell base of substrate-attached cells (Cemerikic & Sackin, 1993). However, in the latter *in vitro* study, membrane attachment to a rigid glass

substrate may be an essential factor responsible for swelling-induced deformation of the cytoskeleton or change in membrane tension leading to activation of whole-cell currents. Whether this could be reproduced on a flexible substrate, more resembling *in vivo* situation needs future experimental verification.

In summary, the presence of large SA reserves in all 4 cell types examined in this study suggest that this is not an exception but might be a common feature of many, if not all animal cells. In particular, the sizable fraction of the reserves that is present on the cell surface as excess plasma membrane, may provide a simple mechanism to maintain membrane tension below lytic level during various cellular processes or mechanical perturbations, such as acute swelling. Large SA reserves may also explain difficulty in attaining sufficient membrane tension to activate mechanosensitive channels in animal cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Canadian Cystic Fibrosis Foundation. We thank Dr. Jean-Yves Lapointe for discussions and help during development of our imaging technique.

Figure legends

Figure 1. Flow chamber and dual-image microscopy setup.

(A), Functional diagram of a flow chamber, adopted from (Boudreault & Grygorczyk, 2004e). The acrylic chamber permits simultaneous microscopy observation of cell side-view profile and top-view. A standard 22x22 mm coverslip with adherent cells is positioned vertically along the inner chamber wall. In this orientation, the lower edge is facing the vertically-oriented microscope phase contrast objective (objective #1, Nikon Ph 1 DL, 20x). The second objective (objective #2, Nikon Ph DL, 10x) is attached to the phototube and mounted horizontally on the mechanical micromanipulator (Newport). When both objectives are aligned in one plane, the same cell could be viewed from two perpendicular directions. The nominal depth of the chamber is approximately 0.5 mm, and the total inner volume $\sim 200 \mu\text{L}$. Images of a substrate-adherent cell profile and top-view are recorded simultaneously with the two independent digital Moticam 350 cameras. The chamber cavity is perfused with a warm solution (37°C). The orientation of the Cartesian coordinate system shown here is used in the off-line image analysis.

(B) A photograph of the chamber mounted on the stage of an inverted Nikon TE300 microscope. The two perpendicularly oriented objectives are also visible: *C*- chamber, *H* - inline solution heater, *L* – fiber optic light source

Figure 2. SA and volume of resting cells.

(A) Examples of light microscopy side-view images of resting, substrate-attached A549, CHO, NIH-3T3 and 16HBE14o⁻ cells. Corresponding perspective view of 3D cell models reconstructed by the DISUR technique (as described in the Methods) are shown in (B). (C) The average (\pm S.D.) SA (SA_0 , in μm^2) and volume (V_0 , in pL, $1 \text{ pL} = 1,000 \mu\text{m}^3$) of resting cells for the 4 different cell types measured under isotonic solution. The data are from $n=38$ measurements.

Figure 3. Time-course of cell volume and surface changes during swelling in 98% hypotonic solution.

A. A sequence of side-profile images showing changes of A549 cell shape and size during swelling in 98% hypotonic solution. The graphs below show the time-course of SA (left) and V (right) changes. A small symbols and thin lines show representative data from individual single-cell experiments. For clarity, only 6 individual experiments are shown. A thick symbols represents the average data from $n=10$ experiments and, the solid line represents an exponential fit to the average data. B, C and D show similar data for human bronchial epithelial cells 16HBE14o⁻, mouse NIH 3T3 fibroblasts and Chinese hamster ovary CHO cells, respectively. 4 to 5 representative traces from individual single-cell experiments are shown for each cell type. Cells were perfused with a warm (37°C) isotonic solution (~ 300 mosmol), and at time 0, the perfusate was changed to 98% hypotonic (~ 6 mosmol). Side-view and top-view cell images were recorded until cell burst, which is the last point for each thin-line trace. Cell SA and volume were calculated off-line by the DISUR approach, see Methods.

Figure 4. SA and volume of maximally-swollen cells at the time of burst in 98% hypotonicity.

Maximal cell SA (SA_{max}), (A), and volume (V_{max}), (B), recorded at the time of cell burst in 98% hypotonic solution. The average values \pm S.D. are shown, n = number of cells tested. C, average time (\pm S.D.) between the onset of 98% hypotonic shock and cell burst. Note shorter burst time for the two fibroblast NIH 3T3 and CHO cell lines.

Figure 5. Time-course of A549 cell swelling in 98% hypotonicity after blocking exocytosis.

(A) Time-course of cell SA and cell volume increase during swelling in 98% hypotonicity at 10°C.

(B) With NEM-treated cells swelling resulted in membrane blebs formation, which made it difficult to evaluate total cell SA and volume. Total SA and volume of cell plus bleb were calculated in such situations, but such evaluations were possible only with cells having a single bleb, or when several smaller blebs fused together into a large

single bleb later during the experiment. Therefore, for some experiments no data points are shown, for the period when several membrane blebs were present. Small symbols and thin lines show representative data from individual single-cell experiments. For clarity, only 4 to 5 individual experiments are shown. A thick symbol represents the average data (\pm S.D.) from $n=8$ to 10 experiments and, the solid line represents an exponential fit to the average data.

(C) Average maximal SA (A) and volume (B) increase in 98% hypotonic solution. Blocking exocytosis by low temperature (10 °C) or NEM treatment significantly reduced maximal SA and volume increase.

Figure 6. Time-course of A549 swelling in 50% hypotonicity.

A. Time-course of A549 cell SA and volume increase during swelling in 50% hypotonicity at 37°C.

B. Swelling of A549 cells at 10°C. Note significantly slower kinetics of cell swelling and lack of RVD, although maximal volume and SA were similar to those observed at 37°C.

C. NEM-treated A549 cell swelling at 37°C is similar to that of control untreated cells, but RVD is absent.

Small symbols and thin lines show representative data from individual single-cell experiments. For clarity, only 4 to 5 individual experiments are shown. A thick symbol represents the average data (\pm S.D.) from $n=8$ to 10 experiments and, the solid line represents an exponential fit to the average data.

Figure 7. Effect of blocking exocytosis on maximal A549 cell SA and volume during 50% hypotonic swelling.

Average maximal SA and volume increase in 50% hypotonic solution. Blocking exocytosis by low temperature (10 °C) or NEM treatment had no effect on SA nor volume changes. This contrasts with the data for 98% hypotonic swelling shown in Figure 5C.

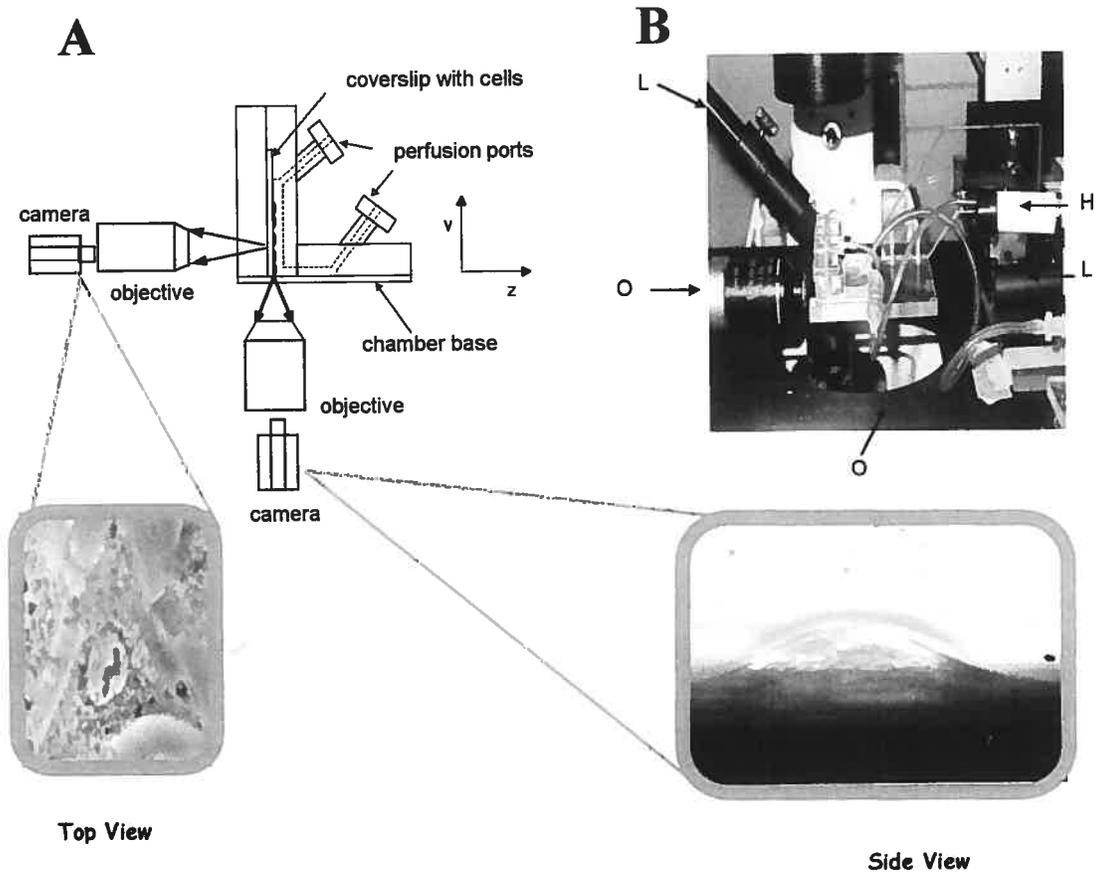
Figure 8. Substrate attachment influences cell SA and kinetics of hypotonic swelling.

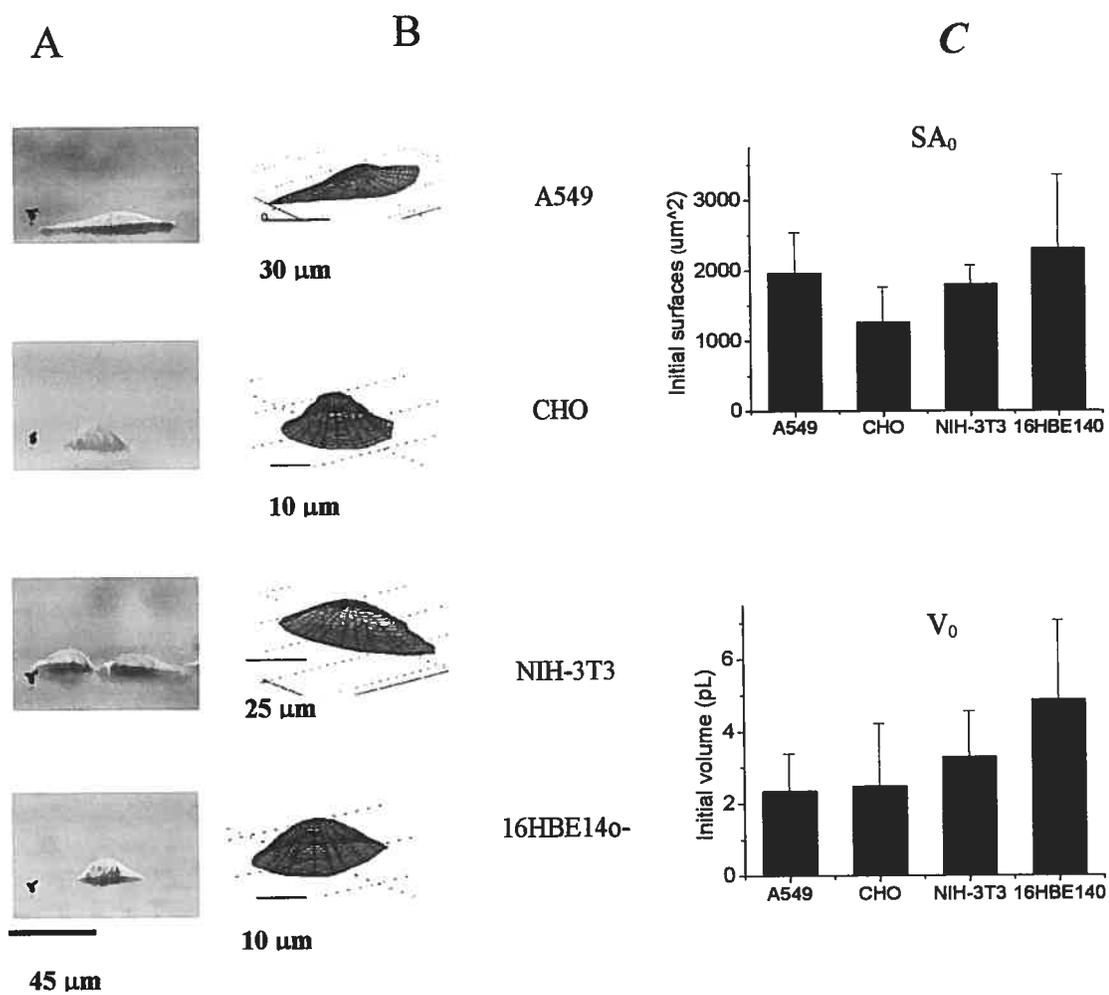
Time-course of cell SA (A) and volume (B) changes during trypsinization and subsequent swelling in 98% hypotonicity. Note a significant drop of SA and invariable volume of trypsinized cells at $t=4$ min.

In the column on the right is shown a sequence of A549 cell side-profile images, which illustrate cell shape changes during trypsinization in isotonic solution at 37°C, frames at $t=0$ to $t=4$ -min. This was followed by hypotonic swelling starting at ~ 4 min, frames 6.25-min and 15.8-min.

Figure 9. Relative contribution of cell shape changes and SA reserves to hypotonic volume expansion of A549 cells.

The cartoon shows four different processes that may contribute to volume accommodation during hypotonic swelling. The pie graphs show relative contribution of these processes to SA (A) and volume (B) increase during extreme swelling of A549 cells.

**Figure 1**



A

t = 0 min

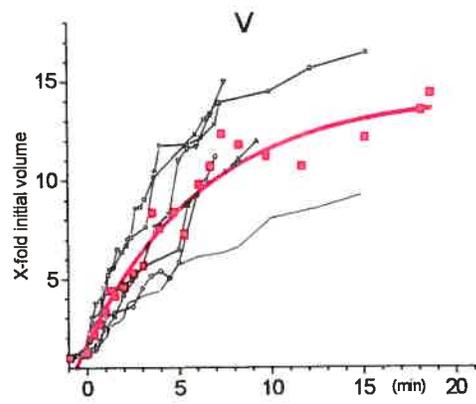
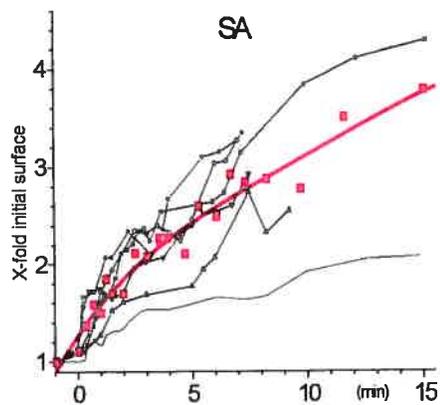
t = 1.23 min

t = 4.48 min

t = 16.73 min

45 μm

A549



B

16HBE

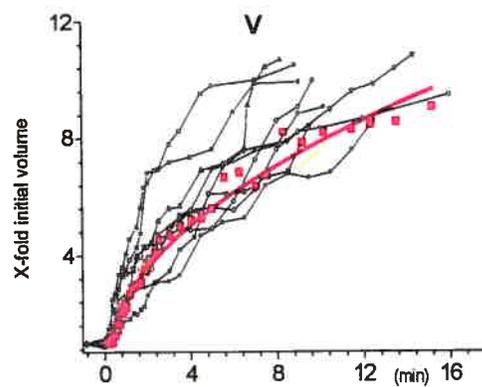
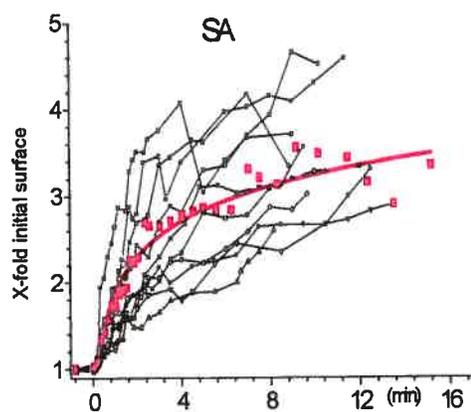


Figure 3

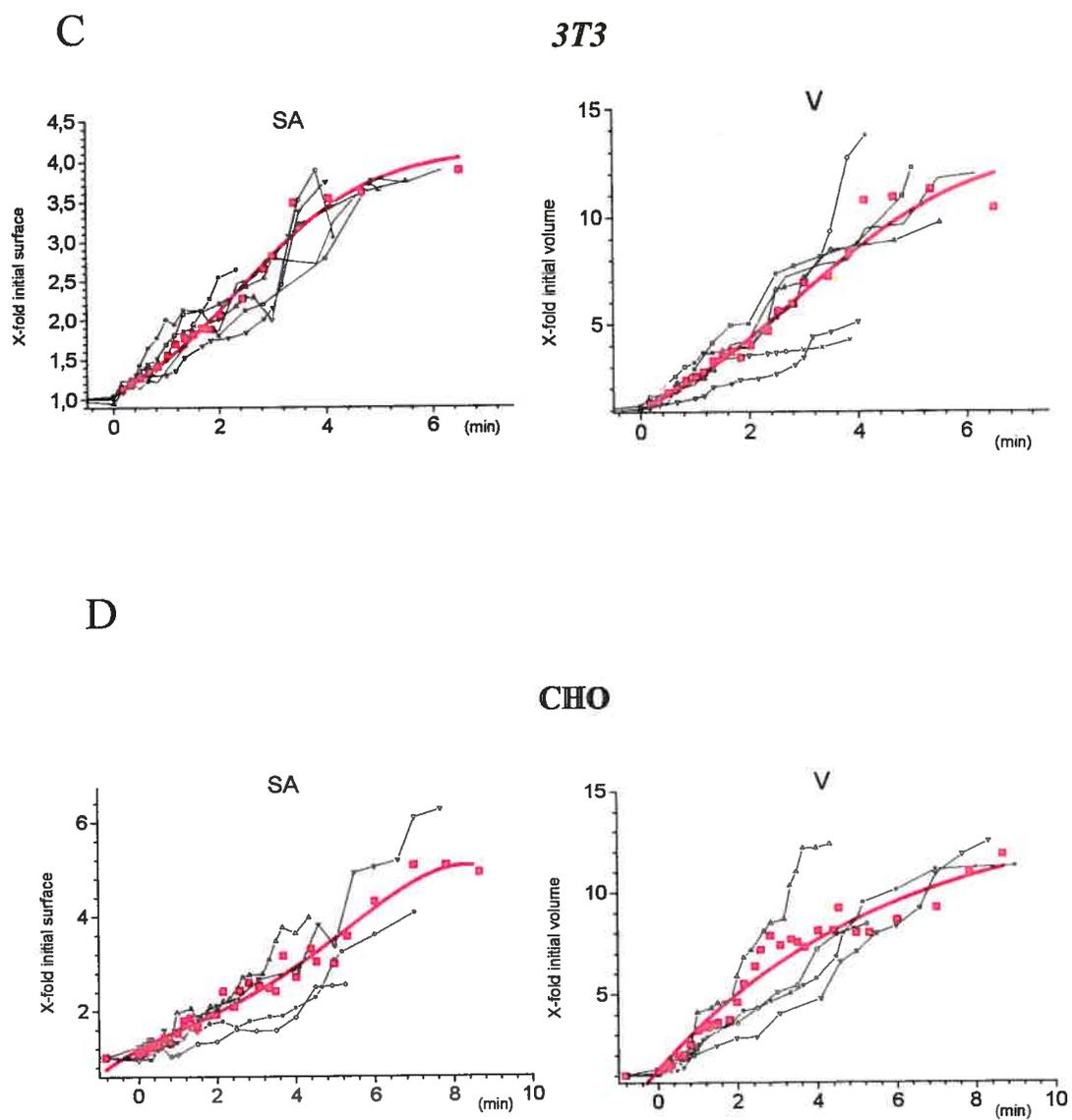
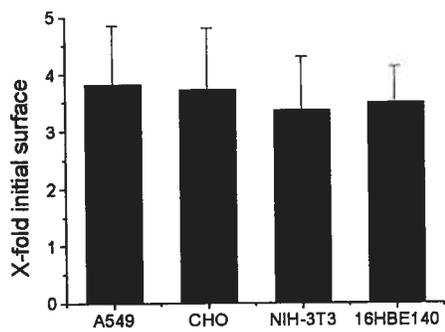
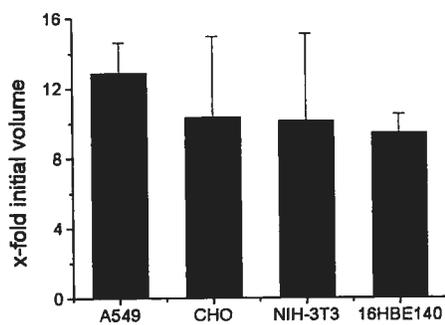
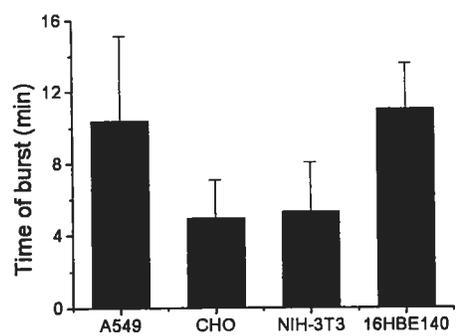


