

# Propagation acoustique GHz dans le noyau de cellules biologiques : analogie avec les réseaux fibrés

T. DEHOUX<sup>a</sup>, O. F. ZOUANI<sup>b</sup>, M.-C. DURRIEU<sup>b</sup> et B. AUDOIN<sup>a</sup>

a. Univ. Bordeaux, I2M, UMR CNRS 5295, F-33400 Talence, France

b. Univ. Bordeaux, CBMN, UMR CNRS 5248, F-33607 Pessac, France

## Résumé :

*Nous utilisons la technique d'acoustique picoseconde pour sonder les propriétés mécaniques de cellules individuelles. Nous décrivons d'abord l'application à la paroi de cellules végétales dont la structure bien documentée nous sert de modèle pour comprendre la propagation acoustique GHz dans les réseaux biologiques fibreux. La comparaison avec un modèle d'homogénéisation révèle l'influence des liaisons d'hémicellulose, conduisant à un comportement iso-déformation où le réseau élastique de fibres de cellulose domine la réponse acoustique GHz. Nous étudions ensuite des cellules animales, et nous analysons les résultats par analogie avec ceux obtenus dans les cellules végétales. Un comportement iso-déformation est également identifié, cette fois-ci attribué à la présence de friction entre le réseau de fibres de chromatine et le liquide intra-nucléaire. Ces résultats offrent une meilleure compréhension des propriétés mécaniques du noyau, et permettront d'étudier la dynamique du réseau de chromatine pendant des processus cellulaires tels que la différenciation ou la morphogénèse.*

## Abstract :

*We use picosecond ultrasonics to probe the mechanical properties of single cells. We first describe the application to the wall of vegetal cells that serves as a model to understand the propagation of GHz acoustic waves in fibrous biological networks. Comparison with homogenization theories reveals the influence of hemicelluloses that yield an isostrain behavior where the elastic network formed by the cellulose fibers dominates the acoustic response. We then study animal cells, and we analyze our results by analogy with those obtained in vegetal cells. We also observe an isostrain behavior that we attribute to the presence of friction between the elastic network of chromatin fibres and the intra-nuclear fluid. These results complement our knowledge of the mechanical properties of the nucleus, and should allow investigating network-dynamics during various biological processes, such as differentiation or morphogenesis.*

**Mots clefs : acoustique picoseconde ; biologie cellulaire**

## 1 Introduction

La rigidité des cellules est un paramètre clef pour de nombreux processus biologiques fondamentaux, de la mécano-transduction[1] à la progression de maladies dégénératives.[2] Les techniques permettant de

sonder les propriétés mécaniques à l'échelle sub-cellulaire utilisent des sondes au contact, comme par exemple la microscopie à force atomique[3] ou les micropipettes.[4] Ces sondes perturbent les fonctions cellulaires[5] et nécessitent une modélisation complexe de l'interaction entre la cellule et la sonde.[6]

De façon alternative, les techniques ultrasonores permettent une mesure sans contact. En utilisant des transducteurs piézoélectriques, des fréquences typiques de l'ordre de 10 MHz sont obtenues, offrant ainsi une résolution sub-millimétrique. Les techniques de microscopie acoustique utilisent une lentille acoustique pour focaliser les ultrasons à des fréquences allant jusqu'à 2 GHz,[7] permettant de mesurer les propriétés mécaniques de cellules individuelles avec une résolution axiale de 3  $\mu\text{m}$ .[8] Mais même à ces fréquences, il est difficile de sonder l'intérieur de la cellule, en particulier dans les régions fines.