Figure 3

A*B**C***Figure 4**

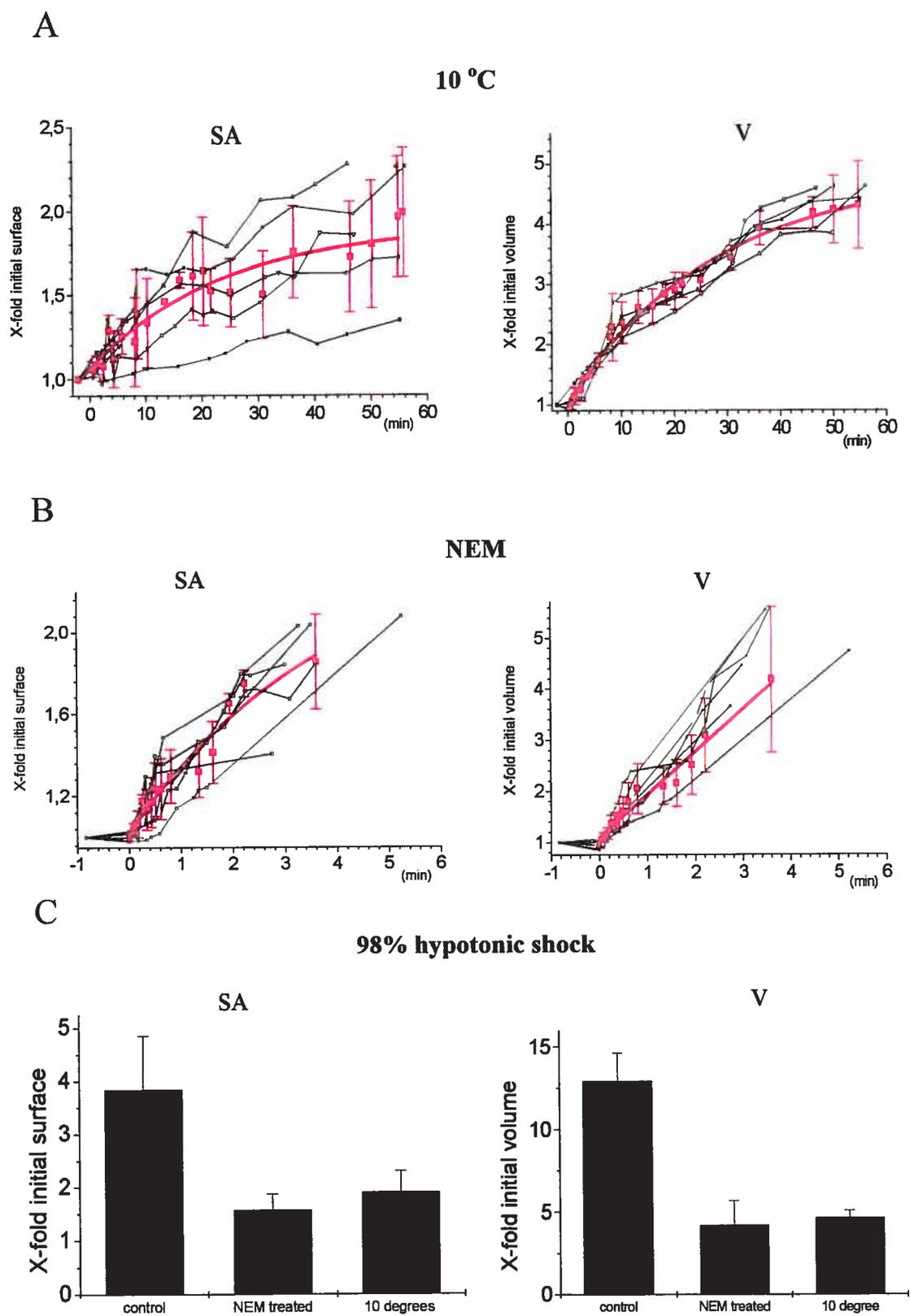


Figure 5

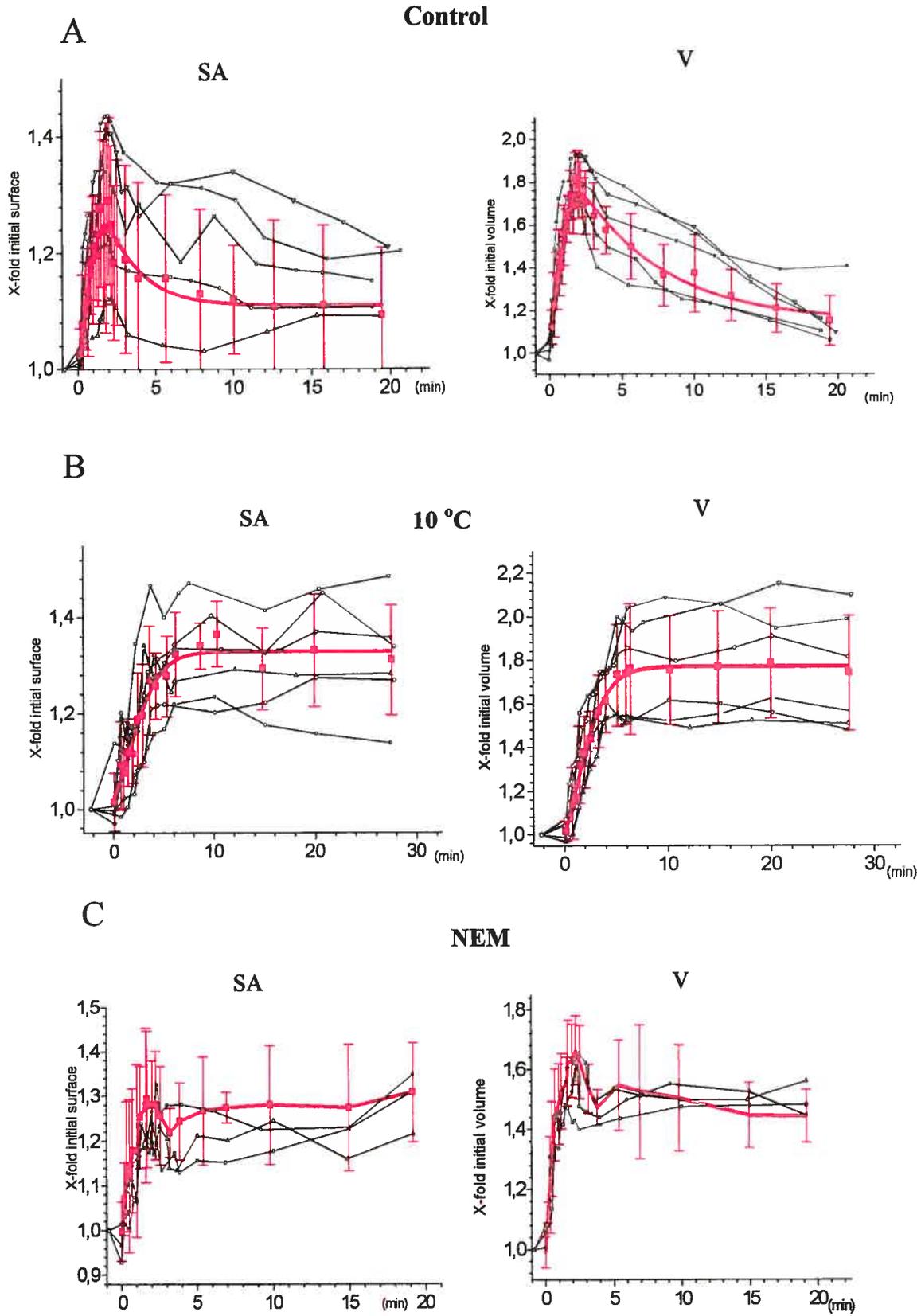
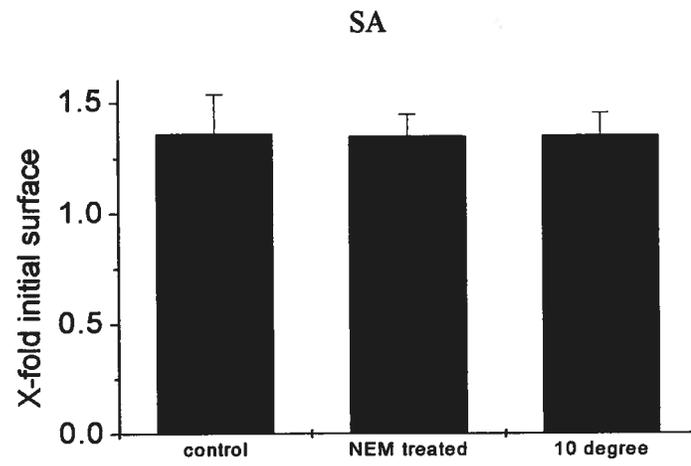


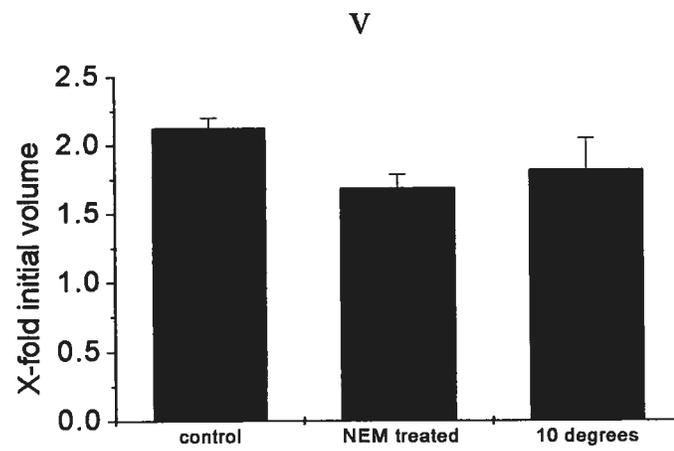
Figure 6

50% hypotonic shock

A



B

**Figure 7**

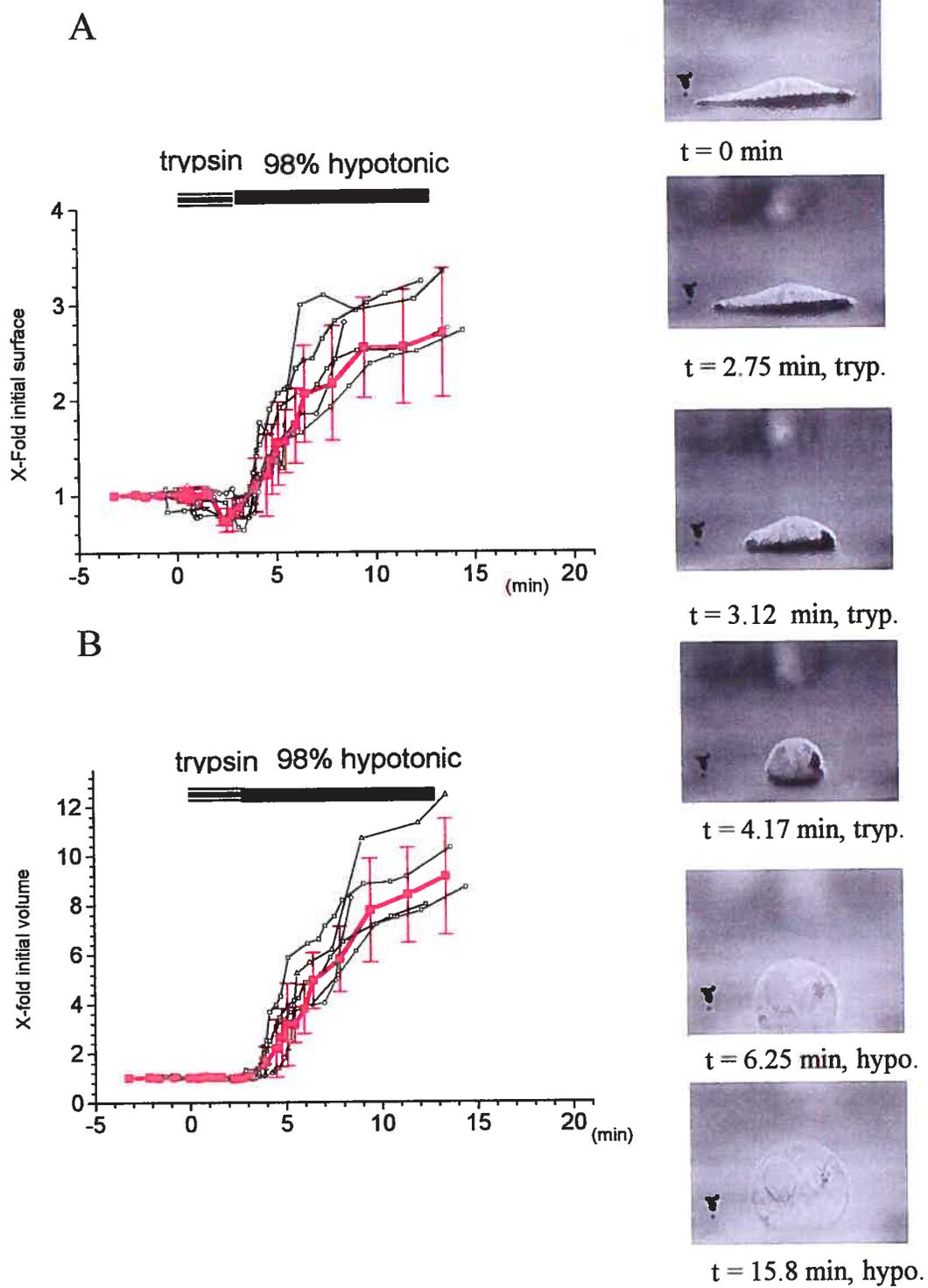
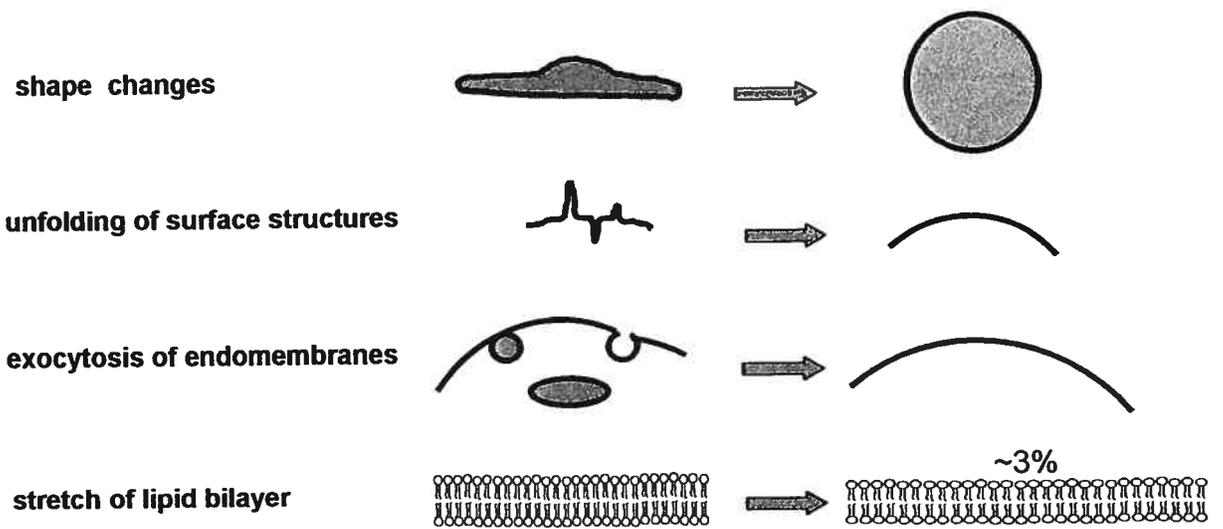
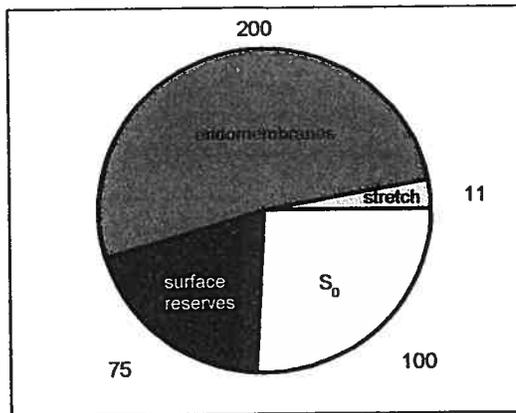


Figure 8

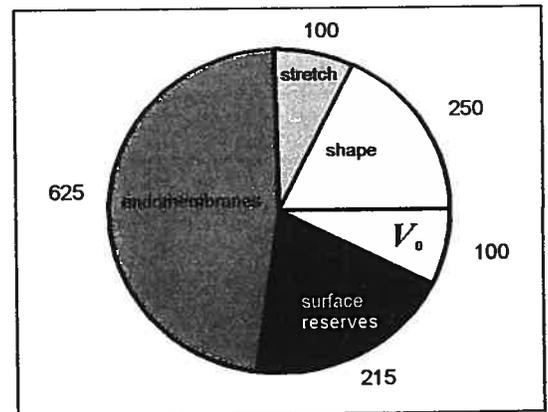


A

B



Surface



Volume

Figure 9

Reference List

- Boudreault, F. & Grygorczyk, R. (2004a). Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations. *J Physiol* **561**, 499-513.
- Boudreault, F. & Grygorczyk, R. (2004b). Evaluation of rapid volume changes of substrate-adherent cells by conventional microscopy 3D imaging. *J.Microsc.* **215**, 302-312.
- Cemerikic, D. & Sackin, H. (1993). Substrate activation of mechanosensitive, whole cell currents in renal proximal tubule. *Am J Physiol* **264**, F697-F714.
- Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., & Gruenert, D. C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **10**, 38-47.
- Graf, J., Rupnik, M., Zupancic, G., & Zorec, R. (1995). Osmotic swelling of hepatocytes increases membrane conductance but not membrane capacitance. *Biophys.J* **68**, 1359-1363.
- Hamill, O. P. & Martinac, B. (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev.* **81**, 685-740.
- Ingber, D. E. (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* **116**, 1157-1173.
- McManus, M. L., Churchwell, K. B., & Strange, K. (1995). Regulation of cell volume in health and disease. *N.Engl.J Med.* **333**, 1260-1266.
- Mongin, A. A. & Orlov, S. N. (2001). Mechanism of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor. *Pathophysiology* **8**, 77-88.
- Morris, C. E. & Homann, U. (2001). Cell surface area regulation and membrane tension. *J Membr.Biol* **179**, 79-102.

Nichol, J. A. & Hutter, O. F. (1996). Tensile strength and dilatational elasticity of giant sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle. *J Physiol* **493** (Pt 1), 187-198.

Olson, J. E. & Li, G. Z. (1997). Increased potassium, chloride, and taurine conductances in astrocytes during hypoosmotic swelling. *Glia* **20**, 254-261.

Raucher, D. & Sheetz, M. P. (1999). Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys.J* **77**, 1992-2002.

Ross, P. E., Garber, S. S., & Cahalan, M. D. (1994). Membrane chloride conductance and capacitance in Jurkat T lymphocytes during osmotic swelling. *Biophys.J* **66**, 169-178.

Shope, J. C., DeWald, D. B., & Mott, K. A. (2003). Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization. *Plant Physiol* **133**, 1314-1321.

Strange, K. (2004). Cellular volume homeostasis. *Adv.Physiol Educ.* **28**, 155-159.

Wan, X., Harris, J. A., & Morris, C. E. (1995). Responses of neurons to extreme osmomechanical stress. *J Membr.Biol* **145**, 21-31.

Zhang, Y. & Hamill, O. P. (2000). On the discrepancy between whole-cell and membrane patch mechanosensitivity in *Xenopus* oocytes. *J.Physiol* **523 Pt 1**, 101-115.

Zhang, Z. & Bourque, C. W. (2003). Osmometry in osmosensory neurons. *Nat.Neurosci.* **6**, 1021-1022.

4. DISCUSSION



4. Discussion

Dans ce projet, nous avons étudié les variations de surface et de volume d'une cellule adhérente lors de chocs osmotiques (voir section 4.2) grâce à une version améliorée d'une technique de reconstruction numérique mise au point dans nos laboratoires et qui est basée sur la prise de deux images perpendiculaires entre elles de la base et du profil cellulaire. Nous avons étudié les réserves de membranes qui sont disponibles lors de chocs hypotoniques modérés et extrêmes (voir section 4.3.) Il existe beaucoup de méthodes actuellement pour évaluer les changements de volume et de surface lors du gonflement des cellules. Toutefois, ces techniques sont en général limitées par leur sensibilité, leur vitesse d'acquisition des images ou encore par leurs coûts exorbitants. De plus, ces limitations ne permettent pas une étude précise des réserves de membrane comme le fait notre technique.

4.1. Les techniques d'études du volume et limitations

4.1.1. Coulter Counter

La technique du compteur Coulter Counter ne fonctionne qu'avec des cellules en suspension, si possible parfaitement sphériques. Le principe de fonctionnement de ce compteur est basé sur la variation de résistance provoquée par les cellules placées dans un champ électrique. Les particules sont au préalable mises en suspension dans un liquide électrolyte. La résistance est mesurée entre deux électrodes placées de part et d'autre d'un orifice calibré à travers lequel les particules sont aspirées par pompage. L'orifice est assimilé à un cylindre d'électrolyte. Chaque fois qu'une particule traverse cet orifice, elle déplace son propre volume d'électrolyte. Elle génère un signal proportionnel au volume de liquide déplacé. La particule (dans notre cas, il s'agit de cellules) est donc comptée et son volume mesuré (Melcion J.P., 2000). Bien évidemment, il est difficile de comparer les résultats d'une technique mesurant le volume de cellules libres aux résultats d'une technique mesurant le volume de cellules attachées à un substrat : les cellules qui sont attachées perdent une partie de leur potentiel volumique avec la section qui se trouve attachée au substrat. Les cellules en suspension offrent la totalité de leur potentiel volumique, étant donné que toute la surface cellulaire est en contact avec le milieu. Ainsi, pour un choc osmotique extrême,

le résultat final sera la lyse cellulaire et les volumes finaux des cellules seront les mêmes quelle que soit la technique utilisée. Mais une cellule soumise à des contraintes ne peut pas avoir les mêmes facilités d'augmentation de volume qu'une cellule libre. Par conséquent, les cinétiques des cellules attachées diffèrent de celles des cellules en suspension. Enfin, notre technique permet de suivre le gonflement d'une seule cellule dans le temps. Le compteur ne peut que mesurer le volume d'une cellule moment où elle passe dans l'orifice du compteur. Le cinétique d'augmentation de volume sera donc caractéristique d'une population de cellules en suspensions dans le temps. L'utilisation d'un montage avec le compteur pourrait éventuellement offrir de très intéressants résultats statistiques, mais ne pourrait en aucun cas nous renseigner sur le comportement individuel d'une cellule. Enfin, cette technique ne permet pas de mesurer directement la surface de la cellule, bien qu'elle soit indirectement calculable à partir de la valeur du volume mesuré et le fait que l'approximation d'une sphère est correcte pour la cellule se déplaçant dans un électrolyte. Il suffit d'isoler la valeur du rayon et de la remplacer dans la formule donnant l'aire d'une sphère.

4.1.2. Micro spectrophotométrie

On peut aussi utiliser des techniques qui utilisent des sondes fluorescentes pour évaluer les changements de volume de la cellule. L'idée est d'introduire une certaine quantité de sonde fluorescente (comme la calcéïne, le fura-2...) qui devrait rester constante si le volume cellulaire ne change pas. Une variation de concentration de cette sonde reflètera une variation de volume d'eau à l'intérieur de la cellule (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1992). Ce genre de technique pourrait biaiser la réalité à cause du phénomène de <<photobleaching>> (phénomène qui se traduit par la perte de fluorescence d'un fluorophore suite à l'action de photons qui induisent des dommages chimiques ou une modification des liens covalents de l'échantillon étudié) (Houtsmuller, 2005) qui fausserait la valeur de concentration de sonde trouvée. De plus, l'utilisation de systèmes de micro spectrophotométrie, afin de pouvoir mesurer la fluorescence, peut endommager l'intégrité de la membrane cellulaire (dommage photo dynamique).

Enfin, les propriétés des fluorophores utilisés pourraient être affectées par les variations

de calciums intracellulaires, de pH ou de viscosité cytoplasmique durant les variations de volume de la cellule (Boudreault & Grygorczyk, 2004b).

4.1.3. Microscopie optique

Le gros avantage de l'utilisation de techniques basées sur la microscopie optique conventionnelle, est une grande résolution temporelle des expériences. Cependant, la résolution spatiale est souvent limitée par une mauvaise visibilité de la membrane plasmique : une augmentation du volume cellulaire est associée avec une diminution du contraste. En effet, plus la cellule grossit, plus le chemin qu'empruntera la lumière à l'intérieur changera, à cause de phénomènes de réfraction et de changements de géométrie de la cellule. La dispersion de la lumière devient plus importante. Le signal décroît de 20 à 30% pour une augmentation de 2 fois le volume initial. Les techniques d'études basées sur la dispersion de la lumière (<<light-scattering>>) ou sur le filtrage spatial permettent l'étude du volume cellulaire, mais donnent peu d'information sur la forme, ou les changements de formes des cellules (Farinas *et al.*, 1997).

4.1.4. Microscopie confocale (CLSM)

Un rayon laser exciteur est envoyé dans un échantillon marqué avec des fluorochromes. Suite au passage de ce rayon laser, il y a émission de rayons fluorescents provenant des fluorochromes des différents plans de la préparation. La préparation va être balayée par le laser, point par point, suivant l'axe des X et l'axe des Y grâce à des miroirs. La fluorescence est réémise dans les trois dimensions et dans les différents plans. Un <<pinhole>> (trou d'épingle) est présent à l'entrée du photodétecteur pour ne récupérer que les photons provenant du point illuminé. Les photons de fluorescence vont être captés par le photodétecteur pour être amplifiés et transformés en signal électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons reçus. Ce signal électrique va ensuite être numérisé en un niveau de gris (valeur du signal compris entre 0 et 255). Il est possible d'obtenir des informations en trois dimensions (comme le volume) de l'échantillon en réalisant des sections optiques d'un échantillon à différents niveaux dans l'axe XY et XZ et en réalisant une série de sections optiques dans l'axe vertical des Z (Kubínova *et al.*, 1999).

En général, l'avantage premier de l'utilisation de techniques basées sur la microscopie confocale est la grande qualité des informations tri-dimensionnelles recueillies sur le gonflement de la cellule. Cependant, si la résolution spatiale est bonne, c'est la résolution temporelle qui laisse à désirer : par exemple, en microscopie confocale, l'acquisition d'une image se fait en une minute environ. Ce délai entre deux reconstructions est inadéquat si l'on considère que les changements de volume d'une cellule sont très rapides, et que pour un choc modéré, le maximum de croissance est atteint entre deux et trois minutes (Kubinova *et al.*, 1999; Eils *et al.*, 1995).

4.1.5. Microscopie à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique explore la surface d'échantillons biologiques à l'aide d'une pointe nanométrique effilée et portée par un ressort très souple. La précision des déplacements de cette pointe dans les trois dimensions de notre espace permet de visualiser aussi bien des structures biologiques complexes que des molécules uniques, et cela dans leur état fonctionnel. Les résolutions latérale et verticale peuvent atteindre quelques angströms. Le temps d'acquisition d'une image peut varier entre une et dix minutes, selon l'échantillon et le type de balayage voulu. Ce délai constitue la plus grande limitation de cette technique (Giocondi *et al.*, 2003; Lal, 1996).

4.1.6. Microscopie à conductance ionique à balayage (SICM)

La microscopie à conductance ionique génère la topographie de surfaces non conductrices, recouvertes d'un électrolyte. La surface est scrutée par une sonde (micropipette) remplie d'un électrolyte. L'écoulement des ions à travers l'ouverture de la pipette est bloqué à courte distance entre la sonde et la surface, limitant ainsi la conductance ionique. Un dispositif permet de maintenir une conductance donnée qui, en retour, détermine la distance à la surface. Le tout est monté sur une plate-forme contrôlée par ordinateur et qui peut se déplacer dans les trois directions de l'espace. Les contrôles électroniques sondent le spécimen sous la micropipette grâce au courant ionique qui varie selon la surface sondée. On obtient ainsi une image topographique d'une surface quelconque.

L'échantillon étudié grâce à cette technique nécessite une préparation spéciale. Les cellules doivent être cultivées sur un substrat spécial pour assurer la transparence de l'échantillon, ce qui limite la résolution de la SICM. La résolution temporelle est par contre inadéquate pour des changements rapides de volume.

Dans certains cas, on peut utiliser cette technique pour l'étude de la variation de hauteur, en restreignant à une dimension l'étude de l'échantillon. Pour des formes spécifiques, comme des sphères, il peut s'avérer suffisant de n'avoir que des valeurs de variations de hauteur (Shin & Gillis, 2006; Korchev *et al.*, 2000; Hansma *et al.*, 1989).

4.1.7. Avantages de la technique DISUR

Le coût, le manque de sensibilité, le temps de reconstruction et le risque de dommages sont les limites des différentes techniques d'imagerie existantes dans le moment. Notre technique permet une étude peu onéreuse et non dommageable pour les cellules. Ceci est devenu possible grâce à l'amélioration d'une technique d'imagerie utilisant la microscopie optique usuelle via la combinaison d'un profil et d'une base numérisés à partir de photos prises simultanément afin de reconstruire en 3D la cellule. Les deux vues simultanées d'une cellule (base et profil) dans la nouvelle chambre à perfusion et la nouvelle interface d'analyse créée avec le logiciel MatLab sont les principales améliorations qui nous ont permis d'étudier les cinétiques d'augmentation de volume et les réserves de membranes de différentes lignées cellulaires, soit les A549, les 16HBE14o-, les NIH-3T3 et les CHO. En faisant subir aux cellules des chocs osmotiques extrêmes (solution hypotonique à 6 mOsm), nous avons pu trouver le maximum de volume et de surface qu'une cellule pouvait fournir avant de mourir. Ces avantages nous ont permis de réaliser un projet simple et performant pour étudier un phénomène jusqu'à maintenant difficilement réalisable au point de vue technique.

Il ne faut toutefois pas penser que la technique DISUR est la seule solution en matière de volumétrie. Il ne faut pas oublier que la technique est limitée par un pourcentage d'erreur de 15% par rapport aux valeurs réelles. Ce qui veut dire que les petites variations de volume seraient difficiles à trouver. De plus, il est difficile de pouvoir évaluer directement l'augmentation de volume due aux variations de formes. En utilisant la technique du Coulter Counter, nous ne pourrions pas obtenir une valeur de

changement de volume due à la forme (les cellules étant sphérique en permanence, il ne faudrait que comparer les valeurs obtenues avec nos valeurs expérimentales) pour chaque cellule individuelle, mais on aurait une valeur moyenne sur une population de cellules passant dans le compteur, ce qui pourrait nous aider à avoir des valeurs précises pour la contribution de volume du au changement de forme.

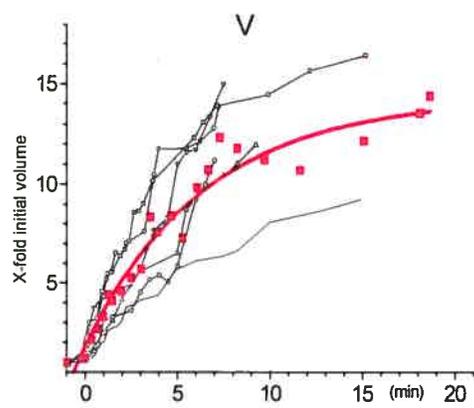
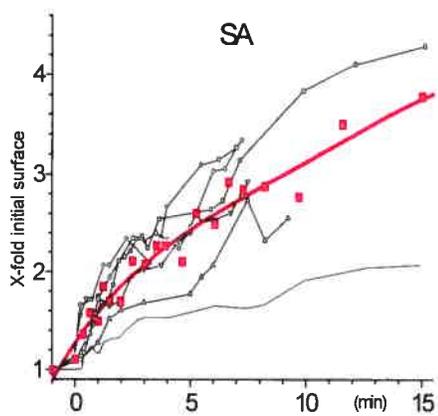
Il est possible de mesurer l'exocytose grâce à la fluorescence. Si nous pouvions monter le montage expérimental sur un microscope optique qui peut alternativement passer à la fluorescence et à l'éclairage optique habituel, nous n'aurions plus à traiter les cellules afin d'en isoler l'exocytose. Il serait alors possible de faire des tests plus poussés sur le rôle du cytosquelette par rapport à l'exocytose. De plus, nous pourrions marquer les intégrines avec une sonde fluorescente afin de pouvoir obtenir des images beaucoup plus nettes de la base qui change dans le temps. Cela améliorerait grandement la précision des résultats, car la base change beaucoup : à partir du moment où la cellule est extrêmement bombée, elle cache la base, qui devient difficile à évaluer. Dans ce cas-ci, la micro spectrophotométrie pourrait fournir une avenue d'étude très intéressante.

4.2. Les cinétiques d'augmentation de volume dans une solution hypotonique extrême à 98%

Comme nous pouvons le constater dans la figure 4.1., les cinétiques d'augmentation de volume (augmentation de volume et de surface dans le temps) sont semblables pour les cellules épithéliales et pour les fibroblastes (les graphes ont les mêmes tendances). Cependant, les fibroblastes atteignent leur point de rupture plus rapidement que les cellules épithéliales (5 à 7 minutes pour les fibroblastes et 12 à 16 minutes pour les cellules épithéliales).

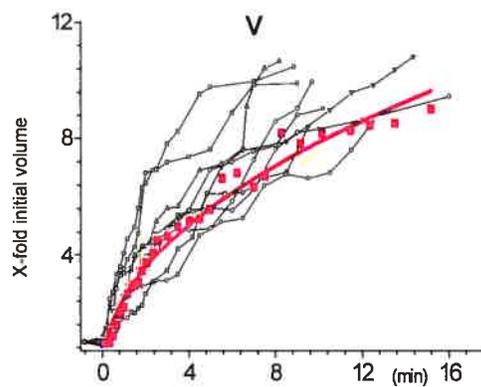
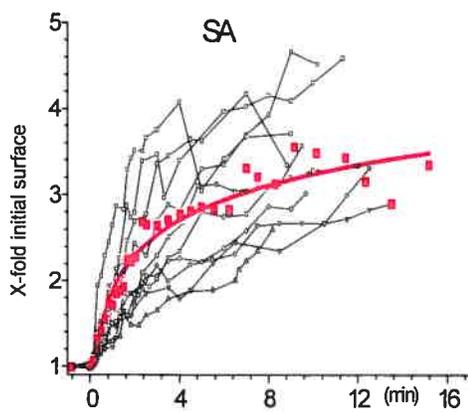
A

A549



B

16HBE140



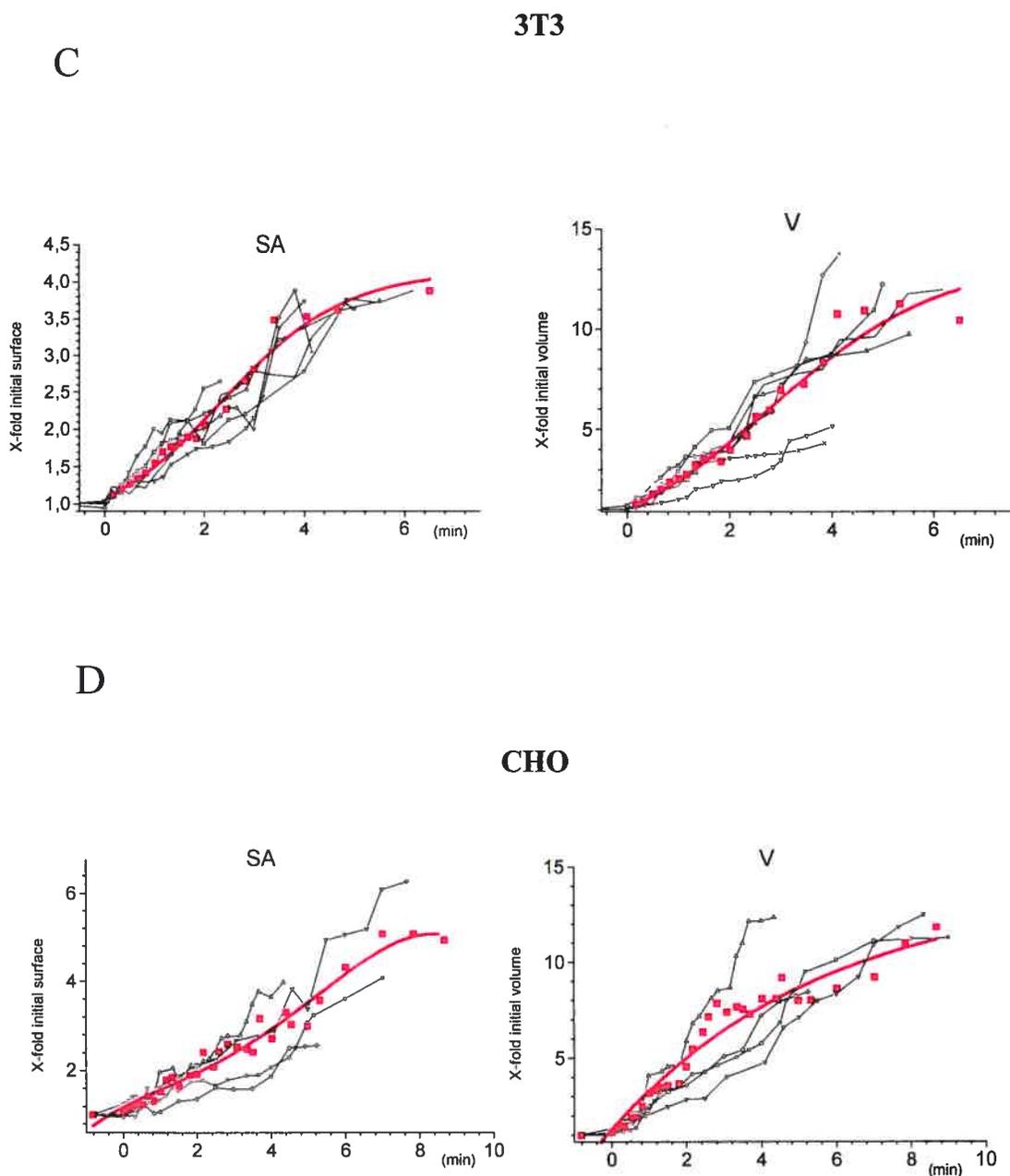


Figure 4.1. (figure 3 de l'article) : Augmentation de surface (gauche) et de volume (droite) des cellules dans le temps. Une fine courbe de couleur noire représente une expérience. Nous ne présentons pas toutes les courbes pour des besoins de clarté. La courbe rouge représente la courbe de lissage des points moyens de 10 expériences qui sont en rouge également. Le milieu cellulaire a été perfusé avec de la solution isotonique (~ 300 mosmol) à 37°C . Au temps $t = 0$ min, le milieu est perfusé avec de la solution hypotonique à 98% (~ 6 mosmol). Les images du profil et de la base de la cellule sont enregistrées jusqu'à la lyse cellulaire.