En 1984, une technique opto-acoustique appelée acoustique picoseconde a été développée pour permettre de générer des fréquences allant jusqu'à 1 THz grâce à l'expansion thermo-élastique induite par l'absorption d'impulsions laser femtosecondes.[9] Dans ce papier, nous utilisons cette technique pour sonder les propriétés mécaniques de cellules individuelles. Nous décrivons tout d'abord l'application aux cellules végétales dont la structure est bien documentée. Nous montrons que ces systèmes peuvent être utilisés comme modèles biologiques simples pour comprendre la propagation acoustique GHz dans les réseaux biologiques fibreux.[10] Nous étudions ensuite des cellules animales, et nous analysons les résultats par analogie avec ceux obtenus dans les cellules végétales.[11]

## 2 La paroi de cellules végétales comme modèle de réseau fibreux biologique

### 2.1 Mesure de la vitesse du son

Nous avons utilisé des bulbes d'oignons (*Allium Cepa* L.) frais et sains. Les secondes couches des bulbes ont été sélectionnées afin d'éviter les cellules déshydratées trop proches de la surface et les cellules non-matures trop proches du coeur. A l'aide d'un scalpel chirurgical, l'épiderme a été coupé longitudinalement (parallèlement aux ensembles vasculaires) au centre de la région équatoriale en morceaux rectangulaires de 2  $\times$  6 mm. Les couches d'épiderme ont été soigneusement retirées de la surface interne du tissu.

Afin de permettre la génération d'ondes acoustiques par effet photoélastique, les couches cellulaires ont été placées sur un substrat biocompatible. Celui-ci est composé d'une couche de titane de 300 nm d'épaisseur déposée sur un substrat en verre transparent.[12] Une vue de dessus d'une couche ainsi obtenue est présentée sur la figure 1(a). Nous avons vérifié par microscopie optique qu'une seule couche de cellules est présente. La face de la couche de cellules orientée vers le coeur du bulbe est placée sur la surface du transducteur. Cette configuration, décrite schématiquement sur la figure 1(b), permet de s'assurer que la partie de la paroi la plus épaisse est en contact avec le transducteur.

Nous avons utilisé une technique pompe-sonde optique décrite schématiquement sur la figure 2(a). Des impulsions optiques d'une durée de 100 fs et de longueur d'onde  $\lambda = 800$  nm ont été générées à l'aide d'un laser Ti :Saphir à blocage de mode. Les trains d'impulsions de pompe de longueur d'onde 400 nm sont modulés à une fréquence  $f_m$  pour permettre l'utilisation d'une détection synchrone. Le faisceau sonde de longueur d'onde native 800 nm passe dans une ligne à retard mécanique afin d'ajuster le retard temporel  $t$  entre la pompe et la sonde. Les faisceaux pompe et sonde colinéaires sont respectivement focalisés sur les faces inférieures et supérieures du film de Ti.

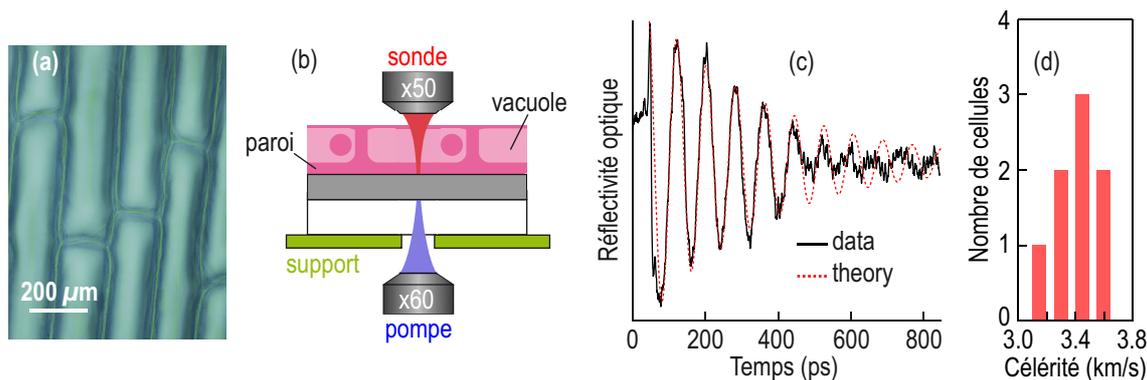


FIGURE 1 – (a) Cellules d'oignon individuelles observées par le microscope implémenté dans le montage opto-acoustique. (b) Géométrie de l'échantillon pour l'étude de la paroi végétale. (c) Variation de réflectivité optique mesurée (trait plein) et ajustement théorique (pointillés). (d) Distribution des valeurs de célérité mesurées dans 8 cellules différentes.