On a pu déduire les taux initiaux et finaux d'augmentation de volume des cellules des différentes lignées.

	initial rate (fold/min)	final rate (fold/min)	time of burst (min)
A549 (n=10)	2.3 ± 0.10	0.14 ± 0.01	10.4 ± 4.7
A549+trypsination (n=7)	0.98 ± 0.07	0.34 ± 0.02	8.5 ± 2.6
16HBE14o- (n=10)	1.54 ± 0.12	0.34 ± 0.002	11.06 ± 2.5
NIH-3T3 (n=9)	1.66 ± 0.03	1.08 ± 0.02	5.3 ± 2.7
CHO (n=9)	2.01 ± 0.03	0.61 ± 0.09	4.9 ± 2.5

Tableau 4.1. (tableau 1 de l'article) : Taux initiaux et finaux d'augmentation de volume des cellules après un choc hypotonique extrême

Si on se réfère au tableau 4.1, on voit que les taux initiaux d'augmentation du volume sont semblables quel que soit le type cellulaire, soit ~ 2 fois le volume. C'est ensuite que les cinétiques changent vraiment. Si on étudie les taux finaux d'augmentation de volume, on peut constater que les A549 et les 16HBE14o- présentent des taux finaux de 0.14 ± 0.01 et de 0.34 ± 0.002 fois leur volume initial respectivement. Les NIH-3T3 et les CHO présentent des taux finaux de 1.08 ± 0.02 et de 0.61 ± 0.09 fois leur volume initial respectivement, soit des taux finaux plus grands pour les fibroblastes que pour les cellules épithéliales. Ceci pourrait expliquer pourquoi les fibroblastes lysent plus rapidement : le taux d'augmentation de volume décroît plus rapidement pour les cellules épithéliales que pour les fibroblastes, ce qui implique un temps de lyse plus long si on considère que les réserves de membranes sont semblables. On peut aussi considérer l'effet de l'attachement de la cellule au substrat, les

fibroblastes sont peut-être moins fermement attachés à leur substrat que les cellules épithéliales.

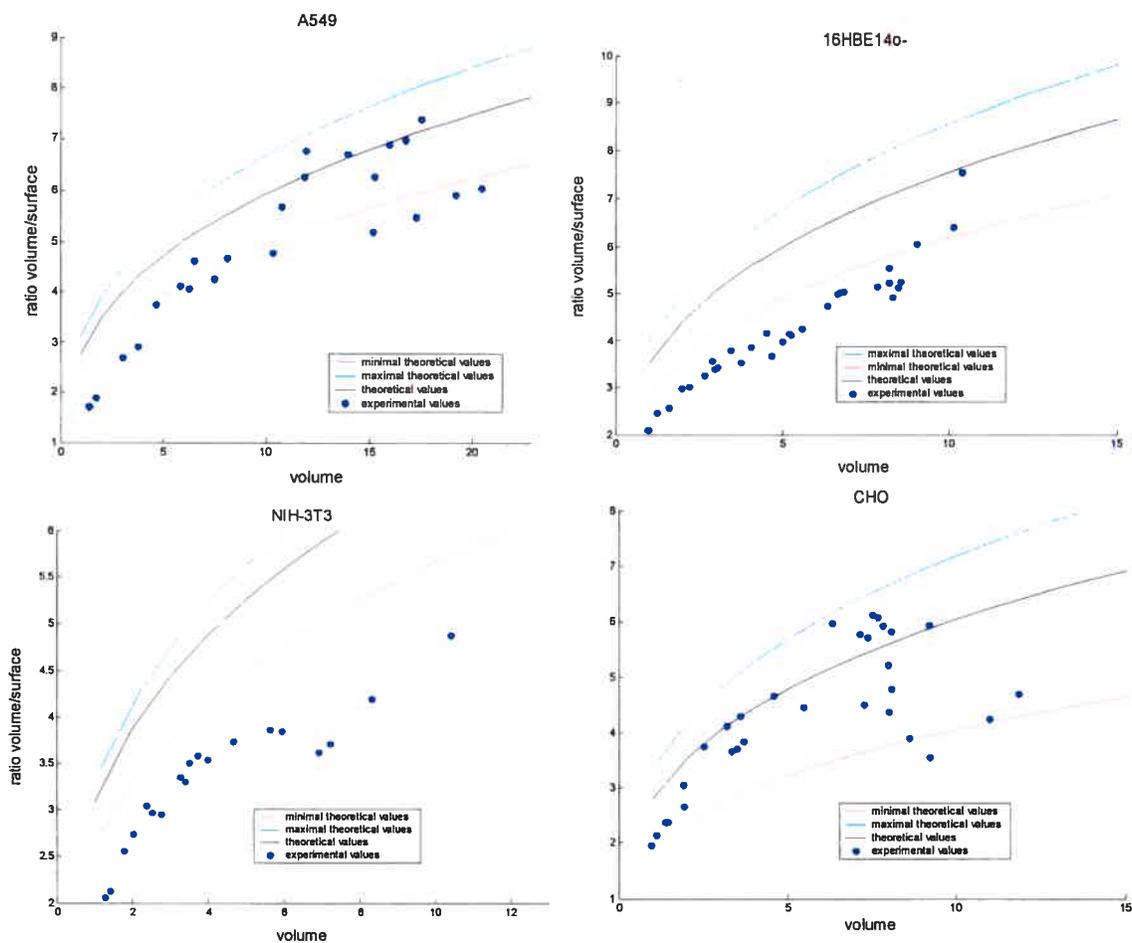


Figure 4.2.: comportement sphérique des cellules lors d'un choc hypotonique à 98%.

À partir des résultats obtenus, il a été possible de tracer la courbe expérimentale et théorique du ratio volume/surface en fonction du volume que la cellule a acquis au cours de l'expérience (figure 4.2.). Les données ont été calculées en fonction des valeurs moyennes qui figurent au début de la section. Les courbes théoriques représentent le ratio hypothétique que la cellule aurait eu si elle avait été ronde dès le départ. On a pris la valeur initiale du volume, valeur qui a été mesurée, et on en a calculé le rayon, en admettant que la cellule était ronde. Ensuite, il a suffi de produire un vecteur de volume et de surface correspondant au volume et à la surface hypothétique si la cellule augmentait son volume de façon constante. Comme les valeurs initiales sont connues avec plus ou moins une marge d'erreur correspondant à la déviation standard, il a été

possible de tracer également une courbe théorique maximale et minimale du ratio volume/surface. Ainsi, plus les points expérimentaux sont proches des courbes théoriques, plus le comportement de la cellule est sphérique. Ainsi, si on regarde la figure traitant les A549, on peut remarquer qu'au début, les points expérimentaux sont éloignés de la courbe théorique. Cela veut dire que les cellules ne réagissent pas comme des sphères à ces moments là. Cependant, on peut remarquer que les points se rapprochent des courbes théoriques, ce la veut dire que les cellules adoptent une forme sphérique à partir d'un certain point et au fur et à mesure, les cellules tendant à se comporter comme des sphères.

Le comportement des 16HBE14o- est à peu près similaire. En effet, on peut remarquer que les cellules agissent de façon non sphérique au début de l'expérience. Cela prend un certain volume avant que les cellules ne se comportent comme des sphères. Cependant, les points expérimentaux se trouvent toujours très proches des courbes théoriques jusqu'à obtenir un comportement vraiment sphérique à la fin de l'expérience.

Les NIH-3T3 ont, d'après le graphe, un comportement différent de celui d'une sphère. On peut remarquer que les points expérimentaux sont toujours assez loin des courbes théoriques. Ce qui veut dire que ces cellules ne se comporte pas comme des sphère, contrairement aux cellules CHO, qui se comportent toujours dès le départ comme des sphères. On peut remarquer que les points expérimentaux caractérisant les CHO sont toujours dans l'intervalle délimité par les courbes théoriques maximales et minimales.

4.2.1. Effet de l'attachement au substrat

Nous avons fait des expériences préliminaires sur le rôle de l'adhérence de la cellule au substrat de verre sur les cinétiques d'augmentation de volume. La figure 4.1. montre clairement que les fibroblastes ont des vitesses d'augmentation de volume moyennes plus grandes que celles des cellules épithéliales.

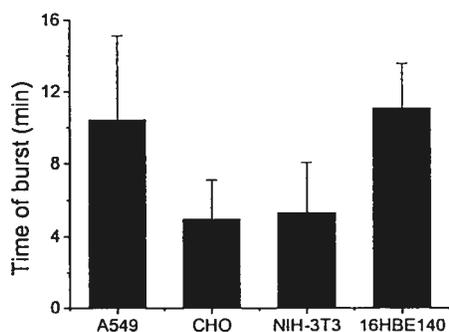


Figure 4.3. (figure 4C de l'article) : Temps moyen de lyse cellulaire entre le début du choc hypotonique à 98% et la lyse cellulaire. La barre d'erreur est la déviation standard (S.D.).

Si on se réfère à la figure 4.3., on peut voir que les fibroblastes prennent environ 2 fois moins de temps pour lyser que les cellules épithéliales (5 à 7 minutes pour les fibroblastes et environ 12 à 16 minutes pour les cellules épithéliales). Peut-être que la plus grande rapidité des fibroblastes à gonfler par rapport aux cellules épithéliales s'explique par le fait que ces cellules sont moins fermement attachées et qu'elles présentent une structure de tenségrité moins résistante aux grandes déformations que celles des cellules épithéliales. En effet, si les cellules épithéliales sont fermement attachées et qu'elles sont bien étalées, alors les flux osmotiques seront restreints au niveau de la base et hypothétiquement, elles auront un support mécanique supplémentaire qui aidera la membrane à résister au gonflement. Elles gonfleront alors moins vite.

Pour connaître la raison de cette différence de vitesse d'augmentation de volume, il va falloir tester les effets d'agents comme la trypsine qui attaqueront les liens des cellules (épithéliales et fibroblastes) avec leur substrat. Ensuite, on pourra comparer les vitesses d'augmentation de volume des fibroblastes par rapport aux cellules épithéliales après les avoir soumis à un choc extrême. Il faudrait refaire ces tests en utilisant un agent, comme la cytochalasine d, qui détruirait le réseau d'actine et donc, le cytosquelette (White *et al.*, 2001), afin de connaître la vitesse d'augmentation de volume des cellules sans cytosquelette. Enfin, il faudrait répéter ces tests en combinant la destruction des liens de la cellule avec son substrat ainsi que la destruction du

cytosquelette. Ces tests nous permettront d'étudier les cinétiques d'augmentation de volume des cellules sans les contraintes du substrat et du cytosquelette. On pourra vérifier si le cytosquelette des fibroblastes est en effet moins résistant que celui des cellules épithéliales, et si les fibroblastes adhèrent moins bien que les cellules épithéliales à la lamelle de verre.

Nous avons perfusé le milieu extracellulaire des cellules A549 avec de la trypsine pendant environ 4 minutes jusqu'à ce que la cellule devienne bien ronde, pour voir comment elles s'arrondissent lors de la trypsinisation et comment la surface et le volume cellulaire sont affectés lors de ce processus. La figure 4.4. indique clairement que la surface totale utilisée par la cellule chute d'environ $25 \pm 12\%$ lors de la trypsinisation, alors que le volume de la cellule demeure constant. Ceci s'explique par le fait que la trypsine permet le détachement de la cellule et que la membrane se comprime pour occuper moins de surface.

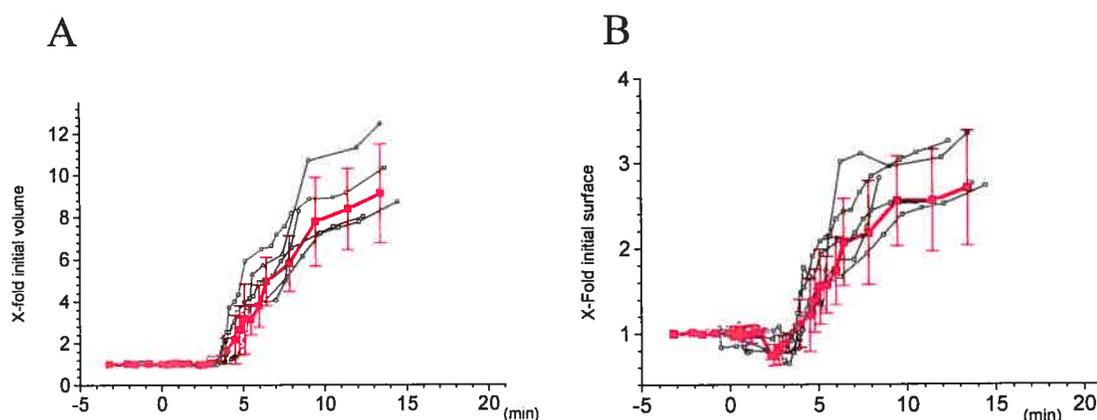


Figure 4.4. (figure 8 de l'article) : Effets de l'attachement des cellules au substrat sur la surface cellulaire et augmentation de volume extrême

Changements de volume (V) et de surface (SA) Durant la trypsinisation, et gonflement extrême dans une solution hypotonique à 98%. La trypsinisation commence à $t = 0$ min et dure environ 4 min. La perfusion avec la solution hypotonique commence à environ 4 min et continue jusqu'à la lyse cellulaire.

On pourrait penser qu'à volume constant, si une forme s'arrondit, sa surface va diminuer. Ceci implique qu'une cellule ayant une petite base attachée au substrat et qui est bien ronde fera plus facilement face au milieu. La trypsine attaque les liens entre la cellule et le substrat (Morris & Homann, 2001; Mills & Morris, 1998). Si ces liens

n'existent plus, les cellules gonflent avec plus de liberté. La trypsination des A549 a eu pour effet de n'accélérer que faiblement les cinétiques d'augmentation de volume. L'effet de la trypsine sur les cinétiques d'augmentation de volume est très significatif : en effet, les A549 prenaient 10.4 ± 4.7 min pour lyser si on appliquait un choc extrême sans avoir utilisé la trypsine au préalable. L'utilisation de la trypsine a fait diminuer le temps de lyse à 8.5 ± 2.6 min, ce qui n'est pas une baisse très significative (tableau 4.1.). Le changement majeur s'est produit au niveau des courbes d'augmentation de volume et de surface. Les A549 avaient un taux d'augmentation initial de volume de 2.3 ± 0.1 fois le volume initial et à la fin de l'expérience, ce taux diminuait à 0.14 ± 0.01 fois le volume initial sans l'effet de la trypsine. La trypsination a eu pour effet de diminuer le taux initial à 0.98 ± 0.07 fois le volume initial et le taux final d'augmentation de volume à 0.34 ± 0.02 fois le volume initial (tableau 4.1.). Normalement, on devrait s'attendre à une augmentation du taux initial d'augmentation de volume suite à la trypsination, mais au lieu d'avoir une augmentation de volume soudaine et rapide, les cellules A549 ont plutôt eu une augmentation plus lente et uniforme. Or, nous avons constaté une diminution de la surface faisant face au milieu de $26 \pm 10\%$ des A549 lors de la trypsination, alors il n'est pas étonnant que le taux initial d'augmentation du volume soit moins grand. De plus, il se pourrait que le cytosquelette des A549 soit très résistant aux déformations. Les valeurs maximales de volume et de surface des A549 n'en n'ont toutefois pas été affectées : les cellules A549 ont augmenté leur volume de 9.2 ± 2.3 fois leur valeur initiale après trypsination ainsi que de 2.7 ± 0.7 fois leur surface initiale après trypsination (figure 4.4.).

Les tests de trypsination sur les A549 ont diminué le temps de lyse lors d'un choc extrême. Ainsi, la liaison de la cellule au substrat affecte surtout leur façon de gonfler (taux initial, taux final), il faudrait répéter ces tests sur les fibroblastes, ainsi que les autres tests proposés précédemment afin de connaître l'implication réelle des liens cellules/substrat et aussi l'implication du cytosquelette dans la vitesse d'augmentation de volume des cellules en traitant les cellules avec un agent comme la cytochalasine d.

4.3. Réserves de membranes

Nous savons qu'une cellule augmentera sa surface et son volume cellulaire lors d'un choc hypotonique. Nous savons aussi que la cellule accommode ces augmentations en changeant de forme, en utilisant la membrane présente sous forme de villosités de la surface et en puisant dans un réservoir interne de membrane fusionnant à la surface membranaire (Raucher & Sheetz, 1999). Jusqu'à maintenant, peu avait été fait pour étudier ce réservoir, faute de moyens (Fisher *et al.*, 2004). Les études les plus communes portent en général sur l'effet de la tension sur l'exocytose de membrane et ce, sur une portion infime de la surface membranaire (Sens & Turner, 2006; Fisher *et al.*, 2004; Dai & Sheetz, 1999; Raucher & Sheetz, 1999). Il n'existe pas d'étude qui tente de déterminer de façon précise les réserves de membrane disponibles. Il nous est possible maintenant, avec une précision sur les surfaces et les volumes de 10-15% par rapport aux valeurs obtenues avec le CLSM (Boudreault & Grygorczyk, 2004b), de mieux évaluer ce réservoir. Maintenant, en plus de pouvoir connaître les cinétiques d'augmentation de volume nous pouvons obtenir une valeur des réserves de membranes qu'une cellule épithéliale peut posséder (voir figures 4.1 et 4.5 et début de la section 4).

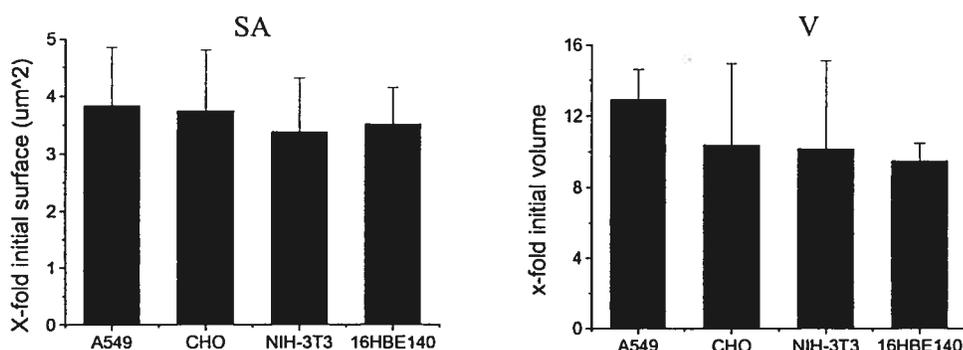


Figure 4.5. (figure 4 A, B de l'article) : Valeurs maximales de surface et de volume des cellules lors d'un choc hypotonique à 98%.

Valeurs maximales moyennes données avec une barre d'erreur qui représente la déviation standard (S.D.)

Les tests effectués nous ont révélé que les cellules possèdent des réserves de membranes très vastes. En nous référant à la figure 4.5., on constate que le volume final des cellules varie entre 9.5 et 12.9 fois leur valeur initiale et que cette augmentation de

volume est accompagnée d'augmentation de 3.4 à 3.8 fois la surface initiale de la cellule. La contribution majoritaire de membrane dans des conditions extrêmes est due à une réserve interne qui fusionne à la membrane, suite à l'exocytose de vésicules membranaires (Sens & Turner, 2006; Raucher & Sheetz, 1999). Cette contribution est négligeable dans le cas de chocs modérés, qui induisent un gonflement cellulaire de moins de 2 fois le volume initial (dans notre cas, des chocs causés par une osmolarité réduite de 50%).

4.3.1. Réserves membranaires lors d'un choc hypotonique extrême

À la lumière de toutes les expériences et analyses faites au cours de ce projet, nous avons étudié la contribution de différents pools de membranes utilisés par la cellule lors d'un choc hypotonique. On sait que les cellules A549 ont augmenté leur volume de 12.9 ± 1.7 fois leur valeur initiale ainsi que de 3.8 ± 1.0 fois leur surface initiale au terme d'un choc hypotonique extrême (osmolarité de la solution physiologique diminuée à 2%).

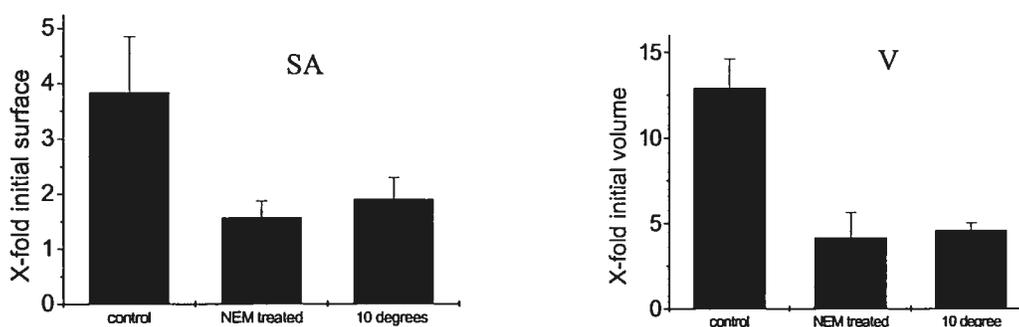


Figure 4.6. (figure 5C de l'article): Volume et surface des A549 lors d'augmentation de volume extrême après avoir bloqué l'exocytose.

Valeurs de surface et de volume maximum moyen des A549 après avoir bloqué l'exocytose en baissant la température de perfusion à 10°C ou en traitant les cellules avec du NEM. La barre d'erreur représente la déviation standard (S.D.).

Il a suffi de bloquer l'exocytose de membrane, en abaissant la température de perfusion à 10°C ou en préincubant les cellules avec du NEM à 1 mM pendant 15 minutes à température ambiante, pour en isoler la source de membrane provenant des villosités présentes à la surface membranaire. Ces deux approches ont permis d'observer à peu près les mêmes résultats (figure 4.6.), soit une diminution de volume lors du choc

effectué à 10°C, de 12.9 ± 1.7 fois la valeur initiale à 4.6 ± 0.4 fois le volume initial. Les expériences avec les cellules pré incubées avec du NEM ont fait diminuer le volume à 4.2 ± 1.5 fois la valeur initiale. On a pu constater une diminution de la surface, lors du choc effectué à 10°C, de 3.8 ± 1.0 fois la surface initiale à 1.9 ± 0.4 fois la surface initiale. Les expériences avec les cellules préincubées avec du NEM ont fait diminuer la surface à 1.6 ± 0.3 fois la surface initiale.

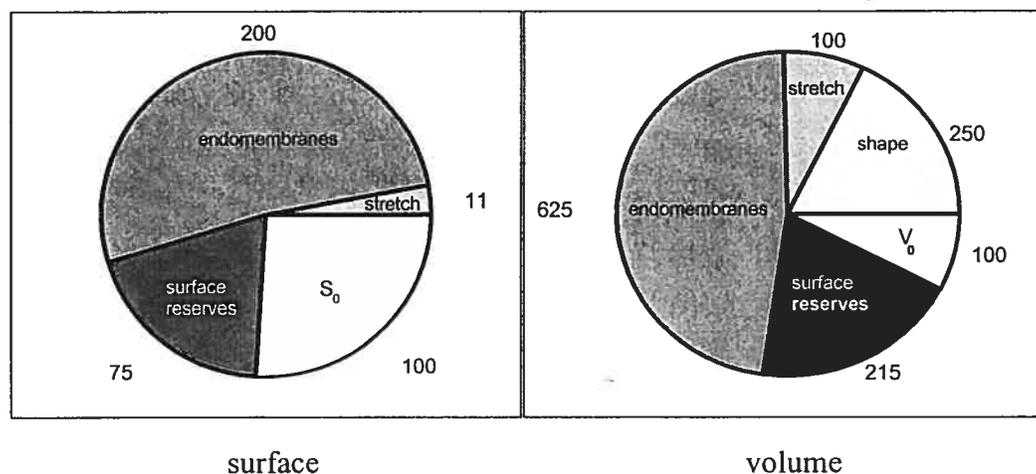


Figure 4.7. (figure 9 de l'article): Contributions relatives des changements de forme de la cellule, de l'étirement membranaire, de la réserve sous-membranaire et de la réserve de membrane déjà présente à la surface cellulaire à l'augmentation de volume des A549.

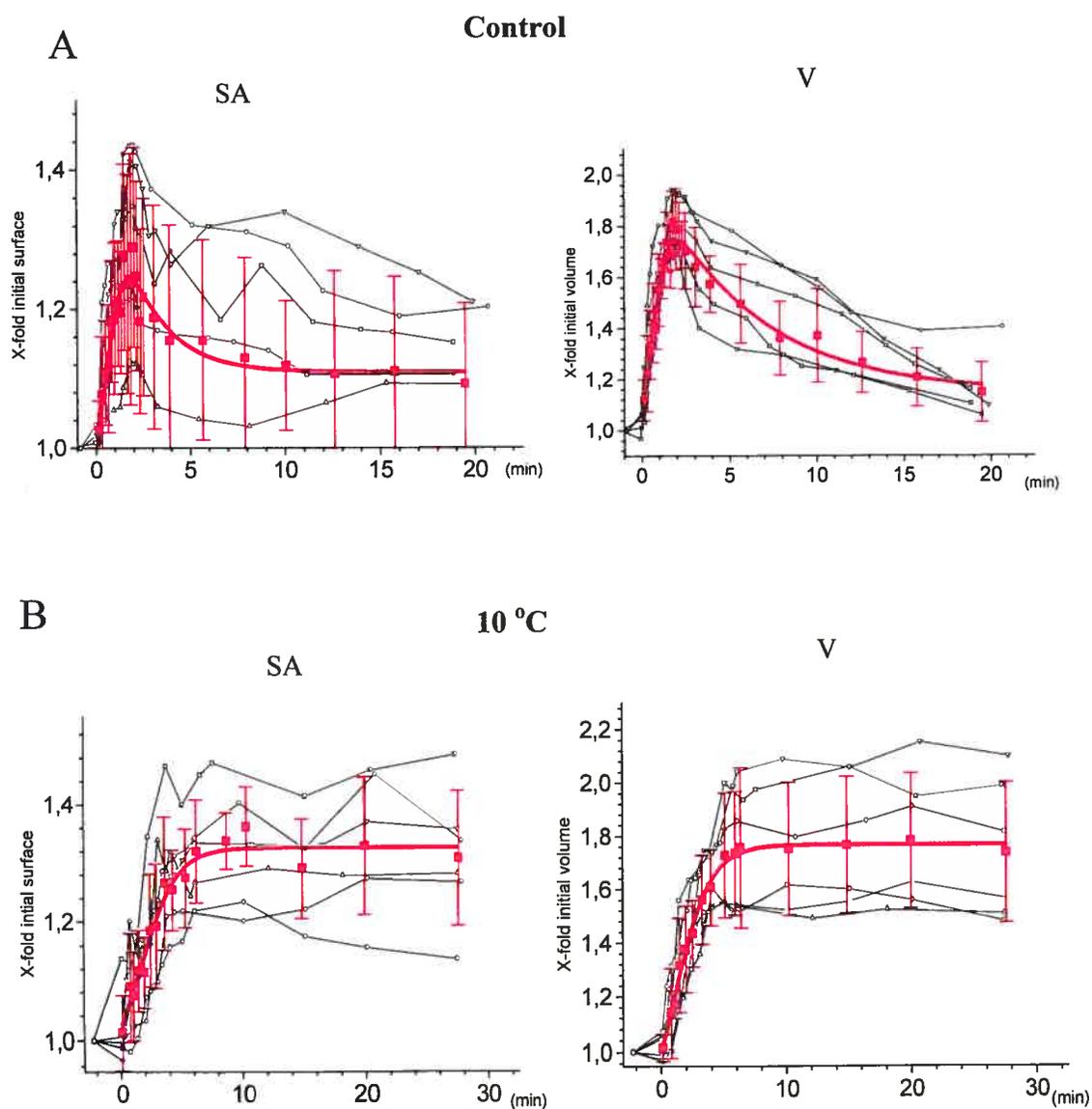
Ainsi, si nous nous référons à la figure 4.7., nous pouvons dire que pour les A549 :

1. l'augmentation de volume précédent la lyse de la cellule est caractérisée par une réserve de membrane dont la contribution (en pourcentage du volume initial de la cellule, avant le choc) est donnée par 100% de l'ajout total provenant de l'étirement de la cellule, 250% des variations de forme de la cellule, 215% des réserves existantes sous forme de villosités à la surface et 625% des réserves sous membranaires et fusionnant à la membrane.
2. l'augmentation de surface juste avant la lyse de la cellule est caractérisée par une réserve de membrane dont la contribution (en pourcentage de la

surface initiale de la cellule, avant le choc) est donnée par 11% de membrane provenant de l'étirement de la cellule, 75% des réserves existantes sous forme de villosités et 200% de réserves sous membranaires fusionnant à la membrane ;

4.3.2. Réserves membranaires lors d'un choc hypotonique modéré

Lors d'un choc hypotonique de 50%, les A549 ont connu en moyenne une augmentation de 1.3 ± 0.1 fois leur surface initiale. Ceci correspond à une augmentation de 1.8 ± 0.1 fois leur volume initial avant d'entrer dans la phase RVD. Lorsqu'on traite les cellules avec du NEM ou que l'on perfuse avec de la solution hypotonique à 10°C , on peut remarquer que dans les deux cas, la phase RVD est abolie (figure 4.8.).



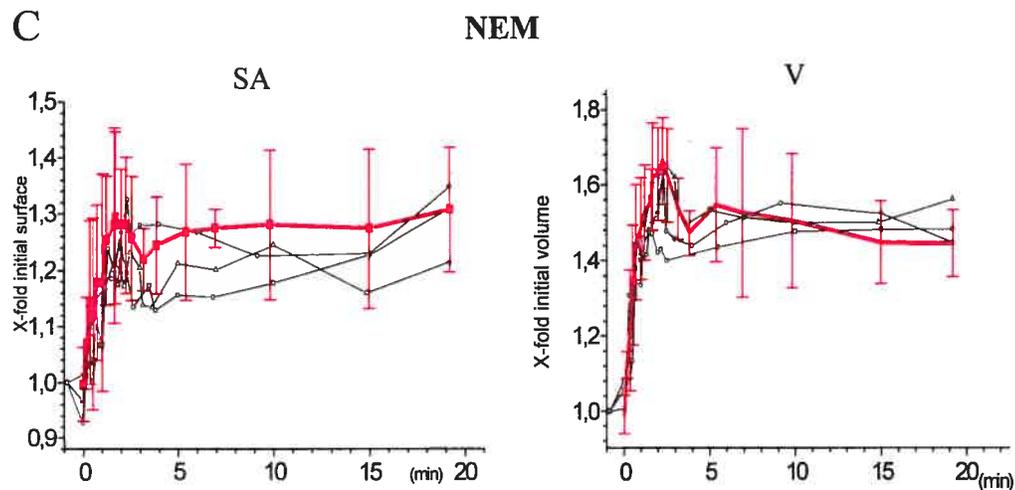


Figure 4.8. (figure 6 de l'article): augmentation de volume des A549 lors d'un choc hypotonique à 50%

A. Augmentation de volume des A549 lors d'un choc hypotonique à 50% à 37°C. Le signal biphasique provient du fait que tout choc modéré implique une phase d'augmentation de volume et une phase de RVD (voir section 1.1.1.)

B. Augmentation de volume des A549 si la température de perfusion est de 10°C.

C. Augmentation de volume des A549 traitées avec le NEM et dont la température de perfusion est de 37°C.

Une courbe fine de couleur noire représente une expérience. La courbe rouge (\pm S.D.) est la courbe de lissage des valeurs moyennes en rouge également. Seulement 4-5 expériences sont représentées pour des raisons de clarté.

Après traitement avec le NEM, on a observé une augmentation de la surface cellulaire à peu près identique à celui correspondant aux cellules dont le milieu est perfusé avec de la solution hypotonique normale à 37°C. Le même résultat a été observé lors de la perfusion de la cellule avec une solution hypotonique à 10°C. Quant à l'augmentation de volume, elle est montée d'environ 1.7 fois si on préincube les cellules avec du NEM et à environ la même valeur lors de la perfusion à 10°C (figure 4.9.).

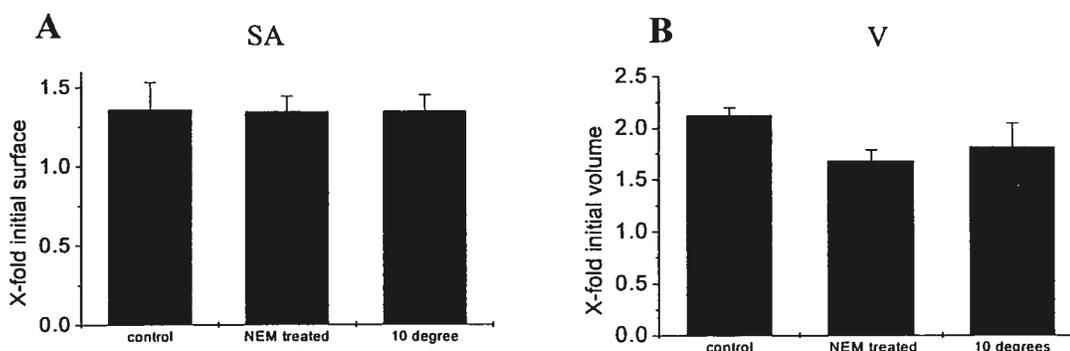


Figure 4.9. (figure 7 de l'article): Valeurs maximales de surface et de volume des A549 lors d'un choc hypotonique modéré à 50% si l'exocytose est bloquée. Valeurs maximales moyennes de surface et de volume si l'exocytose est bloquée:

A) en baissant la température de perfusion à 10 °C;

B) en traitant les A549 avec de NEM.

Les barres d'erreurs sont données par la déviation standard (S.D.)

Ceci montre que la contribution de l'exocytose (qui est d'environ 12% en moyenne) lors d'un choc à 50% est beaucoup moins importante lors que lors d'un choc à 98%, pour lequel la contribution de l'exocytose est d'environ 66% en moyenne (figure 4.9. et 4.6.).

Plusieurs groupes pensent que lors de changements de formes de la cellule, tels un étirement, ou un gonflement, la cellule se protège en utilisant sa réserve intracellulaire provenant de la fusion vésiculaire à la surface (Hamill & Martinac, 2001; Morris & Homann, 2001). Nos résultats montrent que l'accommodation d'un changement soudain de volume, ou de forme, en condition physiologique serait plutôt due à l'utilisation des réserves de membranes déjà présentes à la surface.

4.3.3. Implication du cytosquelette

Le cytosquelette pourrait être un facteur limitant quant à l'utilisation du réservoir interne de membrane (Raucher & Sheetz, 1999). Il a été suggéré que la rigidité du cytosquelette serait un facteur limitant à l'utilisation du réservoir : une augmentation de tension due à un gonflement osmotique réduirait le réservoir de membrane quand la cellule est sous tension à cause du cytosquelette (Raucher & Sheetz, 1999). Il est possible que l'étude des <<blebs>> cellulaires puissent apporter quelques réponses à ces assertions : les <<blebs>> de membranes sont dus à la séparation complète de la

membrane du cytosquelette (Dai & Sheetz, 1999). Ce sont des extensions membranaires sphériques qui sont communément observées chez les cellules eucaryotes quand elles s'étalent sur un substrat, lors de la migration cellulaire, ou encore durant la mitose (Cunningham, 1995). Les <<blebs>> se forment probablement quand la pression le long de la membrane plasmique excède la force du lien entre la membrane et le cytosquelette.

L'apparition de <<blebs>> est possible en utilisant des stressés physiques ou chimiques. Ce phénomène fut fréquent lors des expériences à très basse tonicité de la solution de perfusion. En regardant les images et les films des reconstructions à la fin des expériences, on a la très nette impression que la membrane n'est plus attachée au cytosquelette et forme une bulle. Les <<blebs>> sont très fréquents lors des chocs hypotoniques extrêmes. En général, quand le cas se présente, les minutes suivantes sont caractérisées par une élévation de volume et de surface membranaire, jusqu'à la lyse de la cellule : quand la membrane se détache du cytosquelette, on remarque la soudaine élévation de volume et de surface, ce qui indique qu'un pool de membrane est ajouté rapidement jusqu'à ce que les réserves s'épuisent et que l'action du gonflement cellulaire se termine par la lyse cellulaire. Ce phénomène suggère qu'en effet, le cytosquelette limite le gonflement cellulaire.