Le faisceau pompe est fortement absorbé par le Ti sur une profondeur de  $\sim 10$  nm à proximité de l'interface Ti-verre. Cette zone d'absorption nanométrique chauffe et se dilate brutalement. Cette expansion thermique rapide génère une impulsion acoustique longitudinale avec un contenu fréquentiel large bande s'étendant jusqu'à  $\sim 200$  GHz. L'impulsion acoustique se propage au travers du film de Ti et, grâce au contact entre le transducteur et la couche d'épiderme, est transmise à la paroi cellulaire. La propagation acoustique dans la paroi est ensuite mesurée à l'aide des impulsions laser de sonde.

La variation de réflectivité optique de la sonde  $\delta R$  est mesurée par une photodiode en fonction du retard pompe-sonde  $t$ . Elle est tracée sur la figure 1(c). Nous observons une oscillation atténuée. Puisque la cellule est transparente à la longueur d'onde sonde  $\lambda = 800$  nm, la sonde est partiellement réfléchi à l'interface Ti-paroi et, par effet photoélastique, partiellement diffractée par l'impulsion acoustique se propageant dans la paroi. Ces deux contributions optiques interfèrent et donnent naissance aux oscillations dites Brillouin.[9] La fréquence de ces oscillations est

$$f_w = \frac{2n_w v_w}{\lambda}, \quad (1)$$

où  $n_w$  et  $v_w$  décrivent respectivement l'indice optique et la célérité de l'onde acoustique de compression dans la paroi. Le temps de vie de cette oscillation  $\tau_w$ , dicté par les processus de relaxation, offre une mesure de l'atténuation acoustique  $\Gamma_w = 1/v_w \tau_w$  que nous ne discuterons pas ici par soucis de brièveté.

Un ajustement par une fonction  $\sin(2\pi f_w t) \exp(-v_w \Gamma_w t)$ , tracée en pointillés sur la figure 1(c), donne la fréquence  $f_w = 12$  GHz. Etant donné l'indice optique de la paroi  $n_w = 1.41$ , [13] la vitesse du son est  $v_w = 3410$  m s<sup>-1</sup>. La distribution des valeurs mesurées dans 8 cellules différentes est tracée sur la figure 1(d). Examinons maintenant ces résultats à l'aide d'une théorie d'homogénéisation simple.

## 2.2 Un composite fibré de fibres de cellulose

La paroi cellulaire est essentiellement composée de microfibrilles de cellulose intégrées dans une matrice hydratée de gel de pectines.[14] Les microfibrilles sont orientées le long de l'axe de la cellule,[15] lui conférant ainsi une forte anisotropie mécanique. Les fibrilles sont connectées par des hemicelluloses, notamment le xyloglucane, formant ainsi des ponts tenus par des liaisons hydrogène.[16] La longueur d'onde acoustique détectée dans la paroi est de  $\lambda/2n_w = 280$  nm, et la plus grande structure dans la