En utilisant un <<tweezer>> (moyen de générer une légère pression sur la membrane grâce à laser concentré sur la membrane transparente et se réfractant sur le bord de la membrane, poussant le bord de la membrane sur le point focal du laser) (Apodaca, 2002), nous pourrions faire une étude de tension et, par exemple essayer de vérifier à quelle tension est soumise la cellule juste avant la lyse. Nous pourrions donc essayer de déterminer si cette tension est la même d'une expérience à l'autre pour une lignée cellulaire et aussi refaire ces tests sur des cellules des autres lignées cellulaires pour vérifier la reproductibilité des résultats.

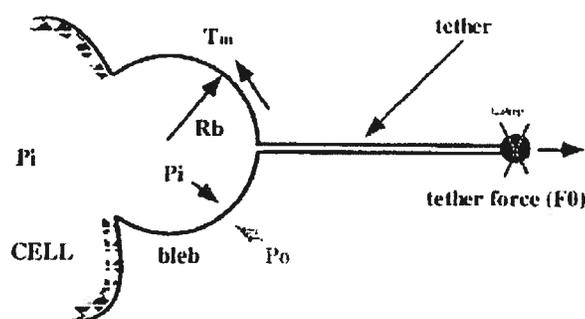


Figure 4.10. : Diagramme montrant la balance des forces sur une membrane formant un <<bleb>>. P_i est la pression à l'intérieur de la cellule, P_0 est la pression en-dehors de la cellule (Dai & Sheetz, 1999).

4.4. Perspectives

4.4.1. Implications de la nature des cellules

L'étude des cinétiques d'augmentation de volume des cellules lors de chocs hypotoniques extrêmes ont révélé des courbes d'augmentation de volume et de surface caractéristiques des lignées cellulaires (figure 4.1.): en effet, on peut noter que des courbes théoriques de tendance mathématiques pourraient bien lisser les cinétiques d'augmentation de volume des lignées cellulaires utilisées dans ces expériences. Il faudrait poursuivre dans cette voie et vérifier si effectivement un type cellulaire donné peut avoir un comportement prévisible mathématiquement lors d'un choc hypotonique donné.

De plus, si l'on tient en compte les résultats de la figure 4.3., on peut noter que les temps moyens de lyse des cellules semblent aussi être caractéristiques des lignées cellulaires : en effet, on peut souligner que le temps de lyse des cellules épithéliales (A549 et 16HBE14o-) varie entre 10.00 et 15.00 (± 0.10) minutes en moyenne. Pour les fibroblastes (NIH-3T3 et CHO), ces valeurs varient entre 4 et 6 (± 0.07) minutes environ.

Il faudrait refaire les tests sur d'autres lignées cellulaires et vérifier si on peut faire les mêmes observations sur d'autres types de fibroblastes et d'autres types de cellules épithéliales afin de pouvoir vérifier si les cinétiques d'augmentation de volume et les temps de lyse sont des caractéristiques de la nature du type cellulaire.

4.4.3. Comportement du cytosquelette

Comme il a été suggéré en section 4.3, il faut connaître l'implication du cytosquelette et des liens unissant les cellules avec leur substrat afin de savoir si, premièrement, les fibroblastes adhèrent moins sur le verre que les cellules épithéliales, et si, deuxièmement, les fibroblastes ont un cytosquelette moins résistant que celui des cellules épithéliales.

Enfin, il faudrait pouvoir étudier la polymérisation et la dépolymérisation du réseau d'actine associée au cytosquelette lors du gonflement cellulaire. Nous pourrions essayer de savoir comment le cytosquelette réagit dans le temps selon le choc hypotonique qu'on lui impose. Ceci pourrait être fait en marquant la F actine avec une sonde fluorescente et utiliser notre technique en conditions hypotoniques extrêmes.

4.4.4. Études reliées

Le gonflement cellulaire est un processus très présent lors de la division cellulaire ou encore durant la phagocytose : lors de la phagocytose, le neutrophile crée une excroissance qui se referme sur le corps qui sera internalisé. Dans ce processus, on peut remarquer que la membrane plasmique accumule *in vivo* beaucoup de membrane et ce, sans que l'on applique de choc quelconque. L'étude des neutrophiles pourrait constituer une autre approche pour étudier les réserves de membrane (Herant *et al.*, 2005), bien qu'il ne soit pas possible d'utiliser notre montage dans le cadre de ce genre d'expérimentation. En effet, la reconstruction numérique des cellules grâce à notre dispositif nécessite des topologies cellulaires simples et assez symétriques autour d'un noyau. Or, lors de la phagocytose, le neutrophile accumule de la membrane pour former des protubérances qui entoureront un corps étranger. Le volume des protubérances ne pourrait pas être évalué avec notre technique.

Certaines études reliées à la tension membranaire régissant l'utilisation du réservoir interne de membrane et aussi reliées à l'exocytose pourraient répondre à certaines questions :

- est-ce que la tension ressentie à la membrane est uniforme partout à la membrane, en particulier au sommet et à la base de la cellule ? Sinon, est-ce que cette tension varie avec le gonflement ?

- est-ce que la densité vésiculaire est répartie uniformément à la membrane ?
- est-ce que la contribution du pool intracellulaire est uniforme à la membrane au cours du gonflement ?

La morphogenèse est le processus par lequel il y a création de formes. La création de tissus s'effectue selon des processus d'induction par des signaux (morphogènes) émis par d'autres tissus existants. Ces signaux sont libérés dans le milieu extracellulaire via l'exocytose et captés dans les cellules environnantes via l'endocytose. Grâce à ce processus, ils ont pu induire la transformation de cellules musculaires de souris en cellules osseuses en les soumettant à un morphogène comme le BMP2 (Rauch & Farge, 2000). Sachant que lors d'un choc osmotique extrême la grande majorité de l'addition de membrane se fait via l'exocytose et que les variations de formes de la cellule entrent aussi en ligne de compte dans l'accommodation de la cellule au gonflement (une forme de morphogenèse), il serait intéressant de vérifier le rôle que les morphogènes pourraient avoir sur le gonflement cellulaire. Nous pourrions même essayer de voir s'il est possible de moduler le gonflement cellulaire extrême en mettant les cellules en présence d'un morphogène en particulier, ou simplement en modifiant les cinétiques d'augmentation de volume et vérifier si certaines conditions pourraient augmenter le temps de vie de la cellule avant la lyse.

4.5. Améliorations

4.5.1. Sources d'erreurs

Le présent projet a permis d'explorer des avenues nouvelles dans le domaine de la volumétrie et dans la compréhension de la régulation du volume cellulaire. Nous avons pu étudier les réserves de membranes d'une cellule et les cinétiques de changement de volume et de surface lors d'un choc extrême. Comme il n'y a pas beaucoup de précédents dans la littérature, il est normal de s'interroger sur les sources d'erreurs possibles lors des expériences et de leurs analyses. Ainsi, il sera plus facile de pouvoir identifier les améliorations à faire sur le montage ou tout ce qui se rattache au montage.

Selon Boudreault et al., il y avait entre 10 et 15% d'erreur entre les résultats de la reconstruction selon DISUR (Boudreault & Grygorczyk, 2004b) et les résultats obtenus avec la microscopie confocale. Les sources d'erreurs peuvent être multiples.

En effet, d'une expérience à l'autre, le contraste de phase de l'image n'est pas le même. Dans certains cas, le profil de la cellule est difficile à discerner et il se peut que la digitalisation apporte un certain facteur d'erreur. Cette remarque s'applique également à la vue de la base de la cellule. De plus, lors de chocs hypotoniques extrêmes, la superficie de la base peut être surévaluée, si la base devient cachée par la cellule. En effet, le montage offre une vue du dessus. La base évaluée peut devenir alors très grosse par le fait qu'on ne voit pas la base de la cellule en tant que tel, mais l'ombre de la cellule sur le substrat (ce phénomène survient surtout à la fin de l'expérimentation). Il faut alors estimer la superficie et cette approximation devient erronée si la cellule a une forme irrégulière.

Il y a toujours la possibilité que l'expérimentateur procède à une mauvaise calibration des caméras, ce qui pourrait avoir pour effet de ne pas associer deux images d'une même cellule (le profil ne correspond pas à la base de la même cellule).

4.5.2. Améliorations techniques

Au niveau de l'analyse, il faut prévoir des ordinateurs offrant une grande mémoire vive. Idéalement, il faudrait prévoir 1G de RAM, afin de combler les devoirs d'imagerie nécessaires. Il faut souligner que le programme ouvre toutes les photos prises lors de l'expérience. Si une expérience a nécessité beaucoup d'images, ce qui implique que le gros de la mémoire vive a été utilisé, alors l'ordinateur sera grandement ralenti et l'analyse deviendra lente et pénible à accomplir. Une mémoire vive requise donne la possibilité de faire des tests plus exigeants en mémoire.

L'une des limitations de la méthode est que c'est un type d'imagerie en deux dimensions. Il serait préférable de pouvoir déterminer avec précision la forme tridimensionnelle de la cellule. La géométrie du gonflement serait connue et cela pourrait aider à comprendre certaines fluctuations possibles dans les résultats d'analyses. Ce serait donc un bon outil pour permettre à l'utilisateur de savoir si une erreur surviendrait à cause de sa maladresse ou simplement à cause de la géométrie de

la cellule. Nous pourrions utiliser un prisme ou un miroir spécial sur la base de l'objectif afin de pouvoir adapter un montage à ce genre de concept. Nous pourrions adopter le même genre de concept sur la vue de la base, afin de pouvoir s'assurer de la forme de la base lors de chocs extrêmes, et lorsque la vue de la base est cachée par l'ombre du bulbe sphérique de la cellule sur le point de lyser.

4.5.3. Améliorations numériques

Le programme pourrait aussi être amélioré, afin d'en réduire les limitations. Par exemple, nous digitalisons les bases et les profils en fonction de ce que nos yeux nous indiquent être les bases et les profils de la cellule dans le temps. Nous pourrions, par exemple trouver un programme qui mette en relief les différences de contrastes et de couleur pour mieux délimiter les frontières des profils et des bases et ensuite demander au programme de surligner ces frontières et de relancer le maximum de valeurs des couples de nombres caractérisant ces frontières.

Ensuite, les profils et les bases de la cellule lors du gonflement sont numérisés à la main, point par point. Il serait avantageux que la numérisation soit automatiquement programmée dans le programme avec un très grand nombre de points possibles.

CONCLUSION

Ce projet de maîtrise a été initialement conçu pour étudier les cinétiques d'augmentation de volume et les réserves membranaires des cellules eucaryotes lors de chocs hypotoniques. Les tests ont été effectués sur deux lignées de cellules épithéliales et sur deux lignées de fibroblastes. Les résultats de ce projet ont révélé des conclusions surprenantes au sujet des réserves de membranes des cellules eucaryotes.

La première étape de ce projet a consisté en l'amélioration du montage et de la chambre afin de pouvoir acquérir simultanément les images de la base et du profil de la cellule gonflant suite à un choc hypotonique. Il a fallu également écrire un programme numérique qui permette de reconstruire efficacement en trois dimensions une cellule qui gonfle à partir des photos de la base et du profil.

Grâce à cette technique, nous avons découvert que les cellules possèdent de plus grandes réserves de membranes que l'on pensait : toutes les lignées cellulaires ont pu augmenter leur volume de plus de 10 fois leur valeur initiale et leur surface de 3.5 fois leur valeur initiale. Ces grandes réserves de membranes furent notées pour les quatre lignées cellulaires utilisées, soit des cellules d'origine humaine, de souris et de hamsters. Peut-être est-ce une caractéristique de toutes les cellules animales ?

En bloquant l'exocytose, on s'est rendu compte que la plus grande partie de ces réserves sont intracellulaires, lors d'un choc hypotonique extrême. Même si la contribution majoritaire de membrane provient d'un pool intracellulaire, les réserves de membranes déjà présentes à la surface n'en sont pas moins très grandes. Lors d'un choc hypotonique modéré, on s'est rendu compte que la majorité des réserves de membranes proviennent des repliements membranaires à la surface.

Bien que plusieurs groupes aient proposé que l'accommodation d'un changement de forme ou d'un étirement membranaire provienne du recrutement de membrane suite à la fusion de vésicules à la surface, nos tests démontrent que l'utilisation des réserves sous membranaire permet à la cellule de ne pas lyser trop rapidement dans des conditions extrêmes. Mes résultats montrent que le rôle de protection contre les déformations en condition physiologique serait assuré par les réserves déjà présentes à la surface membranaire. Ainsi, ce sont les grandes réserves à la

surface membranaire qui permettraient à la cellule d'accommoder les changements de volume et de forme que provoquent la mitose, la migration cellulaire...

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts B, Bray D, Lewis K, Raff M, Roberts K & Watson J (2001). *Biologie moléculaire de la Cellule*, 3ième édition, pp. 522-524.
- Ali el Smaili. Pliage/dépliage de systèmes de Tenségrité. 2003.
www.lmgc.univ-montp2.fr/telechargements/C2_CS.pdf
- Altamirano, J., Brodwick, M. S., & Alvarez-Leefmans, F. J. (1998). Regulatory volume decrease and intracellular Ca²⁺ in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J Gen. Physiol* **112**, 145-160.
- Alvarez-Leefmans, F. J., Gamino, S. M., & Reuss, L. (1992). Cell volume changes upon sodium pump inhibition in *Helix aspersa* neurones. *J Physiol* **458**, 603-619.
- Apodaca, G. (2002). Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F179-F190.
- Aunis, D. & Bader, M. F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J Exp. Biol* **139**, 253-266.
- Bagnasco, S., Balaban, R., Fales, H. M., Yang, Y. M., & Burg, M. (1986). Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *J Biol Chem.* **261**, 5872-5877.
- Banes, A. J., Tsuzaki, M., Yamamoto, J., Fischer, T., Brigman, B., Brown, T., & Miller, L. (1999). Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem. Cell Biol* **73**, 349-365.
- Belousov, L. V., Dorfman, J. G., & Cherdantzev, V. G. (1975). Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos. *J Embryol. Exp. Morphol.* **34**, 559-574.
- Belousov, L. V., Kazakova, N. I., Luchinskaia, N. N., & Novoselov, V. V. (1999). Studies in developmental cytomechanic. *Int J Dev. Biol* **41**, 793-799.
- Benchimol, R. La lipotomie. Actualités IMAAGE , 1-5. 1999.

- Berdiev, B. K., Prat, A. G., Cantiello, H. F., Ausiello, D. A., Fuller, C. M., Jovov, B., Benos, D. J., & Ismailov, I. I. (1999). Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments. *J Biol Chem.* **271**, 17704-17710.
- Bibby, K. J. & McCulloch, C. A. (1999). Regulation of cell volume and $[Ca^{2+}]_i$ in attached human fibroblasts responding to anisosmotic buffers. *Am J Physiol* **266**, C1639-C1649.
- Boal, D. (2003). *Mechanics of the cell*, Cambridge university press ed., pp. 274-340.
- Bohnel, H. & Gessler, F. (2005). Botulinum toxins--cause of botulism and systemic diseases? *Vet.Res Commun.* **29**, 313-345.
- Boillot, A. L'hyperosmolarité. Caps, T. Services d'anesthésie et de reanimation chirurgicale , 1-18. 1999. Blasco, G. and Grelier, R.
Ref Type: Generic
- Boudreault, F. & Grygorczyk, R. (2004). Evaluation of rapid volume changes of substrate-adherent cells by conventional microscopy 3D imaging. *J Microsc.* **215**, 302-312.
- Boudreault, F. & Grygorczyk, R. (2004). Cell swelling-induced ATP release is tightly dependent on intracellular calcium elevations
1. *J Physiol* **561**, 499-513.
- Burwen, S. J. & Satir, B. H. (1977). Plasma membrane folds on the mast cell surface and their relationship to secretory activity. *J Cell Biol* **74**, 690-697.
- Canadas Patrick. Modèle de tenségrité viscoélastique pour l'étude de la réponse dynamique des cellules adhérentes. 50-60. 2003.
- Canadas, P., Wendling-Mansuy, S., & Isabey, D. (2006). Frequency response of a viscoelastic tensegrity model: structural rearrangement contribution to cell dynamics. *J Biomech.Eng* **128**, 487-495.
- Cantiello, H. F. (1997). Role of actin filament organization in cell volume and ion channel regulation. *J Exp.Zool.* **279**, 425-435.

Cemerikic, D. & Sackin, H. (1993). Substrate activation of mechanosensitive, whole cell currents in renal proximal tubule
3. *Am J Physiol* **264**, F697-F714.

Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., & Gruenert, D. C. (1994). CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells. *Am J Respir. Cell Mol. Biol* **10**, 38-47.

Cunningham, C. C. (1995). Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J Cell Biol* **129**, 1589-1599.

Cutillas, P. R., Biber, J., Marks, J., Jacob, R., Stieger, B., Cramer, R., Waterfield, M., Burlingame, A. L., & Unwin, R. J. (2005). Proteomic analysis of plasma membrane vesicles isolated from the rat renal cortex. *Proteomics*. **5**, 101-112.

Dai, J. & Sheetz, M. P. (1999). Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophys. J* **77**, 3363-3370.

Dulhunty, A. F. & Franzini-Armstrong, C. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *J Physiol* **250**, 513-539.

Duman, J. G. & Forte, J. G. (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion?
1. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C237-C249.

Ebner, H. L., Cordas, A., Pafundo, D. E., Schwarzbaum, P. J., Pelster, B., & Krumschnabel, G. (2005). Importance of cytoskeletal elements in volume regulatory responses of trout hepatocytes. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **289**, R877-R890.

Eils, R., Bertin, E., Saracoglu, K., Rinke, B., Schrock, E., Parazza, F., Usson, Y., Robert-Nicoud, M., Stelzer, E. H., Chassery, J. M., & . (1995). Application of confocal laser microscopy and three-dimensional Voronoi diagrams for volume and surface estimates of interphase chromosomes. *J Microsc.* **177 (Pt 2)**, 150-161.

Elbaum, M., Chausovsky, A., Levy, E. T., Shtutman, M., & Bershadsky, A. D. (1999). Microtubule involvement in regulating cell contractility and adhesion-dependent

signalling: a possible mechanism for polarization of cell motility. *Biochem.Soc.Symp.* **65**, 147-172.

Evans E. Composite membranes and structured interfaces: from simple to complex designs in biology. 81-101. 1992.

Evans, E. A. & Skalak, R. (1979). Mechanics and thermodynamics of biomembranes: part 2. *CRC Crit Rev Bioeng.* **3**, 331-418.

Evans, E. A. & Skalak, R. (1979). Mechanics and thermodynamics of biomembranes: part 1. *CRC Crit Rev Bioeng.* **3**, 181-330.

Farinas, J., Kneen, M., Moore, M., & Verkman, A. S. (1997). Plasma membrane water permeability of cultured cells and epithelia measured by light microscopy with spatial filtering. *J Gen.Physiol* **110**, 283-296.

Fisher, J. L., Levitan, I., & Margulies, S. S. (2004). Plasma membrane surface increases with tonic stretch of alveolar epithelial cells. *Am J Respir. Cell Mol.Biol* **31**, 200-208.

Garcia-Romeu, F., Borgese, F., Guizouarn, H., Fievet, B., & Motais, R. (1996). A role for the anion exchanger AE1 (band 3 protein) in cell volume regulation. *Cell Mol.Biol (Noisy.-le-grand)* **42**, 985-994.

Giocondi, M. C., Milhiet, P. E., Lesniewska, E., & Le Grimellec, C. (2003). [Atomic force microscopy: from cellular imaging to molecular manipulation]. *Med.Sci (Paris)* **19**, 92-99.

Graf, J., Rupnik, M., Zupancic, G., & Zorec, R. (1995). Osmotic swelling of hepatocytes increases membrane conductance but not membrane capacitance
1. *Biophys.J* **68**, 1359-1363.

Greer, M. A., Greer, S. E., & Maruta, S. (1990). Hyposmolar stimulation of secretion of thyrotropin, prolactin, and luteinizing hormone does not require extracellular calcium and is not inhibited by colchicine, cytochalasin B, ouabain, or tetrodotoxin. *Proc Soc.Exp.Biol Med.* **193**, 203-209.

Hamill, O. P. & Martinac, B. (2001). Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev* **81**, 685-740.

Hansma, P. K., Drake, B., Marti, O., Gould, S. A., & Prater, C. B. (1989). The scanning ion-conductance microscope. *Science* **243**, 641-643.

Harter, C. & Wieland, F. (1996). The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochim.Biophys.Acta* **1286**, 75-93.

Herant, M., Heinrich, V., & Dembo, M. (2005). Mechanics of neutrophil phagocytosis: behavior of the cortical tension. *J Cell Sci* **118**, 1789-1797.

Hill, A. E., Shachar-Hill, B., & Shachar-Hill, Y. (2004). What are aquaporins for? *J Membr.Biol* **197**, 1-32.

Hoffman E.K. & Dunham PB (1995). Membrane mechanisms and intracellular signaling in cell volume regulation. *Int.Rev.Cytol.* **161**, 173-262.

Hoffman, E. K. (2000). Intracellular signaling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol.Biochem.* **10**, 273-288.

Houtsmuller, A. B. (2005). Fluorescence recovery after photobleaching: application to nuclear proteins. *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* **95**, 177-199.

Huc, N. Modèle pour l'étude du rôle de la membrane dans la déformation cellulaire: application à la spinogénèse. 2004.

Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N. J., & Poulain, B. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* **82**, 427-446.

Ingber, D. E. (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci* **104 (Pt 3)**, 613-627.

Ingber, D. E. (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* **116**, 1157-1173.

Kirk, K. (1991). The effect of N-ethylmaleimide on K⁺ and Cl⁻ transport pathways in the lamprey erythrocyte membrane: activation of K⁺/Cl⁻ cotransport. *J Exp.Biol* **159**, 325-334.

Korchev, Y. E., Gorelik, J., Lab, M. J., Sviderskaya, E. V., Johnston, C. L., Coombes, C. R., Vodyanoy, I., & Edwards, C. R. (2000). Cell volume measurement using scanning ion conductance microscopy. *Biophys.J* **78**, 451-457.

Kubinova, L., Janacek, J., Guilak, F., & Opatrny, Z. (1999). Comparison of several digital and stereological methods for estimating surface area and volume of cells studied by confocal microscopy. *Cytometry* **36**, 85-95.

Kunz, L. & Stark, G. (1997). Photodynamic membrane damage at the level of single ion channels. *Biochim.Biophys.Acta* **1327**, 1-4.

Kusumi, A. & Suzuki, K. (2005). Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim.Biophys.Acta* **1746**, 234-251.

Lal, R. (1996). Imaging molecular structure of channels and receptors with an atomic force microscope. *Scanning Microsc.Suppl* **10**, 81-95.

Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., & Haussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* **78**, 247-306.

Laurent, V. Apports en mécanique cellulaire de la macromanipulation par magnétocytométrie et par micropipette: application à l'étude de la cellule épithéliale dans son microenvironnement. 2000.

Light, D. B., Attwood, A. J., Siegel, C., & Baumann, N. L. (2003). Cell swelling increases intracellular calcium in *Necturus erythrocytes*. *J Cell Sci* **116**, 101-109.

Linshaw, M. A., Fogel, C. A., Downey, G. P., Koo, E. W., & Gotlieb, A. I. (1992). Role of cytoskeleton in volume regulation of rabbit proximal tubule in dilute medium. *Am J Physiol* **262**, F144-F150.

Luna, E. J. & Hitt, A. L. (1992). Cytoskeleton--plasma membrane interactions. *Science* **258**, 955-964.

Matsudaira, P. (1991). Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem.Sci* **16**, 87-92.

Matsushita, K., Morrell, C. N., & Lowenstein, C. J. (2005). A novel class of fusion polypeptides inhibits exocytosis. *Mol.Pharmacol* **67**, 1137-1144.

Mayer, A. (1999). Intracellular membrane fusion: SNAREs only? *Curr.Opin.Cell Biol* **11**, 447-452.

McManus, M., Fischbarg, J., Sun, A., Hebert, S., & Strange, K. (1993). Laser light-scattering system for studying cell volume regulation and membrane transport processes. *Am J Physiol* **265**, C562-C570.

McManus, M. L., Churchwell, K. B., & Strange, K. (1995). Regulation of cell volume in health and disease
1. *N.Engl.J Med.* **333**, 1260-1266.

McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T. H., & Rothman, J. E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153-159.

Melcion J.P. (2000). La granulométrie de l'aliment: principe, mesure et obtention. *INRA prod.Anim.* **13**, 97.

Mermelstein, C. S., Rebello, M. I., Amaral, L. M., & Costa, M. L. (2003). Changes in cell shape, cytoskeletal proteins and adhesion sites of cultured cells after extracellular Ca²⁺ chelation. *Braz.J Med.Biol Res* **36**, 1111-1116.

Mijailovich, S. M., Kojic, M., Zivkovic, M., Fabry, B., & Fredberg, J. J. (2002). A finite element model of cell deformation during magnetic bead twisting. *J Appl.Physiol* **93**, 1429-1436.

Mills, J. W., Schwiebert, E. M., & Stanton, B. A. (1994). The cytoskeleton and membrane transport. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* **3**, 529-534.

Mills, L. R. & Morris, C. E. (1998). Neuronal plasma membrane dynamics evoked by osmomechanical perturbations. *J Membr.Biol* **166**, 223-235.

Mongin, A. A. & Orlov, S. N. (2001). Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor
1. *Pathophysiology.* **8**, 77-88.

Morris, C. E. & Homann, U. (2001). Cell surface area regulation and membrane tension. *J Membr. Biol* **179**, 79-102.

Morrow, J. S., Cianci, C. D., Ardito, T., Mann, A. S., & Kashgarian, M. (1989). Ankyrin links fodrin to the alpha subunit of Na,K-ATPase in Madin-Darby canine kidney cells and in intact renal tubule cells. *J Cell Biol* **108**, 455-465.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N., & Maxfield, F. R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* **77**, 759-803.

Nichol, J. A. & Hutter, O. F. (1996). Tensile strength and dilatational elasticity of giant sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle
2. *J Physiol* **493** (Pt 1), 187-198.

Nineb, S., Alart, P., & Dureisseix, D. Approche multi-échelles des systèmes de tenségrité. 2004. *Laboratoire de Mécanique et Génie Civil*.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Nunes-Correia, I., Nir, S., & Pedroso de Lima, M. C. (2003). Kinetics of influenza virus fusion with the endosomal and plasma membranes of cultured cells. Effect of temperature. *J Membr. Biol* **195**, 21-26.

Okada, Y. (1997). Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol* **273**, C755-C789.

Olson, J. E. & Li, G. Z. (1997). Increased potassium, chloride, and taurine conductances in astrocytes during hypoosmotic swelling
3. *Glia* **20**, 254-261.

Ordaz, B., Tuz, K., Ochoa, L. D., Lezama, R., Pena-Segura, C., & Franco, R. (2004). Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease. *Neurochem. Res* **29**, 65-72.

Papakonstanti, E. A., Vardaki, E. A., & Stournaras, C. (2000). Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem.* **10**, 257-264.

Pedersen, S. F., Hoffmann, E. K., & Mills, J. W. (2001). The cytoskeleton and cell volume regulation. *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* **130**, 385-399.

Rauch, C. & Farge, E. Rôle de l'élasticité des membranes dans la régulation de l'expression génétique. 2000.

Raucher, D. & Sheetz, M. P. (1999). Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys.J* 77, 1992-2002.

Renstrom, E., Eliasson, L., Bokvist, K., & Rorsman, P. (1996). Cooling inhibits exocytosis in single mouse pancreatic B-cells by suppression of granule mobilization. *J Physiol* 494 (Pt 1), 41-52.

Rex L.Jamison (1974). The role of cellular swelling in the pathogenesis of organ ischemia. *the western journal of medicine* 120, 218.

Ross, P. E., Garber, S. S., & Cahalan, M. D. (1994). Membrane chloride conductance and capacitance in Jurkat T lymphocytes during osmotic swelling
1. *Biophys.J* 66, 169-178.

Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.

Sarkadi, B. & Parker, J. C. (1991). Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim.Biophys.Acta* 1071, 407-427.

Sato, N., Wang, X. B., & Greer, M. A. (1991). Hormone secretion stimulated by ethanol-induced cell swelling in normal rat adenohypophysial cells. *Am J Physiol* 260, E946-E950.

Satoh, H., Delbridge, L. M., Blatter, L. A., & Bers, D. M. (1996). Surface:volume relationship in cardiac myocytes studied with confocal microscopy and membrane capacitance measurements: species-dependence and developmental effects. *Biophys.J* 70, 1494-1504.

Sauvaget, T. Modélisation et simulation 3D des interactions cellules/matrice. 2001. *Université Joseph Fourier*.

Seagar M., Quetglas S., Iborras C., & Lévêque C. (2001). Le complexe SNARE au cœur de la fusion membranaire. *médecine/sciences* 17, 674.

Sens, P. & Turner, M. S. (2006). Budded membrane microdomains as tension regulators. *Phys.Rev E.Stat.Nonlin.Soft.Matter Phys.* **73**, 031918.

Sheetz, M. P. (2001). Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat.Rev Mol.Cell Biol* **2**, 392-396.

Shin, W. & Gillis, K. D. (2006). Measurement of Changes in Membrane Surface Morphology Associated with Exocytosis Using Scanning Ion Conductance Microscopy. *Biophys.J.*

Shope, J. C., DeWald, D. B., & Mott, K. A. (2003). Changes in surface area of intact guard cells are correlated with membrane internalization
1. *Plant Physiol* **133**, 1314-1321.

Snyder, D. A., Kelly, M. L., & Woodbury, D. J. (2006). SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell Biochem.Biophys.* **45**, 111-123.

Strange, K., Emma, F., Paredes, A., & Morrison, R. (1994). Osmoregulatory changes in myo-inositol content and Na⁺/myo-inositol cotransport in rat cortical astrocytes. *Glia* **12**, 35-43.

Strange, K. (2004). Cellular volume homeostasis. *Adv.Physiol Educ.* **28**, 155-159.

Strbak, V. & Greer, M. A. (2000). Regulation of hormone secretion by acute cell volume changes: Ca(2⁺)-independent hormone secretion. *Cell Physiol Biochem.* **10**, 393-402.

Tait, J. F. & Frieden, C. (1982). Chemical modification of actin. Acceleration of polymerization and reduction of network formation by reaction with N-ethylmaleimide, (iodoacetamido)tetramethylrhodamine, or 7-chloro-4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole. *Biochemistry* **21**, 6046-6053.

Thomas Sollner, Sidney W.Whiteheart, Michael Brunner, Hediye Erdjument-Bromage, Scott Geromanos, Paul Tempst, & James E.Rothman (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.

Tilly, B. C., Gaestel, M., Engel, K., Edixhoven, M. J., & de Jonge, H. R. (1999). Hypo-osmotic cell swelling activates the p38 MAP kinase signalling cascade. *FEBS Lett.* **395**, 133-136.

van der, W. T., Tomassen, S. F., Houtsmuller, A. B., de Jonge, H. R., & Tilly, B. C. (2003). Increased vesicle recycling in response to osmotic cell swelling. Cause and consequence of hypotonicity-provoked ATP release. *J Biol Chem.* **278**, 40020-40025.

Vizi, E. S. (1998). Different temperature dependence of carrier-mediated (cytoplasmic) and stimulus-evoked (exocytotic) release of transmitter: a simple method to separate the two types of release. *Neurochem.Int* **33**, 359-366.

Wan, X., Harris, J. A., & Morris, C. E. (1995). Responses of neurons to extreme osmomechanical stress
1. *J Membr.Biol* **145**, 21-31.

Waters, C. M., Sporn, P. H., Liu, M., & Fredberg, J. J. (2002). Cellular biomechanics in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **283**, L503-L509.

Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H., & Rothman, J. E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772.

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H., Kinne-Saffran, E., & Kinne, R. K. (2003). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev Physiol Biochem.Pharmacol* **148**, 1-80.

White, S. R., Williams, P., Wojcik, K. R., Sun, S., Hiemstra, P. S., Rabe, K. F., & Dorscheid, D. R. (2001). Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells. *Am J Respir.Cell Mol.Biol* **24**, 282-294.

Wolfram Antonin, Dirk Fasshauer, Stefan Becker, Reinhard Jahn, & Thomas R.Schneider (2002). Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *nature structural biology* **9**, 107-111.

Zhang, Y. & Hamill, O. P. (2000). On the discrepancy between whole-cell and membrane patch mechanosensitivity in *Xenopus* oocytes
2. *J Physiol* **523 Pt 1**, 101-115.

Zhang, Z. & Bourque, C. W. (2003). Osmometry in osmosensory neurons
1. *Nat.Neurosci.* **6**, 1021-1022.

ANNEXE

Calculs figure 9

1. On veut savoir comment trouver les différentes contributions à la surface.

$$\text{Or, } S_{\max} = S_0 + S_{\text{endo}} + S_{\text{surface}} + S_{\text{stretch}}$$

Comme nous considérons que les changements de volume dus aux variations de formes se font à surface constante, alors il nous considérerons qu'il n'y a pas de variation de surface due à des changements de forme de la cellule.

Puisque nous mesurons S_{\max} , S_0 , S_{endo} , il ne reste plus qu'à calculer S_{stretch} , et en déduire S_{surface} .

Or, nous savons que l'augmentation de surface due à l'étirement ne contribue qu'à 3% de l'augmentation totale

$$\text{Donc, } S_{\text{stretch}} = 0.03 \times S_{\max}$$

$$\text{Finalement, } S_{\text{surface}} = S_{\max} - S_0 - S_{\text{endo}} - S_{\text{stretch}}$$

2. On veut savoir comment trouver les différentes contributions du volume.

$$\text{Or, } V_{\max} = V_0 + V_{\text{endo}} + V_{\text{surface}} + V_{\text{stretch}} + V_{\text{shape}}$$

Puisque nous mesurons V_{\max} , V_0 , V_{endo} , il ne reste plus qu'à calculer V_{stretch} , et V_{shape} pour enfin déduire V_{surface} .

Calcul de V_{shape} :

Il faut premièrement assumer que les changements importants de formes ont lieu au début de l'expérience. Il suffit d'estimer que si la cellule à $t = 0s$ n'avait pas sa forme réelle, mais plutôt la forme finale (sphère), de combien le volume initial sphérique serait-il différent du volume initial réel (à surface constante)?

Or, si nous nous référons à la figure 2 de l'article, nous avons mesuré S_0 des A549 :

$$S_0 = 1973.75 \mu\text{m}^2$$

Si nous considérons la cellule sphérique,

$$S_0 = 4 \pi r_{sp}^2$$

Où r_{sp} = rayon de la sphère hypothétique

$$\text{Donc, } r_{sp} = (S_0 / (4 \pi))^{1/2} = 12.53 \mu\text{m}$$

$$\text{Ainsi, } V_{sp} = 4/3 \pi r_{sp}^3 = 4/3 \pi (S_0/4 \pi)^{3/2}$$

Où V_{sp} = volume hypothétique de la cellule initiale sphérique

Par exemple, d'après la figure 2 de l'article, on a un volume initial de la cellule de 2.36pL

$$\text{Donc, } V_0 = 2360 \mu\text{m}^3.$$

$$\text{N.B. : } 1\text{m}^3 = 1000 \text{ L}$$

$$\text{Ainsi, } V_{sp}/V_0 = 3.5$$

On a une augmentation de volume due aux variations de formes proche de 3.5 fois le volume initial, ce qui correspond à environ 250% d'augmentation.

Calcul de $V_{stretch}$:

On veut connaître la contribution de l'étirement à l'augmentation de volume total.

À la fin de l'expérience, on sait que la cellule augmente sa surface de 3.8 fois sa surface initiale (section 3-4).

$$S_{\max} = 3.8 \times S_0 = 3.8 \times 1973.75 \mu\text{m}^2 = 7500.25 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Donc, } r_{\max} = (S_{\max} / (4 \pi))^{1/2} = 24.4 \mu\text{m}$$

$$\text{Et, } V_{\max} = 4/3 \pi r_{\max}^3 = 4/3 \pi (S_{\max} / (4 \pi))^{3/2} = 60818.80 \mu\text{m}^3$$

Il faut considérer que la contribution de l'étirement est ajoutée à la fin du choc hypotonique à 98%.

Comme l'étirement ne contribue qu'à 3% de l'augmentation totale, on a qu'à calculer le volume de la cellule sphérique si l'étirement n'avait pas eu lieu (max-stretch):

$$S_{\max\text{-stretch}} = 97\% \times S_{\max} = 0.97 \times 7500.25 = 7275.2 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Ce qui donne } r_{\max\text{-stretch}} = (S_{\max\text{-stretch}} / (4 \pi))^{1/2} = 24.1 \mu\text{m}$$

$$\text{Et } V_{\max\text{-stretch}} = 4/3 \pi r_{\max\text{-stretch}}^3 = 4/3 \pi (S_{\max\text{-stretch}} / (4 \pi))^{3/2} = 58602.95 \mu\text{m}^3$$

On peut maintenant trouver la variation de volume

$$\Delta V = V_{\max} - V_{\max\text{-stretch}} = 2215.85 \mu\text{m}^3 \approx 2.2\text{pL} \approx 2.36\text{pL} \approx V_0$$

La contribution de l'étirement à l'augmentation totale de volume correspond environ à la valeur du volume initial. Ce qui donne 100% d'augmentation.

Il ne reste qu'à calculer V_{surface} .

$$\text{Or, } V_{\text{surface}} = V_{\max} - V_0 - V_{\text{endo}} - V_{\text{stretch}} - V_{\text{shape}} = 1290\% - 100\% - 625\% - 100\% - 250\%$$

$$V_{\text{surface}} = 215\%$$

PROGRAMME DISUR

1) Analyse des images

Il faut faire quelques hypothèses afin de pouvoir reconstruire les images.

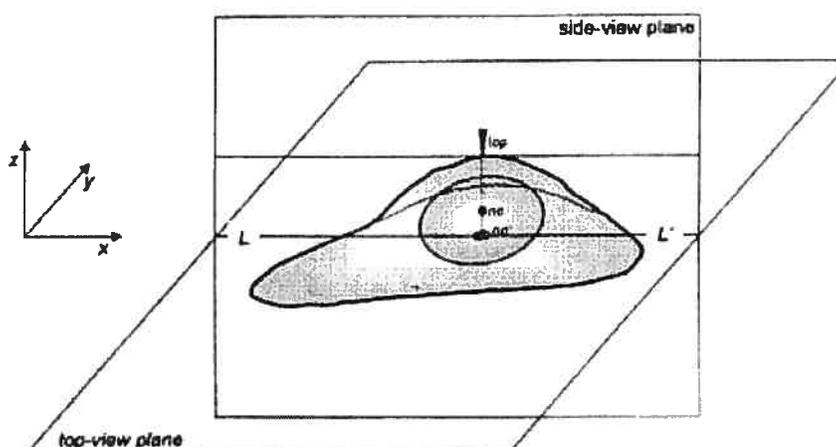


Figure A : vue 3D des deux plans d'une cellule adhérente (Boudreault & Grygorczyk, 2004).