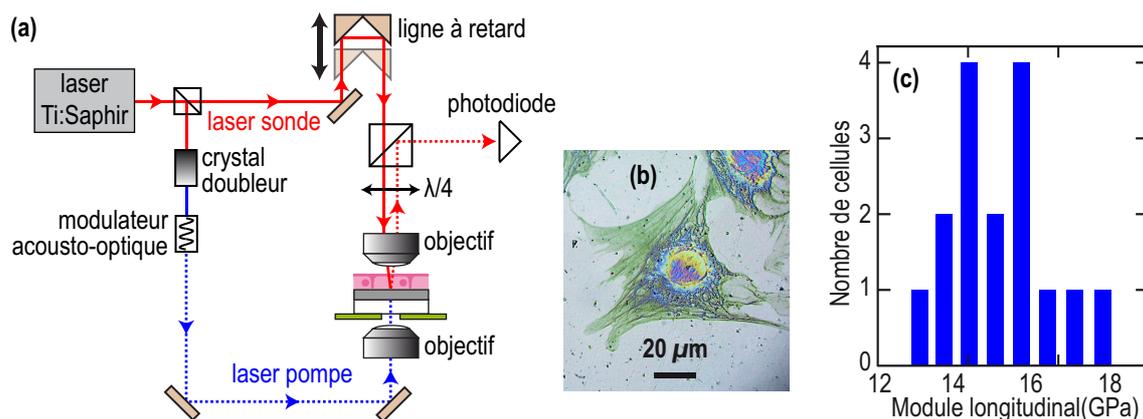


FIGURE 2 – (a) Montage opto-acoustique. (b) Cellule pré-ostéoblaste MC3T3 typique. (c) Distribution de module élastique mesuré dans 16 cellules ostéoblastes différentes.

zone sondée est la portion cristalline des microfibrilles, de diamètre  $< 25$  nm. [17] Nos mesures sont donc révélatrices des propriétés mécaniques effectives moyennées sur la longueur d'onde acoustique.

En considérant une densité apparente de la paroi  $\rho_w = 1100 \text{ kg m}^{-3}$  à des niveaux d'hydratation normaux,[18] la rigidité effective de la paroi est  $C_w = \rho_w v_w^2 = 13 \text{ GPa}$ . Cette valeur est étonnamment proche de la rigidité transverse du cellulose  $C_c \approx 15 \text{ GPa}$ , qu'elle soit estimée numériquement[19] ou mesurée dans des cristaux de cellulose par diffraction inélastique des rayons X.[20]

Pour expliquer cette observation, considérons une analogie avec les composites fibrés. Etant donnée la structure de la paroi décrite ci-dessus, il est tentant de décrire la paroi comme un système iso-contrainte puisqu'il est sollicité dans la direction normale au plan des fibres. En supposant que la rigidité effective de la paroi  $C_w$  est dictée par le cellulose et les hemicelluloses uniquement, elle peut alors être calculée grâce à la moyenne des souplesses de Reuss :

$$C_w = \left( \frac{1-f}{C_c} + \frac{f}{C_h} \right)^{-1} \quad (2)$$

où  $f = 0.7$  est la fraction volumique des hemicelluloses,[17] et  $C_c$  et  $C_h$  sont respectivement les rigidités du cellulose et des hemicelluloses. Puisque  $C_c \gg C_h$ , l'équation 2 implique que  $C_w$  devrait tendre vers  $C_h/f$ , qui est beaucoup plus faible que la valeur que nous avons mesurée. Il avait déjà été observé pour la rigidité de cisaillement que les propriétés mécaniques de la paroi étaient dominées par le cellulose.[21] Il avait alors été suggéré que la paroi cellulaire se comporte, contrairement à ce que laisse supposer sa géométrie, comme un système iso-déformation.[17] Ce comportement avait été expliqué par le rôle du xyloglucane qui agit comme séparateur entre les microfibrilles de cellulose. Nous démontrons ici un comportement similaire pour la rigidité de compression.

Nous avons mis en place un outil puissant pour sonder la microstructure de cellules individuelles. Cela nous a en outre permis de définir les cellules d'oignon comme un modèle simple pour comprendre la réponse acoustique haute fréquence de systèmes plus complexes, tels que les cellules animales.

### 3 Rigidité de noyaux de cellules animales individuelles

Pour cette étude, nous avons cultivé des cellules pré-ostéoblastes (MC3T3) et des ostéosarcomes (MG63). Pour des soucis de rendement, les cellules sont ici cultivées sur des demi-espaces de Ti pouvant être être

repolis à volonté. Elles sont fixées par du paraformaldéhyde (4%) au bout de 24h. Les faisceaux pompe et sonde sont alors tous deux focalisés à l'interface Ti-cellule. Les mesures ont été effectuées dans la zone nucléaire car elle occupe la totalité de l'épaisseur cellulaire.[11] Une image typique d'une cellule MC3T3 est présentée sur la figure 2(b).

Le coefficient photoélastique des cellules est plus faible pour une longueur d'onde de 800 nm que de 400 nm,[22] nous avons donc utilisé une longueur d'onde sonde de 400 nm. La variation de réflectivité ainsi mesurée présente toujours des oscillations Brillouin atténuées telles que celles obtenues pour la paroi végétale, mais à une fréquence plus élevée. Ceci est en partie dû au fait que  $\lambda$  est deux fois plus faible que dans le cas des cellules végétales (voir équation 1). Dans le cas des cellules ostéosarcomes, nous avons ainsi obtenu  $f_n = 25.7 \pm 0.6$  GHz et  $1/\tau_n = 7 \pm 3$  ns<sup>-1</sup>.

Puisque  $f_n > 1/\tau_n$ , l'onde de compression se propage dans le noyau en régime pseudo-périodique. Le module d'élasticité longitudinal peut donc être calculé,  $M_n = \rho_n V_n^2$ , [23] où  $\rho_n$  est la masse volumique et  $V_n = f_n \lambda / 2n_n$  est la vitesse du son mesurée à partir des oscillations Brillouin. Nous traçons sur la figure 2(c) une distribution typique de valeurs obtenues pour des ostéoblastes ( $n = 16$ ), en considérant des valeurs typiques  $\rho_n = 1100$  kg m<sup>-3</sup> et  $n_n = 1.4$ . [24] Nous avons obtenu à partir de cette distribution  $M_n = 14.8 \pm 0.6$  GPa. A titre de comparaison, nous avons mesuré des rigidités de 2.2 GPa dans l'eau ainsi que dans le milieu de culture, 2.6 GPa dans la vacuole de cellules végétales, [10] 13 GPa dans la paroi cellulaire (voir paragraphe précédent) et  $14.8 \pm 0.7$  GPa pour les ostéosarcomes ( $n = 4$ ).

De la même manière que la rigidité de la paroi est comparable à celle du cellulose, la rigidité du noyau peut être comparée à celle de protéines typiques. Des mesures de diffusion Brillouin classiques ont montré que la rigidité des protéines dépend de leur conformation : le module de compression est typiquement  $\sim 8$  GPa pour l'ADN, [25] et peut atteindre  $\sim 22$  GPa pour les protéines globulaires. [26] A l'instar de la paroi, nos mesures de la rigidité dans le noyau de cellules animales, proches de celle de protéines globulaires, suggère donc la contribution dominante d'un arrangement complexe de protéines structurées au sein du noyau, telles que les fibres de chromatine.

Cependant, si la structure de la paroi est bien documentée, celle du noyau est moins connue. La modélisation de la rigidité utilisée dans le cas de la paroi, issue de considérations géométriques, ne peut s'appliquer. Une approche alternative au calcul de valeurs effectives doit donc être mise en place. Dans les solutions concentrées de polymères, le grand nombre de contacts mécaniques entre les chaînes de polymères limite leur mouvement. Pour cette raison, ce type de solutions est généralement décrit comme un réseau élastique envahi par le solvant. [27] La longueur d'onde acoustique dans nos expériences,  $\lambda/2n_n \sim 140$  nm, est plus grande que la distance moyenne entre les enchevêtrements, les théories d'homogénéisation peuvent donc être appliquées.

Les approches classiques de la propagation du son dans de tels systèmes prédisent l'existence (en plus des modes de cisaillements qui ne sont pas considérés ici) de deux modes longitudinaux, un mode diffusif lent et un mode propagatif rapide. [27] Ces deux modes correspondent respectivement au mouvement du fluide et à celui du réseau élastique. En présence de forces de friction entre le fluide et le réseau,  $F = -2\rho v/\tau$  (où  $v$  est la vitesse relative du réseau par rapport au fluide), les deux modes sont couplés, conduisant à une atténuation des modes avec un temps de relaxation  $\tau$ .

Cependant, nous avons mesuré un mode propagatif pseudo-périodique dont nous avons montré par ailleurs qu'il n'est pas influencé par la présence du fluide intranucléaire. [11] Cette observation suggère que la fréquence de l'onde acoustique  $\omega$  est plus élevée que  $1/\tau$ . Dans ce cas la vitesse du son que nous avons mesurée est celle du réseau élastique et est peu influencée par la friction. Une façon de voir

cette description consiste à considérer que la friction lie le fluide au réseau : ils subissent dès lors la même déformation et l'ensemble se comporte comme un système iso-déformation.

Le module effectif de ce système biphasique,  $M_e$ , peut alors simplement être obtenu à partir de la moyenne de Voigt des modules respectifs du réseau et du fluide,  $M_r$  et  $M_f$ , pondérés par leurs fractions volumiques respectives,  $\phi$  et  $1 - \phi$  :  $M_e = \phi M_r + (1 - \phi)M_f$ . Considérant que le réseau est plus rigide que le fluide,  $M_f \ll M_r$ , le module effectif est proche de celui du réseau lui-même,  $M_e \approx \phi M_r$ . Pour illustration, des valeurs typiques  $M_r = 22$  GPa (protéine globulaire) et  $\phi = 0.7$  (à mi-chemin entre une suspension concentrée et un polymère fondu) donnent  $M_e = 15.4$  GPa, une valeur proche de notre mesure. Ceci démontre que notre technique permet effectivement de sonder les propriétés mécaniques du réseau élastique formant le noyau.

## 4 Conclusions

L'acoustique picoseconde est une technique mature pour la caractérisation de structures solides nanométriques. Son application à la matière molle reste délicate mais est en plein essor. Contrairement aux techniques utilisant une sonde au contact, elle offre un moyen unique pour mesurer les propriétés mécaniques de composants cellulaires de façon non-invasive avec une résolution axiale de  $\sim 100$  nm. Nous avons ici utilisé cette technique pour sonder les propriétés mécaniques de cellules individuelles.

Dans la paroi de cellules végétales, la connaissance de la structure a permis de comparer la rigidité mesurée à celle prédite par un modèle d'homogénéisation simple. La déviation au modèle de Reuss a révélé l'influence des liaisons d'hémicellulose, conduisant à un comportement iso-déformation où le réseau élastique de fibres de cellulose domine la réponse acoustique GHz. Nous avons ainsi défini la paroi des cellules d'oignon comme un modèle facilement accessible, largement documenté, pour analyser les mesures d'acoustique picoseconde dans les réseaux biologiques fibreux.

Dans le noyau de cellules pré-ostéoblastes et ostéosarcomes, un comportement iso-déformation a également été identifié, cette fois-ci attribué à la présence de friction entre le réseau de fibres de chromatine et le liquide intra-nucléaire. Ces résultats offrent une meilleure compréhension des propriétés mécaniques du noyau, et permettront d'étudier la dynamique du réseau de chromatine pendant des processus cellulaires tels que la différenciation ou la morphogénèse.

## Références

- [1] Wang, N., Tytell, J. D. & Ingber, D. E. Mechanotransduction at a distance : mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 75–82 (2009).
- [2] Cross, S. E., Jin, Y.-S., Rao, J. & Gimzewski, J. K. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* **2**, 780–783 (2007).
- [3] Raman, A. *et al.* Mapping nanomechanical properties of live cells using multi-harmonic atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* **6**, 809–814 (2011).
- [4] Rheinlaender, J. & Schaffer, T. E. Mapping the mechanical stiffness of live cells with the scanning ion conductance microscope. *Soft Matter* **9**, 3230–3236 (2013).
- [5] Schaus, S. S. & Henderson, E. R. Cell viability and probe-cell membrane interactions of XR1 glial cells imaged by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **73**, 1205–1214 (1997).

- [6] Sen, S., Subramanian, S. & Discher, D. E. Indentation and adhesive probing of a cell membrane with AFM : Theoretical model and experiments. *Biophys. J.* **89**, 3203–3213 (2005).
- [7] Hildebrand, J. A., Rugar, D., D., Johnston, R. N. & Quate, C. F. Acoustic microscopy of living cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **78**, 1656–1660 (1981).
- [8] Weiss, E. C., Lemor, R. M., Pilarczyk, G., Anastasiadis, P. & Zinin, P. V. Imaging of focal contacts of chicken heart muscle cells by high-frequency acoustic microscopy. *Ultrasound Med. Biol.* **33**, 1320–1326 (2007).
- [9] Thomsen, C. *et al.* Coherent phonon generation and detection by picosecond light pulses. *Phys. Rev. Lett.* **53**, 989–992 (1984).
- [10] Gadalla, A., Dehoux, T. & Audoin, B. Transverse mechanical properties of cell walls of single living plant cells probed by laser-generated acoustic waves. *Planta* **239**, 1129–1137 (2014).
- [11] Zouani, O. F., Dehoux, T., Durrieu, M.-C. & Audoin, B. Universality of the network-dynamics of the cell nucleus at high frequencies. *Soft Matter* **10**, 8737–8743 (2014).
- [12] Dehoux, T. & Audoin, B. Non-invasive optoacoustic probing of the density and stiffness of single biological cells. *J. Appl. Phys.* **112**, 124702 (2012).
- [13] Liu, D. *et al.* Reflection across plant cell boundaries in confocal laser scanning microscopy. *J. Microsc.* **231**, 349–357 (2008).
- [14] Hansen, S. L. *et al.* Mechanical properties of plant cell walls probed by relaxation spectra. *Plant Physiol.* **155**, 246–258 (2011).
- [15] Kerstens, S., Decraemer, W. F. & Verbelen, J.-P. Cell walls at the plant surface behave mechanically like fiber-reinforced composite materials. *Plant Physiol.* **127**, 381–385 (2001).
- [16] Burgert, I. & Fratzl, P. Mechanics of the expanding cell wall. In Verbelen, J.-P. & Vissenberg, K. (eds.) *The Expanding Cell*, vol. 6 of *Plant Cell Monographs*, 191–215 (Springer Berlin / Heidelberg, 2007).
- [17] Thompson, D. S. How do cell walls regulate plant growth ? *J. Exp. Bot.* **56**, 2275–2285 (2005).
- [18] Rapusas, R. & Driscoll, R. Thermophysical properties of fresh and dried white onion slices. *J. Food Eng.* **24**, 149–164 (1995).
- [19] Cave, I. D. The longitudinal young's modulus of pinus radiata. *Wood Sci. Technol.* **3**, 40–48 (1969).
- [20] Diddens, I., Murphy, B., Krisch, M. & Müller, M. Anisotropic elastic properties of cellulose measured using inelastic x-ray scattering. *Macromolecules* **41**, 9755–9759 (2008).
- [21] Whitney, S. E., Gothard, M. G., Mitchell, J. T. & Gidley, M. J. Roles of cellulose and xyloglucan in determining the mechanical properties of primary plant cell walls. *Plant Physiol.* **121**, 657–664 (1999).
- [22] Ducouso, M. *et al.* Two color probing of the ultrafast photo-acoustic response in a single biological cell. *J. Phys. Conf. Ser.* **278**, 012042 (2011).
- [23] Litovitz, T. A. & Davis, C. M. *Physical Acoustics*, vol. 2A (Academic, New York, 1965).
- [24] Brunsting, A. & Mullaney, P. F. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys. J.* **14**, 439–453 (1974).
- [25] Lee, S. A. *et al.* A Brillouin scattering study of the hydration of Li- and Na-DNA films. *Biopolymers* **26**, 1637–1665 (1987).

- [26] Speziale, S. *et al.* Sound velocity and elasticity of tetragonal lysozyme crystals by brillouin spectroscopy. *Biophys. J.* **85**, 3202 – 3213 (2003).
- [27] Tanaka, T., Hocker, L. O. & Benedek, G. B. Spectrum of light scattered from a viscoelastic gel. *The Journal of Chemical Physics* **59**, 5151–5159 (1973).