Hypothèse 1 : parce que le noyau est très volumineux chez les cellules adhérentes à un substrat, on assume que le sommet sera centré au-dessus du noyau (nc). Une cellule dont la forme ressemblerait à un œuf cuit miroir peut être reconstruite si l'on utilise une photo de sa base et de son profil. Les plans correspondant aux images de la base et du profil sont ainsi perpendiculaire et se croisent à la ligne LL'.

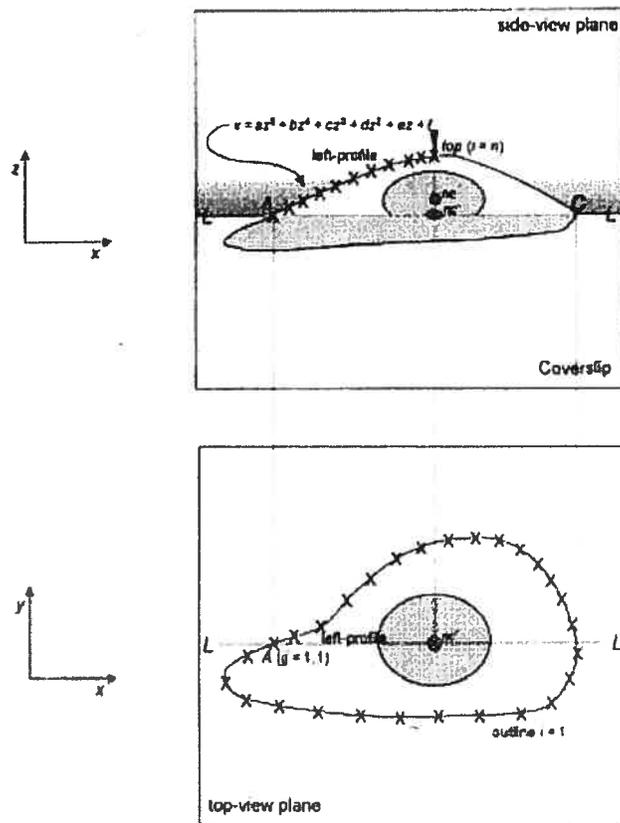


Figure B et C : corrélation entre les images de la base et du profil (Boudreault & Grygorczyk, 2004).

Hypothèse 2 : on suppose que la ligne LL' passe par le point nc' (projection du centre du noyau nc) et croise la base du profile cellulaire aux points A et C. En fait, en s'aidant de l'image de la base, on peut trouver la surface du substrat, qui correspond à la ligne LL'. Avec l'image de la base, il est facile de retrouver la ligne LL', car elle est horizontale et passe par le point nc' (figure C) et par les points A et C (figure B et C).

2) Numérisation du profile

Un axe vertical passe par le point nc (figure B) et divise le profile cellulaire en deux moitiés. Nous assumons que les deux profiles sont symétriques. Ainsi, afin d'éviter de

numériser inutilement trop de points de l'image, nous ne numérisons que le profil gauche de l'image. C'est-à-dire le profil entre la ligne LL' et le sommet (figures A, B). La numérisation du profil se fait manuellement avec MatLab. On a par la suite établi un fit de ce profil en utilisant un programme MatLab qui trouve les meilleurs paramètres de lissage en utilisant la méthode des moindres carrés. L'équation résultante est utilisée pour générer un nombre n de points également espacés sur l'axe z . Ces points forment un groupe de tranches cellulaires.

3) Numérisation de la base

La base cellulaire est numérisée de la même façon : on utilise l'image de la base pour numériser manuellement m point de cette base. Ces valeurs n'ont toutefois pas été lissées.

4) Développement des tranches cellulaires

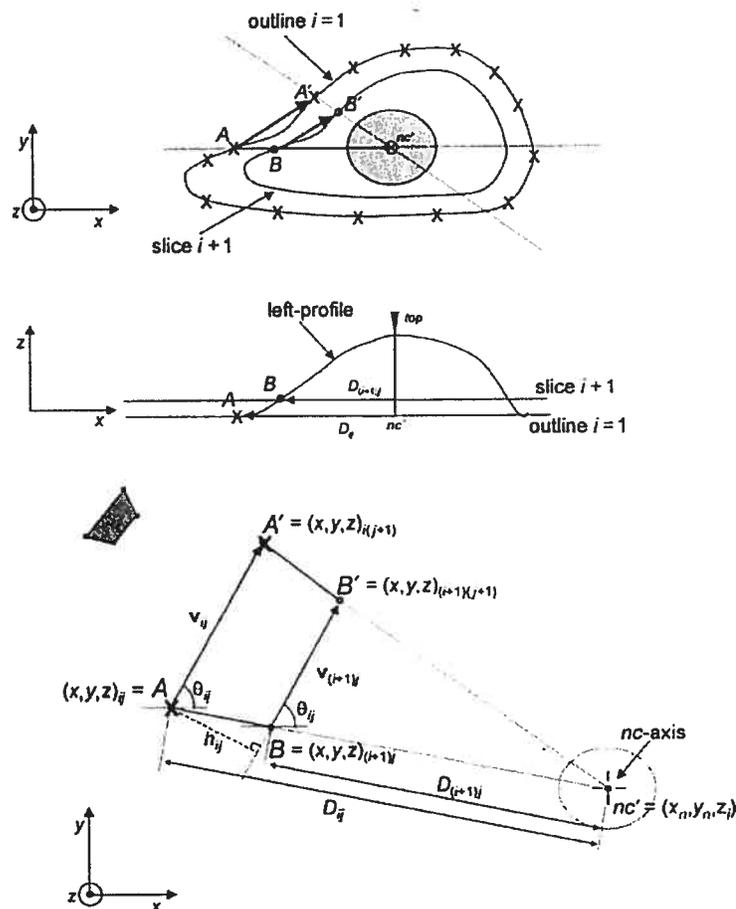


Figure D : génération des tranches numériques de cellules (Boudreault & Grygorczyk, 2004).

Le profile et la base de la cellule sont maintenant numérisés. Toute la gamme des $n - 1$ tranches cellulaires ont été générées avec la base en tant que référence. Le but de cette étape est de générer des tranches qui correspondent aux coupes transversales du plan de la membrane plasmique le long de l'axe des z .

Les coordonnées initiales de chaque tranche sont définies par un point déjà digitalisé par le profil numérisé, ainsi, nous avons $m-1$ points extrapolés à partir des coordonnées de ce point initial. Il devient ainsi possible de compléter la tranche cellulaire.

Regardons la génération du premier point B' de la tranche $(i + 1)$. Sa position est déterminée par une méthode utilisant deux vecteurs parallèles (figure D). La première figure de la figure D montre un vecteur défini par deux points adjacents $A - A'$ de la base numérisés. Ce vecteur sert de référence au vecteur défini par les points adjacents $B - B'$ de la tranche $(i - 1)$. Les coordonnées du point B sont connues, car ils viennent des points du profile numérisé, mais sa norme et son orientation ne sont pas connus. Il faut faire deux hypothèses pour les connaître :

Hypothèse 3 : d'un point de vue macroscopique, la surface cellulaire est lisse et continue. Les vecteurs AA' et BB' sont parallèles.

Hypothèse 4 : le vecteur BB' ($v_{(i+1)j}$) est proportionnel en norme au vecteur AA' (v_{ij}) en tenant compte de la distance du vecteur v_{ij} à l'axe passant par nc (2^e figure de la figure D). Cette distance sera appelée la distance D (distance entre la fin des vecteurs, soit le point A ou le point B , et l'axe passant par nc).

Chaque vecteur correspond au côté oblique d'un triangle. L'un ayant pour sommet les points B , B' et nc' et compris à l'intérieur d'un triangle défini par A , A' et nc' (voir dernière figure de la figure D). Si l'on tient compte de la géométrie du système, on peut définir le ration d'amplitude v_{ij} sur $v_{(i+1)j}$, qui est proportionnel au ratio des longueurs D_{ij} et $D_{(i+1)j}$:

$$|v_{ij}| / |v_{(i+1)j}| = D_{ij} / D_{(i+1)j} \quad (1)$$

On peut donc trouver la norme du vecteur **BB'** ou $v_{(i+1)j}$ à partir de l'équation (1). Ce processus est répété $m-1$ fois pour compléter la nouvelle tranche.

5) Évaluation des paramètres *SURFACE*, *VOLUME* et *HAUTEUR* de la cellule à partir du modèle

HAUTEUR : La hauteur de la cellule correspond à l'axe des z (sommet de la cellule), qui est évalué à partir de l'image du profile de la cellule.

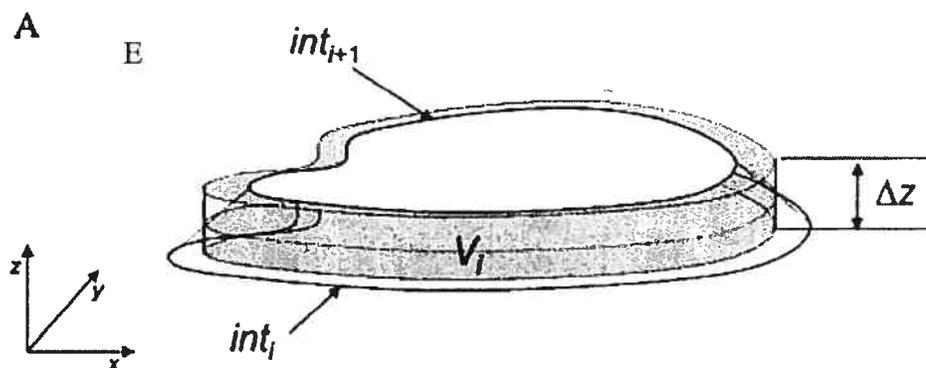


Figure E : approximation cylindrique permettant d'évaluer une unité de volume (Boudreault & Grygorczyk, 2004).

VOLUME : le volume de la cellule est approximé par la somme des $n-1$ éléments de volumes V_i (figure E). Chaque élément de volume V_i est une approximation de l'espace entre deux plans adjacents et la frontière formée par la surface cellulaire. Le volume est généré en remplaçant par un cylindre de hauteur Δz la surface moyenne des deux coupe transversales int_i et int_{i+1} (figure E) en admettant que Δz est très petit. On peut en déduire le système d'équations suivant qui nous permettra de calculer le volume :

$$int_i = \sum_{j=1}^m (x_{i(j+1)} - x_{ij})(y_{ij} + y_{i(j+1)})/2 \quad (2)$$

$$V_i = \Delta z(int_i + int_{i+1})/2 \quad (3)$$

$$V = \sum_{i=1}^{n-1} V_i \quad (4)$$

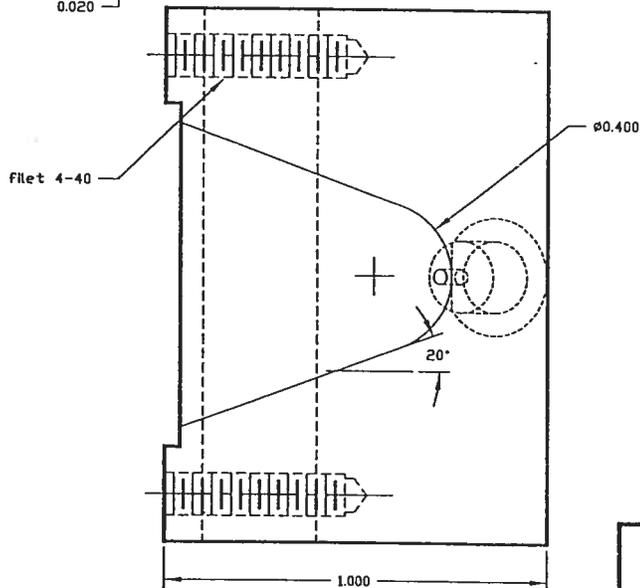
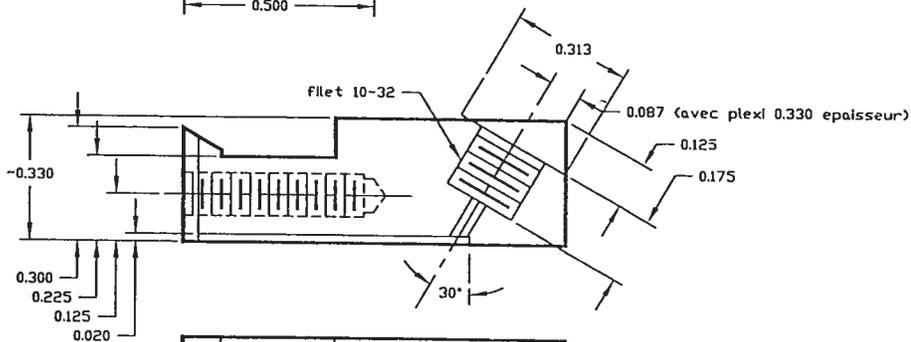
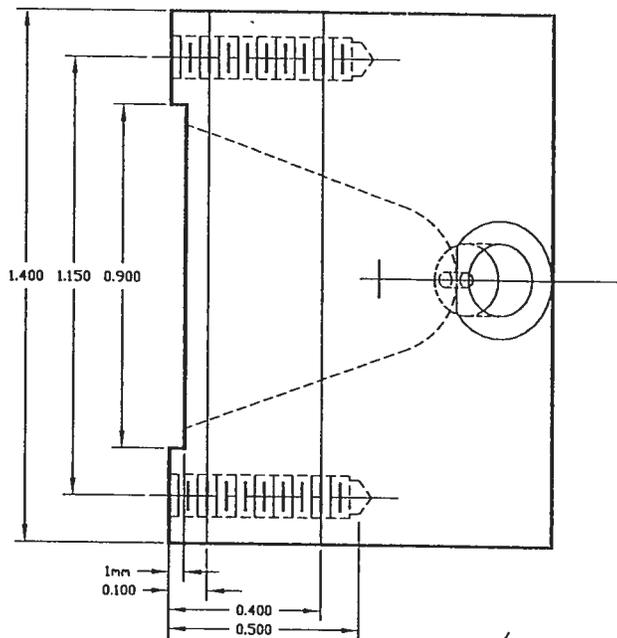
SURFACE : la surface cellulaire a été évaluée en tenant compte du fait que les vecteurs v_{ij} et $v_{(i+1)j}$ sont les bases respectives de trapézoïdes (voir 2^e figure de la figure D). La surface S_{ij} d'une trapézoïde est le résultat de l'équation (5) :

$$S_{ij} = h_{ij}(|v_{ij}| + |v_{(i+1)j}|)/2 \quad (5)$$

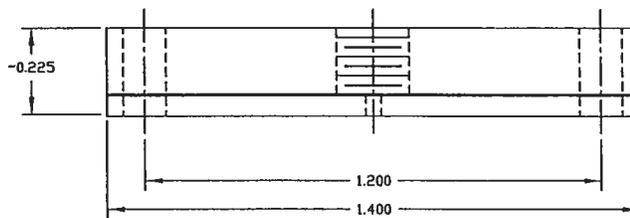
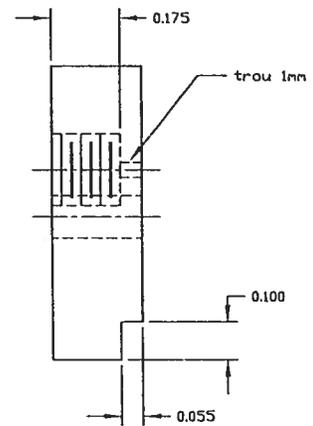
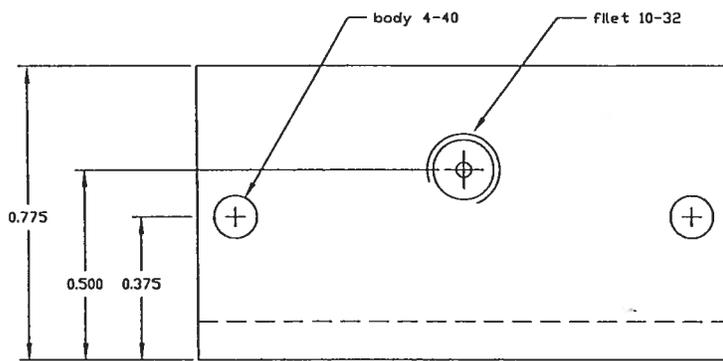
Ainsi, la surface totale de la cellule correspond à une addition infinie d'unité de surfaces trapézoïdales plus la surface de la base de la cellule attachée à la lamelle *int1* :

$$S_{\text{exact}} = int_1 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1}^m S_{ij} \quad (6)$$

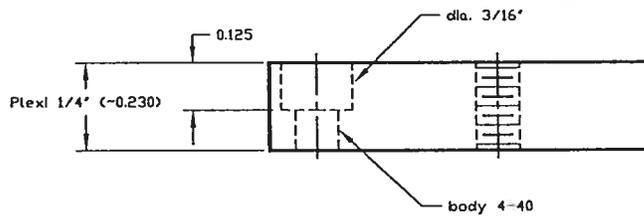
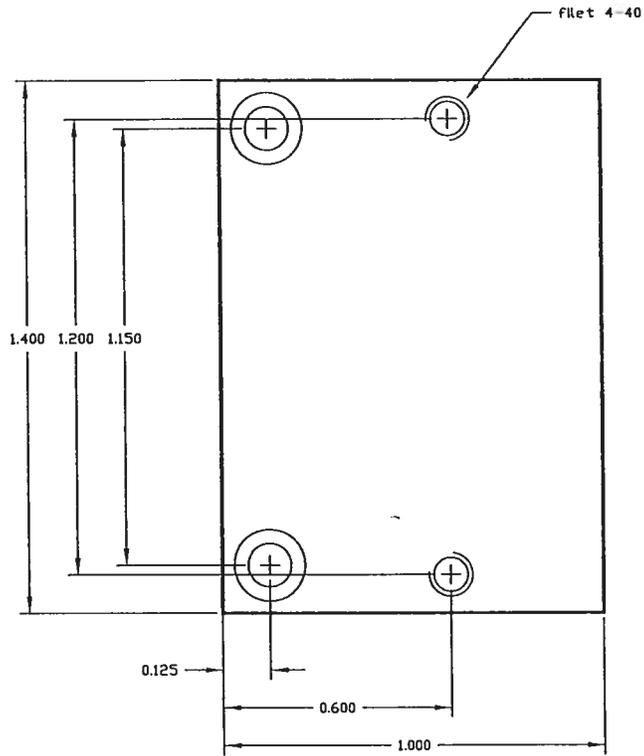
Plans techniques de la chambre



<h1>GEPROM</h1>	
Chamber base	
File: base.dwg	
Scale: 2x	Rev.: 1.0
M. Brunette	Date:



<h1>GEPROM</h1>	
Chamber cover	
File: cover.dwg	
Scale: 2x	Rev.: 1.0
M. Brunette	Date:



<h1>GEPROM</h1>	
Chamber wall	
File: wall.dwg	
Scale: 2x	Rev.: 1.0
M. Brunette	Date: