



Automated measurement of mechanobiological properties of cells by atomic force microscopy (AFM)

Ophélie Thomas- -Chemin, Etienne Dague, Emmanuelle Trévisiol, Childérick Séverac

► To cite this version:

Ophélie Thomas- -Chemin, Etienne Dague, Emmanuelle Trévisiol, Childérick Séverac. Automated measurement of mechanobiological properties of cells by atomic force microscopy (AFM). LAAS-CNRS. 2021. <hal-04918727>

HAL Id: hal-04918727

<https://hal.science/hal-04918727v1>

Submitted on 29 Jan 2025

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

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



Distributed under a Creative Commons CC0 1.0 - Universal - International License

Université Paul Sabatier, Toulouse III

Automatisation des mesures des propriétés mécanobiologiques de cellules par microscopie à force atomique (AFM)

Ophélie THOMAS- -CHEMIN

Responsables

Etienne DAGUE ; Emmanuelle TREVISIOL ; Childéric SÉVERAC

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes ; Toulouse Biotechnology Institute ; RESTORE
Research Center – CNRS

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Étienne Dague pour son encadrement, sa disponibilité et ses conseils précieux, ainsi que pour son aide lors de la rédaction de ce rapport.

J'adresse également mes remerciements à Childéric Séverac pour ses nombreux conseils sur l'AFM et son aide pour apprendre à manipuler correctement l'appareil.

Je remercie également Emmanuelle Trevisiol pour ses conseils et remarques sur le microcontact-printing, ainsi que pour ses relectures lors de la rédaction de ce rapport.

Je souhaiterais aussi remercier Jean-Christophe Cau pour m'avoir présenté et expliqué le fonctionnement de l'InnoStamp 40TM.

Je tiens également à remercier Charline Blatché pour m'avoir conseillée lors de la culture cellulaire et pour s'être occupée de mes lignées.

Enfin, merci à l'équipe ELiA pour sa bonne humeur et les nombreuses discussions lors de la pause-café.

Sommaire

I- INTRODUCTION.....	1
II- MÉTHODOLOGIE	2
III- ÉTAT DE L'ART.....	2
1) <i>Lien entre la mécanobiologie et la physiopathologie.....</i>	<i>3</i>
2) <i>Microscopie à force atomique : une technologie donnant accès aux propriétés mécaniques des cellules.....</i>	<i>4</i>
3) <i>Microcontact-printing</i>	<i>5</i>
4) <i>Mesures AFM sur des populations cellulaires</i>	<i>6</i>
IV- MATÉRIEL & MÉTHODE.....	7
1) <i>Culture cellulaire.....</i>	<i>7</i>
2) <i>Microcontact-printing</i>	<i>8</i>
3) <i>Mesures AFM.....</i>	<i>8</i>
a) <i>Calibration des leviers : sensibilité et constante de raideur</i>	<i>8</i>
b) <i>Spectroscopie de force : calcul de l'indentation (loi de Hooke) et ajustement des courbes de force-indentation au modèle mécanique (Hertz, mécanomique)</i>	<i>9</i>
V- RÉSULTATS.....	11
1) <i>Microcontact-printing</i>	<i>11</i>
2) <i>Microscopie à force atomique.....</i>	<i>12</i>
3) <i>Automatisation des mesures AFM.....</i>	<i>14</i>
VI- DISCUSSION	17
VII- CONCLUSION	19
VIII- RÉFÉRENCES	19

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFM : Atomic Force Microscopy (Microscopie à force atomique)

Cy3 : Cyanine 3

ECM : Extracellular Matrix (Matrice extracellulaire)

G418 : Généticine

GFP : Green Fluorescent Protein (Protéine fluorescente verte)

HEPES : Acide 4-(2-Hydroxyéthyl) -1-Pipérazine Éthane Sulfonique

ML : Machine Learning (Apprentissage automatique)

PBS : Phosphate-Buffered Saline (Tampon phosphate salin)

PC3 : Lignée cellulaire humaine du cancer de la prostate

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PLL-g-PEG : Poly-L-Lysine-grafted-Poly-Ethylene Glycol (Poly-L-lysine greffée de polyéthylène glycol)

RMS : Root Mean Square (Moyenne quadratique)

RPMI : Milieu de culture Roswell Park Memorial Institute

STM : Scanning Tunneling Microscopy (Microscopie à effet tunnel)

SVF : Sérum de Veau Fœtal

μCP : Microcontact-Printing (Impression par microcontact)

ABSTRACT

Atomic Force Microscopy (AFM) has proven to be a powerful tool for performing the measurement of biomechanical forces on living cells. However, this technology requires methodological improvements for being realistically applied to the medical field. To perform statistically relevant experiments, AFM force measurements must be automated on living cells. A first strategy has been developed on *C. albicans* cells and this project aims to apply a similar approach to human cells. Likewise, the strategy in two phases consists in arraying cells followed by the automatic measurement of their mechanobiological properties by force spectroscopy.

To create the array of cells, fibronectin is patterned by microcontact-printing (μ CP) according to specific geometrical features and spacing. The cells are then seeded on the fibronectin patterns. The master moulds are designed and fabricated in LAAS-CNRS cleanroom facilities and μ CP is performed automatically by InnoStamp 40TM (an innovation of the joint lab between LAAS and Innopsys: BIOSOFT). The device prints arrays of fibronectin by physical contact between a microstructured and inked PDMS stamp and a glass slide. Finally, the cells are seeded on the fibronectin array and organize themselves in the form of an ordered matrix.

Biomechanical AFM measurements must be automated on each spot of the array occupied by a cell. To achieve this goal, an algorithm based on a Jython script is developed and adapted. The script needs the centre coordinates of the first and last cell of the matrix and the number of cells between them, which allows calculating the distance between each cell. Then the AFM tip indents the first cell and then automatically moves to the next one, recording force curves on each cell. The aim of the automation is to be able to analyse cell populations, instead of the usual few tens of cells. This methodology is applied to PC3 cells (grade IV prostatic adenocarcinoma cell line derived from bone metastases). The results of the measurements of the mechanical properties by AFM will be compared between a PC3 population seeded on an ordered cell array and a PC3 population not following any cell array.

RÉSUMÉ

La microscopie à force atomique (AFM) s'est avérée être un outil puissant pour effectuer la mesure des forces biomécaniques sur cellules vivantes. Cependant, cette technologie nécessite des améliorations méthodologiques pour être appliquée de manière réaliste au domaine médical. Pour effectuer des expériences statistiquement pertinentes, les mesures de force AFM doivent être automatisées sur des cellules vivantes. Une première stratégie a été développée sur les cellules de *C. albicans* et ce projet vise à appliquer une approche similaire aux cellules humaines. De même, la stratégie en deux phases consiste à disposer des cellules de manière ordonnée puis à mesurer automatiquement leurs propriétés mécanobiologiques par spectroscopie de force.

Pour créer la matrice de cellules, la fibronectine est déposée sur une lame de verre par microcontact-printing (μ CP) sous la forme de motifs possédant des caractéristiques géométriques et un espacement spécifiques. Les cellules sont ensuiteensemencées sur les motifs de fibronectine. Les moules maîtres sont conçus et fabriqués en salle blanche du LAAS-CNRS et le μ CP est réalisé automatiquement avec l'appareil InnoStamp 40TM (une innovation du laboratoire commun entre le LAAS et Innopsys : BIOSOFT). L'appareil imprime des matrices de fibronectine par contact physique entre un tampon PDMS microstructuré et encre et une lame de verre. Enfin, les cellules sont ensemencées sur la matrice de fibronectine et s'organisent sous la forme d'une matrice ordonnée.

Les mesures biomécaniques par AFM doivent être automatisées sur chaque point de la matrice occupé par une cellule. Pour atteindre cet objectif, un algorithme basé sur un script Jython est développé et adapté. Le script a besoin des coordonnées centrales de la première et de la dernière cellule de la matrice et du nombre de cellules entre elles, ce qui permet de calculer la distance entre chaque cellule. Ensuite, la pointe de l'AFM indente la première cellule, puis passe automatiquement à la suivante, en enregistrant les courbes de force sur chaque cellule. L'objectif de l'automatisation est de pouvoir analyser des populations cellulaires, au lieu des quelques dizaines de cellules habituelles. Cette méthodologie est appliquée aux cellules PC3 (lignée cellulaire d'adénocarcinome prostatique de grade IV dérivée de métastases osseuses). Les résultats des mesures des propriétés mécaniques par AFM seront comparés entre une population PC3 ensemencée sur une matrice de cellules ordonnées et une population PC3 non-ordonnée.

I- INTRODUCTION

Ce travail vise à explorer les propriétés mécanobiologiques de populations cellulaires. Ces propriétés sont analysées à l'aide d'un microscope à force atomique (AFM) en mode spectroscopie de force, et l'automatisation des mesures doit permettre de recueillir des données sur une centaine de cellules. Ces informations pourraient notamment permettre de distinguer une population cellulaire saine d'une population cancéreuse. L'objectif de cette étude est d'abord d'augmenter le nombre de cellules analysées en un temps réduit, puis d'identifier les facteurs optimaux pour différencier efficacement deux types cellulaires.

Jusqu'à présent, l'utilisation de l'AFM sur des cellules consistait en la mesure de milliers de courbes de force sur une dizaine de cellules. Cependant, afin de réaliser des expériences statistiquement pertinentes, il faut augmenter le nombre de cellules mesurées. En effet, travailler sur une grande population cellulaire permet d'éviter de tirer des conclusions qui peuvent s'avérer erronées ou contradictoires, car basées sur des données trop peu nombreuses. Avec moins de vingt cellules par groupe, il n'est possible de discriminer, avec une p-value de 0,01 et un test bilatéral, que deux groupes présentant une petite différence entre eux, de l'ordre de 100Pa, et peu dispersés ou deux groupes présentant une grande différence entre eux, de l'ordre de 2 000Pa, et très dispersés. Cependant, pour différencier statistiquement deux populations proches et dispersées, le nombre de cellules mesurées augmente considérablement. De fait, un calcul de statistique inverse a démontré qu'il faut un minimum de 954 cellules pour s'assurer de la fiabilité d'une différence de 50Pa entre deux populations avec un écart-type de 200Pa et une p-value de 0,01 (fig. 1). Il faut donc augmenter le nombre de cellules analysées.

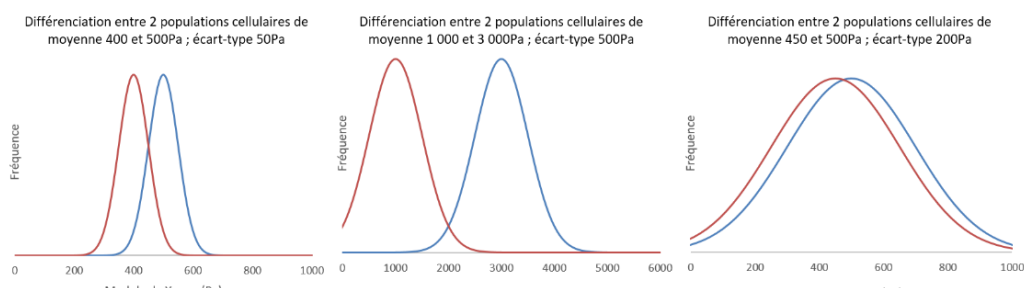


Figure 1 – Représentation du nombre de cellules nécessaires pour comparer deux groupes cellulaires en fonction de leur moyenne observée et de l'écart-type de leur population. Pour chaque graphique, la p-value est de 0,01 et un test bilatéral est utilisé.

Pour augmenter le débit des mesures réalisées manuellement, nous avons développé un algorithme pouvant localiser les cellules, se déplacer entre elles et enregistrer les courbes de force de manière automatisée. Afin de contrôler la position des cellules, elles sont immobilisées sur des motifs de manière reproductible et adaptée à la caractérisation par AFM.

De plus, afin d'améliorer la qualité de différenciation entre des cellules saines et cancéreuses, il faut, au préalable, déterminer les facteurs d'influence. Lors de ce travail, différents facteurs ont été sondés, tels que la vitesse d'approche lors de la mesure et l'influence de la forme des cellules. Pour atteindre cet objectif, les cellules ont été ensemencées, soit de manière aléatoire, soit sur des motifs présentant différentes formes.

II- MÉTHODOLOGIE

Pour sonder mécaniquement une population d'une centaine de cellules, la méthodologie est la suivante :

- Maximiser le taux de remplissage de cellules vivantes sur des lamelles de verre compatibles à l'appareil AFM, tout en évitant le chevauchement entre les cellules

En se basant sur les travaux de Foncy *et al.* [1], j'ai réalisé une puce à cellules compatible avec des mesures par AFM et possédant la taille de motifs favorisant le taux de remplissage.

- Augmenter la vitesse des mesures mécanobiologiques sur les cellules, tout en restant dans un régime élastique ou viscoélastique cohérent

Il s'agit de chercher les meilleurs paramètres de vitesse d'indentation pour obtenir un maximum de données en un minimum de temps. Une autre possibilité serait de réduire la distance entre les cellules afin d'obtenir le plus petit espacement entre elles sans chevauchement, ce qui réduirait le temps de déplacement de l'indenteur entre chaque point.

Dans ce cadre, j'ai réalisé des mesures avec des vitesses d'approche de 5, 10 et 50 $\mu\text{m/s}$ et comparé les valeurs du module de Young et d'écart-type obtenues.

- Améliorer la qualité de différenciation entre deux populations cellulaires différentes

À la suite de ce travail et lors des prochaines mesures, nous avons décidé de concevoir des motifs de différentes formes afin d'identifier celui qui permet d'obtenir la mesure la plus reproductible possible d'une cellule à l'autre.

III- ÉTAT DE L'ART

Ce présent rapport se compose de quatre parties après cette introduction.

Cette partie présente une analyse bibliographique liée à cette étude. Le domaine de la mécanobiologie et son lien avec les pathologies sont passés en revue. La technique AFM, permettant la mesure des propriétés mécanobiologiques des cellules est présentée, suivie de celle du microcontact-printing (μCP), permettant l'immobilisation sous forme de matrice d'une

grande population de cellules uniques et vivantes. Enfin, le choix de la méthode utilisée pour analyser l'élasticité cellulaire d'une population de centaines de cellules en deux heures grâce à un programme d'automatisation est montré.

Dans la partie IV-, le dispositif expérimental est présenté. Les différentes étapes de la culture cellulaire et du μ CP à l'InnoStamp 40TM y sont détaillées. Enfin, il y est expliqué l'importance de la calibration de la sensibilité de la photodiode de l'AFM ainsi que de la constante de raideur des cantilevers.

La partie V- représente les résultats obtenus. Dans un premier temps, il y est montré la fabrication par μ CP d'une puce à cellules compatible avec l'analyse automatisée par AFM. Puis, les distributions des valeurs du module élastique mesurées par AFM sur des cellules immobilisées de manière aléatoire et sous forme de matrice ordonnée sont présentées. Enfin, les premiers ajustements du script d'automatisation Jython, concernant la correction de l'erreur lors du déplacement de la pointe AFM, sont mis en évidence.

Enfin, dans la partie VI-, une discussion est réalisée, suivie d'une conclusion.

1) Lien entre la mécanobiologie et la physiopathologie

Les propriétés mécanobiologiques des cellules (élasticité, adhésion) jouent des rôles importants pour le fonctionnement de mécanismes cellulaires tels que la croissance, la division et la migration cellulaire. La première étude utilisant les propriétés élastiques mesurées par AFM sur des cellules cancéreuses a pu montrer que les cellules métastatiques avaient un module élastique plus faible que les cellules saines, suggérant que le cancer pouvait être caractérisé par une diminution de la rigidité cellulaire et une meilleure déformabilité [2]. Les auteurs mettent alors en évidence que la mesure du module de Young des cellules pouvait aider à différencier les cellules cancéreuses des cellules saines. Par la suite, d'autres travaux ont pu montrer que les cellules cancéreuses étaient moins rigides et plus facilement déformables, notamment dans le cas du cancer du sein [3]. Cette diminution de la rigidité est due à la formation de filaments d'actine moins bien définie perturbant la structure et la dynamique du cytosquelette.

La mesure des propriétés mécaniques des cellules, en général, et de l'élasticité, en particulier, peut alors servir d'indicateur de l'état biologique de celles-ci et renseigner sur une pathologie [4]. De plus, elle peut également être un moyen de diagnostic précoce dans la détection de différentes pathologies, faisant apparaître le potentiel de ces propriétés cellulaires pour la médecine. Par exemple, la rigidité cellulaire semble être un biomarqueur potentiel du caractère invasif des cellules cancéreuses [5].

2) *Microscopie à force atomique : une technologie donnant accès aux propriétés mécaniques des cellules*

Pour réaliser la mesure des forces biomécaniques, différentes méthodes ont été développées telles que la rhéométrie à plaques parallèles, l'étirement optique, la rhéologie monocouche cellulaire, la microrhéologie de suivi des particules, la cytométrie de torsion magnétique, les pinces optiques et l'AFM [6]. L'AFM dérive de la microscopie à effet tunnel (STM). Le principe de la STM repose sur un échange de courant électrique entre une sonde et une surface permettant de cartographier une image topographique de cette surface à l'échelle atomique. Cependant, pour utiliser ce microscope, les échantillons doivent être conducteurs. Cette technique est donc peu adaptée pour les échantillons biologiques.

L'AFM, à l'inverse, n'a pas besoin d'échantillon conducteur car elle est basée sur les mesures de force et non sur la mesure d'un courant. Cette technologie se décline notamment en deux modes complémentaires : l'imagerie et la spectroscopie de force. Le mode imagerie permet de caractériser la morphologie, telle que la forme, la taille et l'asymétrie d'un échantillon, notamment des cellules eucaryotes dans leur environnement physiologique. L'appareil sonde la topographie de la surface de cet échantillon en mesurant sa hauteur et réalise ainsi une cartographie locale de sa surface. Le principe s'appuie sur le fait que des forces attractives ou répulsives s'exercent entre la surface de l'échantillon et la pointe d'une sonde, fixée à l'extrémité d'un cantilever. Un faisceau laser vient se réfléchir sur le dos du cantilever et est renvoyé sur une photodiode à quatre quadrants. Une force arbitraire est exercée sur le cantilever pendant le balayage. Pour qu'elle reste constante, le tube piézoélectrique sur lequel repose l'échantillon est déplacé verticalement. La déviation du spot laser sur la photodiode est alors mesurée. Ainsi, une déflexion du cantilever, indiquant une force d'interaction entre la pointe de la sonde et l'échantillon, est corrélée au déplacement vertical du laser sur la photodiode (fig. 2 A). Il est alors possible de réaliser des images topographiques en se basant sur la position du spot laser sur la photodiode.

En mode spectroscopie de force, les propriétés mécaniques locales de l'échantillon sont étudiées (élasticité, adhésion, dissipation d'énergie, viscoélasticité, travail d'adhésion, etc.). Le balayage x ; y est supprimé et la pointe est successivement approchée et retirée de l'échantillon à analyser. La phase d'approche peut se décomposer en deux étapes : d'abord, une partie non-contact pendant laquelle la pointe et l'échantillon ne sont pas en contact, puis, une partie où la pointe appuie sur l'échantillon et le déforme (on parle d'indentation). Pendant le retrait, la pointe suit le chemin inverse et, si une adhésion a eu lieu entre la pointe et l'échantillon, il

faudra appliquer une force plus forte pour rompre la liaison, ce qui se caractérise par un saut sur la courbe de retrait. L'ensemble constitue les courbes force-distance. Ces courbes force-distance sont converties en courbes force-indentation puis ajustées à des modèles mécaniques pour en extraire par exemple, le module d'élasticité [7]. L'indentation correspond à la différence entre la déflexion du cantilever sur une surface dure de référence et sur l'échantillon à analyser (fig. 2 B).

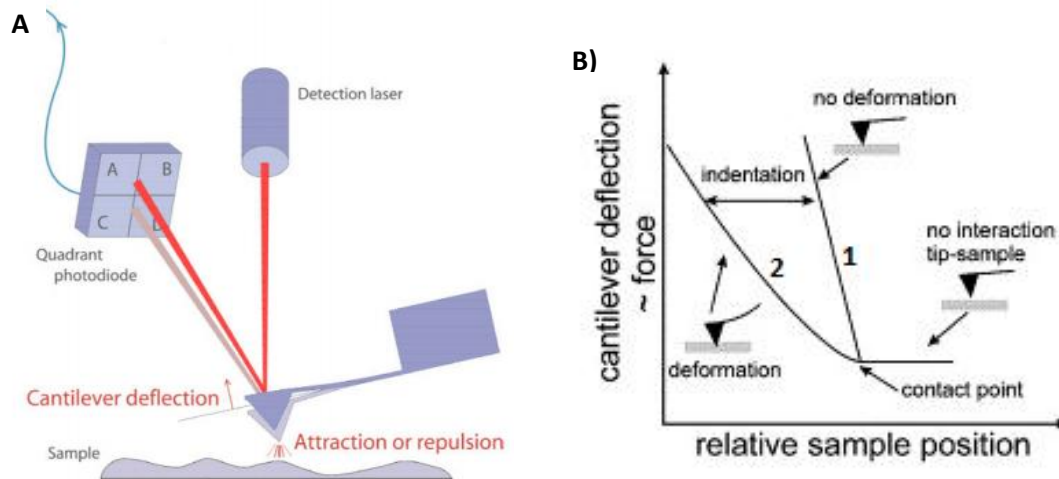


Figure 2 – Principe de fonctionnement de l'AFM. En A, le faisceau laser est réfléchi sur le dos de l'extrémité du cantilever et renvoyé vers une photodiode à quatre quadrants. Lorsque des forces d'attraction ou de répulsion s'appliquent entre la pointe et l'échantillon, une déflexion du cantilever se produit, ce qui change la position du spot laser sur la photodiode. La pointe de l'AFM est déplacée sur l'échantillon ce qui permet de réaliser une topographie de la surface de l'échantillon. D'après [8]. En B, courbes force-indentation. La ligne droite annotée (1) représente la déflexion du cantilever sur la surface dure. La ligne courbe annotée (2) représente la déflexion du cantilever sur la surface d'intérêt. La différence entre ces deux courbes représente l'indentation. D'après [7].

3) Microcontact-printing

Pour que les mesures de force soient reproductibles sur une large population, il faut d'abord être capable d'immobiliser les cellules de la même manière sur une surface adaptée. De plus, il faut également pouvoir les localiser rapidement pour des questions de viabilité et effectuer les mesures AFM sur les mêmes zones cellulaires pour limiter les variabilités. En uniformisant ces paramètres, l'étude évite les biais dus aux variations de la forme des cellules et à la zone d'indentation. Cela limite alors l'hétérogénéité de la population. Si une hétérogénéité est retrouvée, elle est alors corrélée à l'information biologique. Cependant, il faut garder à l'esprit que l'hétérogénéité d'une population cellulaire peut également provenir d'une asynchronisation des cellules à différents stades du cycle cellulaire ou à différentes activités métaboliques. Ces influences ne sont pas contrôlées ici.

Malgré cela, pouvoir s'affranchir de la forme cellulaire est un grand progrès pour l'étude d'une population cellulaire dans son ensemble. Afin de garantir les deux critères cités plus haut, il faut trouver une stratégie qui permette d'immobiliser les cellules sur des motifs localisés de façon précise sur une surface. Le μ CP permet de répondre à ces besoins. Cette méthode permet

de recouvrir une surface cible de biomolécules d'intérêt s'organisant sous la forme de motifs définis. Différents types de molécules peuvent être imprimées, comme des molécules d'ADN [9]. En imprimant des protéines de la matrice extracellulaire (ECM), telles que la fibronectine, le collagène ou la laminine, sur une surface, il est possible d'y immobiliser des cellules vivantes [1]. Dans ce cas, le μ CP repose sur trois grandes étapes : l'encre avec des protéines de l'ECM d'intérêt d'une surface de PDMS, structurée des motifs à imprimer, suivi d'un séchage et enfin du transfert des protéines de l'ECM sur un support solide, comme une lamelle de microscope, par contact (fig. 3). Un outil, appelé InnoStamp 40TM, a été développé et permet d'automatiser toutes ces étapes et d'uniformiser les dépôts. Les cellules sont ensuiteensemencées sur la lamelle de verre et adhèrent préférentiellement aux protéines de l'ECM ordonnées.

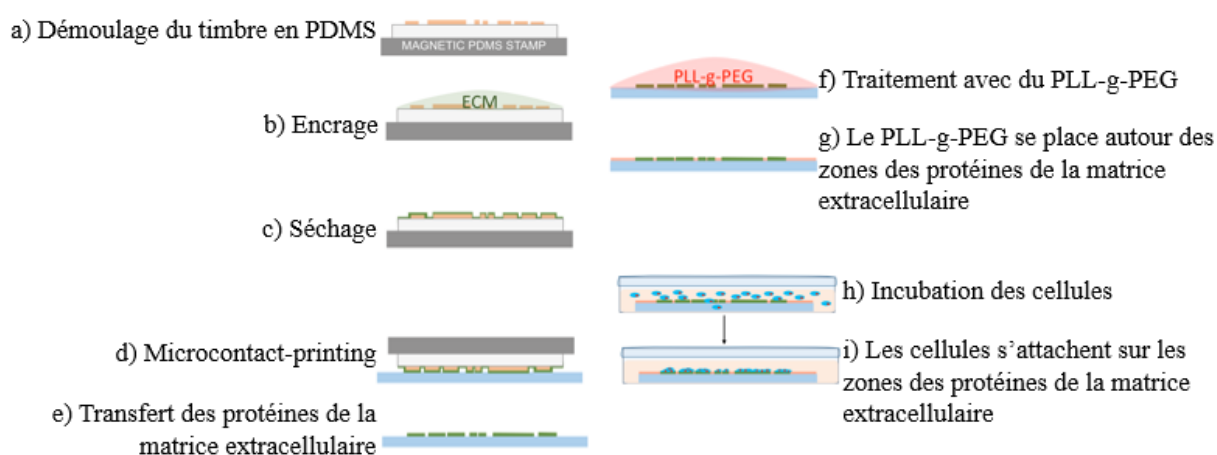


Figure 3 – Étapes du μ CP par InnoStamp 40TM. Le timbre PDMS magnétique contient les motifs désirés (a). Il est encre avec les protéines de l'ECM pendant une minute (b), puis séché (c). Il est ensuite apporté sur un substrat (d) pour l'étape de transfert (e). Par la suite, hors de l'InnoStamp 40TM, les molécules non-adhésives de PLL-g-PEG sont ajoutées (f) pour recouvrir les zones sans motif (g). Enfin, les cellules sont mises à cultiver sur le substrat (h). Au bout de 24h, les cellules sont attachées spécifiquement sur les motifs des protéines de l'ECM (i). D'après [10].

Le timbre PDMS structuré de motifs est encre avec les protéines de l'ECM. À partir de (c), il est ensuite appliqué sur le support à fonctionnaliser (d) pour l'étape de transfert (e). Hors de l'InnoStamp 40TM, la surface entre les motifs est passivée par incubation dans une solution de PLL-g-PEG (f). Enfin, les cellules sont incubées sur le support contenant les motifs afin de s'y immobiliser.

Grâce à cette technique, il est possible d'immobiliser des milliers de cellules de manière reproductible sur une large surface et ainsi réaliser des analyses statistiques par AFM.

4) Mesures AFM sur des populations cellulaires

L'AFM a été initialement conçu comme une technique d'imagerie, ce qui explique peut-être pourquoi les études mécaniques sur cellules restent souvent axées sur un grand nombre de mesures par cellule. Afin d'augmenter le nombre de cellules analysées, il a été décidé de réduire le nombre de points d'indentation par cellule par rapport aux pratiques actuelles, permettant

ainsi de limiter le temps d'analyse à environ vingt secondes par cellule. L'objectif ici n'est pas de réaliser de l'imagerie cellulaire, mais de mesurer les forces d'interaction entre la pointe de l'AFM et la surface de la cellule.

Grâce à ces mesures en spectroscopie de force, il est possible d'évaluer les propriétés mécanobiologiques de la surface cellulaire, notamment son élasticité. De plus, la diminution du nombre d'indentations ne semble pas compromettre la validité des résultats. En comparant les mesures de rigidité obtenues avec neuf ou seize indentations par cellule [11] à celles obtenues avec 256 indentations par cellule [12], il a été observé que les ordres de grandeur restent similaires. Toutefois, réduire le nombre de courbes de force par cellule entraîne une perte d'information sur les variations locales d'élasticité au sein d'une même cellule. Ces deux approches sont donc complémentaires.

Afin d'augmenter le débit de mesures des propriétés mécanobiologiques sur les cellules et de s'affranchir des étapes manuelles de déplacement de la pointe AFM, un programme d'automatisation a été développé. Il se fonde sur un script Jython publié par Séverac *et al.* [13]. Il s'agit d'un algorithme qui déplace automatiquement la pointe AFM. Son principe est basé sur l'enregistrement des courbes de force de toutes les cellules d'une population à tester grâce au déplacement de la sonde de cellule à cellule. Une première aire de balayage est préalablement définie et une fois qu'elle a été entièrement analysée, l'appareil se déplace automatiquement afin de présenter une seconde aire au cantilever. Ce programme pourra générer de nombreuses données en peu de temps offrant même la possibilité d'utiliser des algorithmes d'apprentissage automatique (ML, Machine Learning) pour différencier des sous-populations cellulaires entre autres par leurs propriétés mécaniques.

IV- MATÉRIEL & MÉTHODE

1) Culture cellulaire

La lignée cellulaire PC3-GFP a été cultivée dans un milieu RPMI, contenant de la L-glutamine, du tampon HEPES et du rouge de phénol (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.) avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.), 1% de pénicilline-streptomycine (Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.) et 1% de généticine (G418, Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc.) dans un incubateur à 37°C et à 5% de CO₂. Les cellules ont ensuite étéensemencées sur des lamelles de verre de 20mm de côté et disposées dans des boîtes de Pétri de 40mm de diamètre pendant une nuit.

2) *Microcontact-printing*

Les matrices de cellules ont été réalisées après μ CP de motifs de fibronectine grâce à l'appareil InnoStamp 40TM. Les timbres de PDMS plats ou présentant des motifs carrés ont été déposés à l'emplacement de chargement de l'appareil. 146 μ L de fibronectine de plasma bovin (Sigma Aldrich, Merck KGaA.) à une concentration de 100 μ g/mL (dans du PBS 1X, pH 7,4 : NaCl : 137mM ; KCl : 2,7mM ; Na₂HPO₄ : 10mM ; KH₂PO₄ : 1,8mM) ont été déposés sur une lame de verre à l'emplacement de la solution d'encrage de l'appareil. La lamelle de verre servant de substrat a été nettoyée 10s à l'acétone, 10s à l'eau déionisée et 10s à l'isopropanol avant de subir un traitement au plasma oxygène (Diener Pico, 50W, 0,3mbar, 1min30). Elle a ensuite été placée sur la zone de dépôt de l'InnoStamp 40TM. Le protocole automatisé de l'appareil a été lancé. La lamelle de verre fonctionnalisée avec les motifs de fibronectine a été retirée de l'InnoStamp 40TM et déposée dans une boîte de Pétri de 40mm de diamètre. 200 μ L de PLL-g-PEG (PLL (20) -g [3.5] -PEG (2), SuSoS AG.) à une concentration de 100 μ g/mL (dans du PBS 1X, pH 7,4) ont été ajoutés sur les lamelles de verre présentant des motifs carrés. Après une incubation de 30min, les lamelles ont été rincées 3 fois avec du PBS 1X, pH 7,4 avant l'ensemencement cellulaire.

3) *Mesures AFM*

a) *Calibration des leviers : sensibilité et constante de raideur*

Toutes les expériences AFM ont été réalisées sur un appareil NanoWizard® 3 AFM (JPK Instruments, Bruker Nano GmbH.) en mode contact, force mapping ou quantitative imaging. Avant toute expérience, la sensibilité de la photodiode de l'AFM, captant le signal du faisceau laser, doit être calibrée en convertissant les volts (V), qu'elle mesure, en nanomètres de mouvement de la pointe. Pour cela, le cantilever mesure une courbe de force signal-mouvement (en V) sur un échantillon suffisamment rigide pour ne pas être indenté. La pente de la droite correspond à la sensibilité à la déflexion (fig. 4 A). Dans cette étude, des cantilevers MLCT-BIO-DC, de forme triangulaire ayant une sensibilité de 40,05nm/V à 49,53nm/V ont été utilisés.

Le cantilever peut être modélisé comme un ressort avec une constante de raideur k propre. Elle est mesurée en N/m. Il faut également calibrer cette constante. Pour cela, la fluctuation thermique du cantilever est étudiée à température ambiante. Un spectre du bruit thermique du cantilever, de l'amplitude en fonction de la fréquence de résonance, est réalisé. Le pic du spectre thermique est ajusté afin d'en extraire la fréquence de résonance (fig. 4 B). En fonction des caractéristiques du cantilever (forme, taille), la constante de raideur du ressort est calculée. Dans cette étude, les cantilevers possédaient une constante de raideur comprise entre 0,006N/m et 0,011N/m.

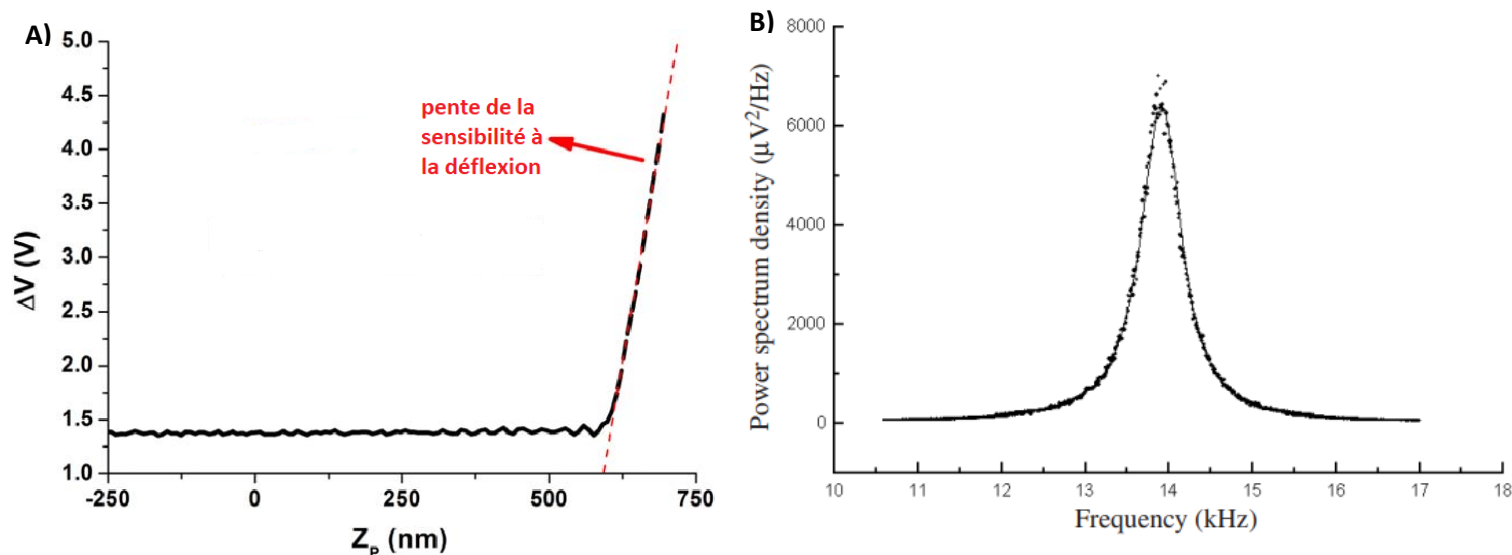


Figure 4 – Calibration de l’AFM. En A, courbe de force signal-mouvement pour la calibration de la sensibilité à la déflexion. Le cantilever réalise des mesures sur une surface très rigide. Le mouvement piézoélectrique vers le bas correspond à la déflexion du cantilever (ligne droite noire). La pente mesurée (ligne rouge) correspond à la sensibilité à la déflexion en nm/V. D’après [14]. En B, spectre du bruit thermique du cantilever pour la calibration de la constante de raideur. Les caractéristiques du cantilever sont prises en compte. Le pic est ajusté autour de la fréquence de résonance. D’après [15].

Les mesures et images de force mapping ont été réalisées dans le milieu de culture tamponné, avec une force appliquée de 3nN, une longueur en Z de 5 μ m, à trois vitesses différentes (5 μ m/s ; 10 μ m/s ; 50 μ m/s) et en 32x32 pixels sur des zones de 10x10 μ m².

b) Spectroscopie de force : calcul de l’indentation (loi de Hooke) et ajustement des courbes de force-indentation au modèle mécanique (Hertz)

Une fois le cantilever calibré en milieu liquide (le milieu des cellules), il est alors possible de calculer la force appliquée sur celui-ci grâce aux mesures de variations de déflexion du laser qui s’y réfléchit. D’après la loi de Hooke :

$$F = kd \quad (1)$$

où F est la force appliquée par le cantilever, k la constante de rigidité du cantilever et d la déflexion du cantilever (fig. 5).

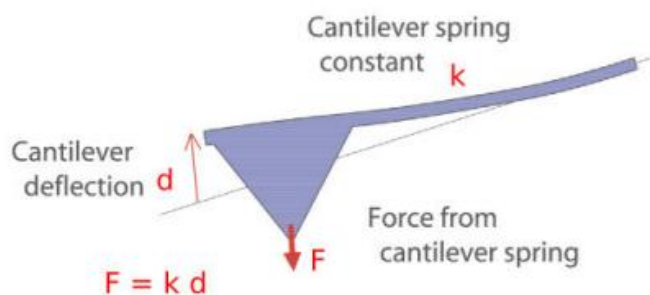


Figure 5 – Principe de la loi de Hooke. La force F , appliquée pour détendre le cantilever, dépend de la distance d de déflexion du cantilever. D’après [8].

L’interaction entre la pointe et la surface peut être mesurée. En approchant la pointe de la surface, la déflexion du cantilever renseigne sur la force exercée sur cette surface. En éloignant

la pointe de la surface, il est possible de déterminer la force d'adhésion entre la pointe et la surface. Cet ensemble représente les courbes d'approche et de retrait (fig. 6), qui sont le reflet de la déflexion du cantilever (donc de la force appliquée) par rapport à la position verticale du tube piézoélectrique. Sur un échantillon mou, la position verticale du tube piézoélectrique est la somme de son déplacement et de son indentation dans l'échantillon. Connaissant la constante de raideur du levier, il est alors possible de calculer les courbes force-indentation.

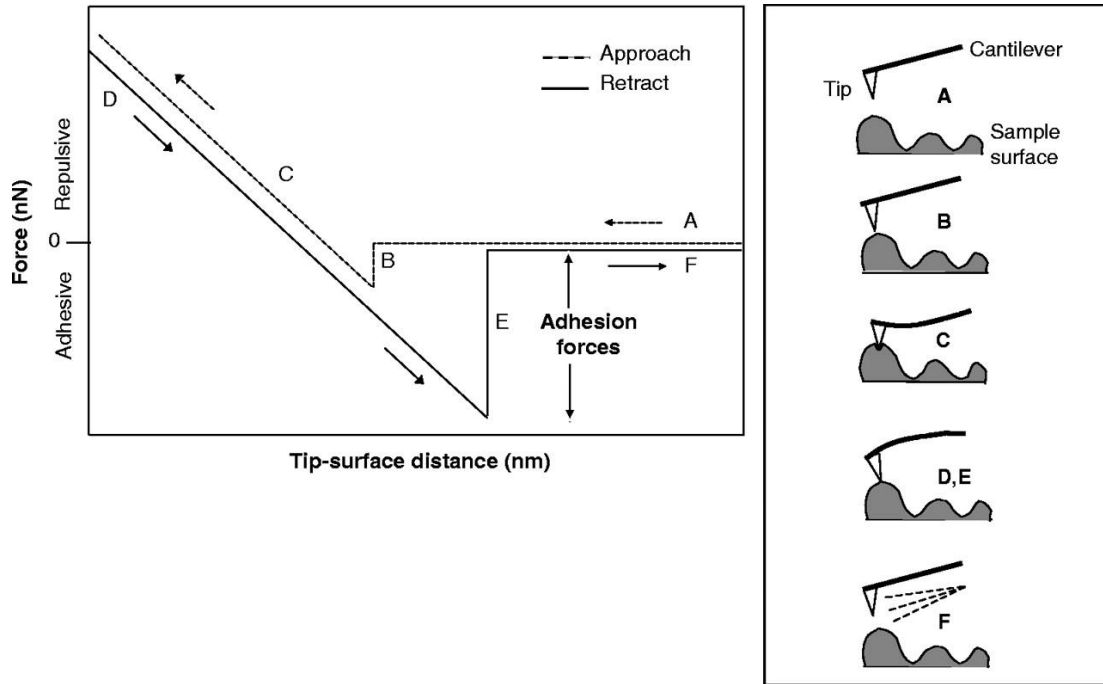


Figure 6 – Courbes approche-retrait. Le cantilever s'approche de la surface de l'échantillon (A). Une légère force d'attraction (forces de van der Waals) entre la pointe et la surface permet leur contact (B). L'indentation de l'échantillon à force constante provoque la déflexion du cantilever (C). En s'éloignant, les forces d'adhésion font se contracter le cantilever (D, E). Lorsque la force de rétraction est plus élevée que la force d'adhésion, la sonde se détache de la surface (F). D'après [16].

À partir des courbes de force-indentation, il est possible de calculer le module d'élasticité (module de Young) ou la rigidité. Le module de Young correspond à la résistance de l'échantillon à une déformation élastique. Il est mesuré en pascal (Pa). Différents modèles peuvent être utilisés pour calculer ce module [17]. Dans le cas d'une pointe pyramidale sur une surface plane, le modèle de Hertz est préféré, avec pour formule :

$$F = \frac{3}{4} \frac{(E)}{1-\nu^2} \tan \theta \delta^2 \quad (2)$$

où F est la force appliquée à l'échantillon, E le module de Young, ν est le coefficient de Poisson, qui est considéré égal à 0,5 en milieu liquide, δ l'indentation et θ le demi-angle de la pyramide, soit $17,5^\circ$ pour les MLCT. Les pointes pyramidales permettent de sonder localement les propriétés mécaniques de l'échantillon, et en particulier, des cellules. C'est ce modèle qui a été utilisé pour ces travaux.

V- RÉSULTATS

1) Microcontact-printing

Afin de visualiser les motifs imprimés sous forme de réseau sur les lames de verre qui serviront de support d'incubation pour les cellules, l'étape de μ CP a été réalisée grâce à l'appareil Innostamp 40TM avec de la streptavidine marquée à la Cy3 et avec de la fibronectine. J'ai utilisé la streptavidine fluorescente pour faire la preuve du dépôt protéique, puis j'ai utilisé la fibronectine pour immobiliser les cellules. Le fluorophore Cy3 peut être excité à une longueur d'onde de 532nm et les motifs sont alors visibles par microscope à fluorescence (fig. 7).

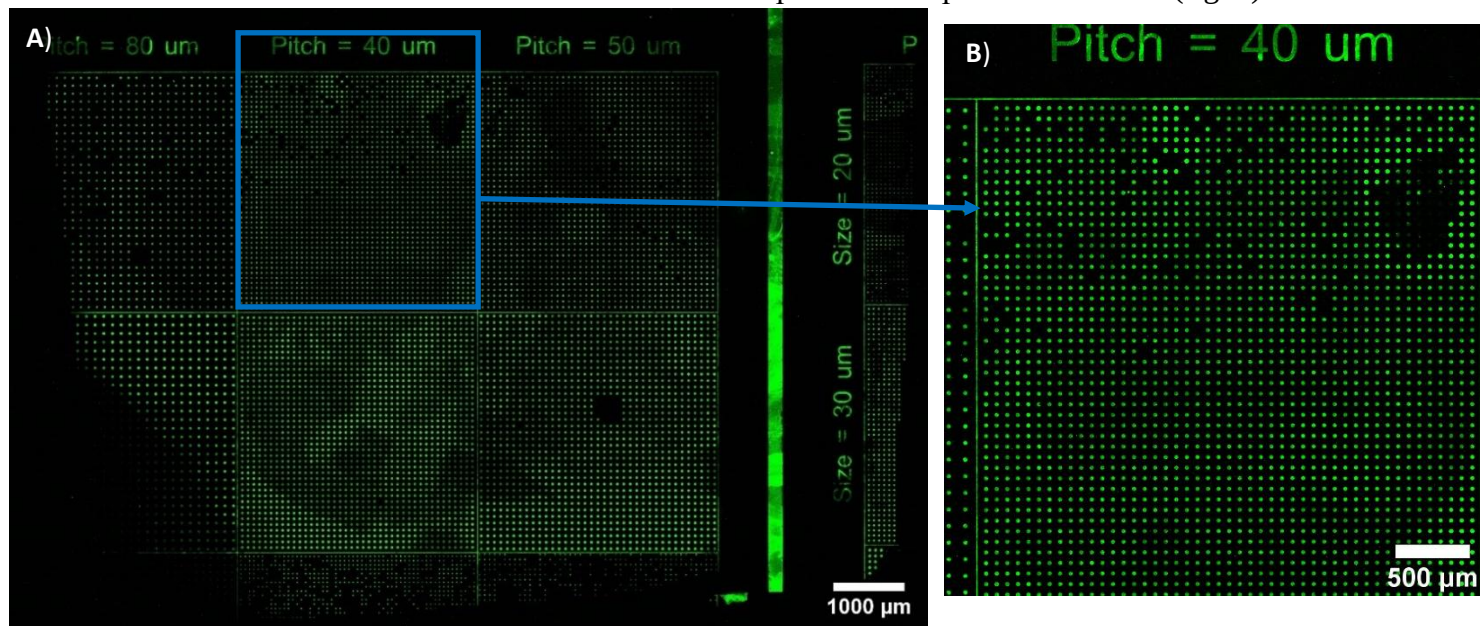


Figure 7 – Streptavidine imprimée avec l’Innostamp 40TM selon un réseau. En A, image en fluorescence du dépôt de streptavidine-Cy3 par μ CP suivant des motifs de différentes tailles et différents espacements. En B, zoom sur une zone de l’image A.

Comme le montre la figure 7, la streptavidine marquée à la Cy3 fluorescente a recouvert une grande zone de la lame de verre grâce au protocole de μ CP d’InnoStamp 40TM. En utilisant de la fibronectine, il sera possible d’y immobiliser des cellules.

Les cellules PC3-GFP sontensemencées sur un réseau composé de motifs de fibronectine, molécule servant de protéine d’adhésion. La lignée PC3-GFP est une lignée cellulaire humaine dérivée d’un adénocarcinome de la prostate et ayant été modifiée afin de produire la Green Fluorescent Protein (GFP). Les cellules produisent alors un signal fluorescent vert, utile pour la visualisation. Après une nuit d’incubation, les cellules PC3-GFP se placent selon la forme des motifs de fibronectine du réseau (fig. 8). Sur cette image, plus de 5 000 cellules se sont immobilisées sur des motifs de fibronectine avec un taux de remplissage supérieur à 50%.

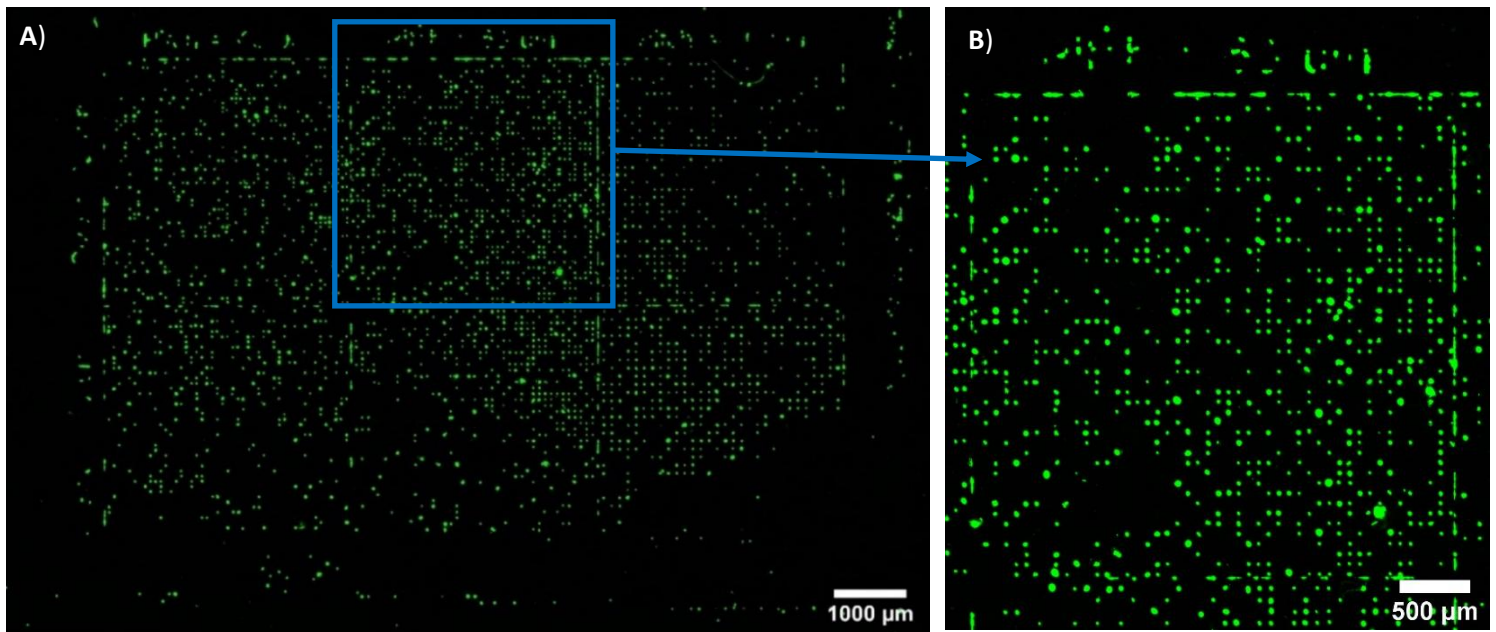


Figure 8 – Matrice de cellules PC3-GFP. En A, image en fluorescence des cellules PC3-GFP ayant adhéré sur les motifs du réseau de fibronectine imprimé avec l’Innostamp 40TM. Les cytoplasmes des cellules expriment la GFP (vert). En B, zoom sur une zone de l’image A.

2) Microscopie à force atomique

En disposant les cellules PC3-GFP sous la forme de cette matrice ordonnée, il est alors possible de caractériser leurs propriétés mécanobiologiques de manière automatisée par AFM. Cependant, afin de vérifier que cette immobilisation ne biaise pas les mesures, un contrôle doit être réalisé. Ce contrôle consiste en la mesure des propriétés mécaniques par AFM des cellules PC3-GFP immobilisées sur une lamelle de verre préalablement recouverte de fibronectine dans sa totalité et sans prendre la forme d’un motif. J’ai effectué des mesures sur une population de cinq à sept cellules à trois vitesses d’indentation différentes (5µm/s ; 10µm/s ; 50µm/s) et j’ai comparé les résultats aux mesures relevées sur neuf cellulesensemencées sur une lamelle des motifs carrés de fibronectine à ces mêmes vitesses d’indentation.

Les modules de Young de ces différentes populations ont été déterminés en ajustant le modèle de Hertz pour une pointe conique (éq. 2) aux données expérimentales en considérant $\nu = 0,5$ et $\theta = 17,5^\circ$. La figure 9A présente un exemple de cette fonction ajustée sur une courbe d’indentation mesurée expérimentalement sur une cellule PC3-GFP disposée sur un motif carré de fibronectine pour une vitesse d’indentation de 5µm/s. Les valeurs des modules de Young calculées en suivant ce modèle ont permis de représenter les cartes d’élasticité (fig. 9B) de chaque cellule. Chaque valeur du module de Young correspond à un pixel de la carte. Plus la couleur du pixel est jaune puis blanc, plus la valeur du module de Young est élevée et plus la cellule est rigide. La courbe ajustée de la figure 9A représente un pixel de la carte d’élasticité de la figure 9B.

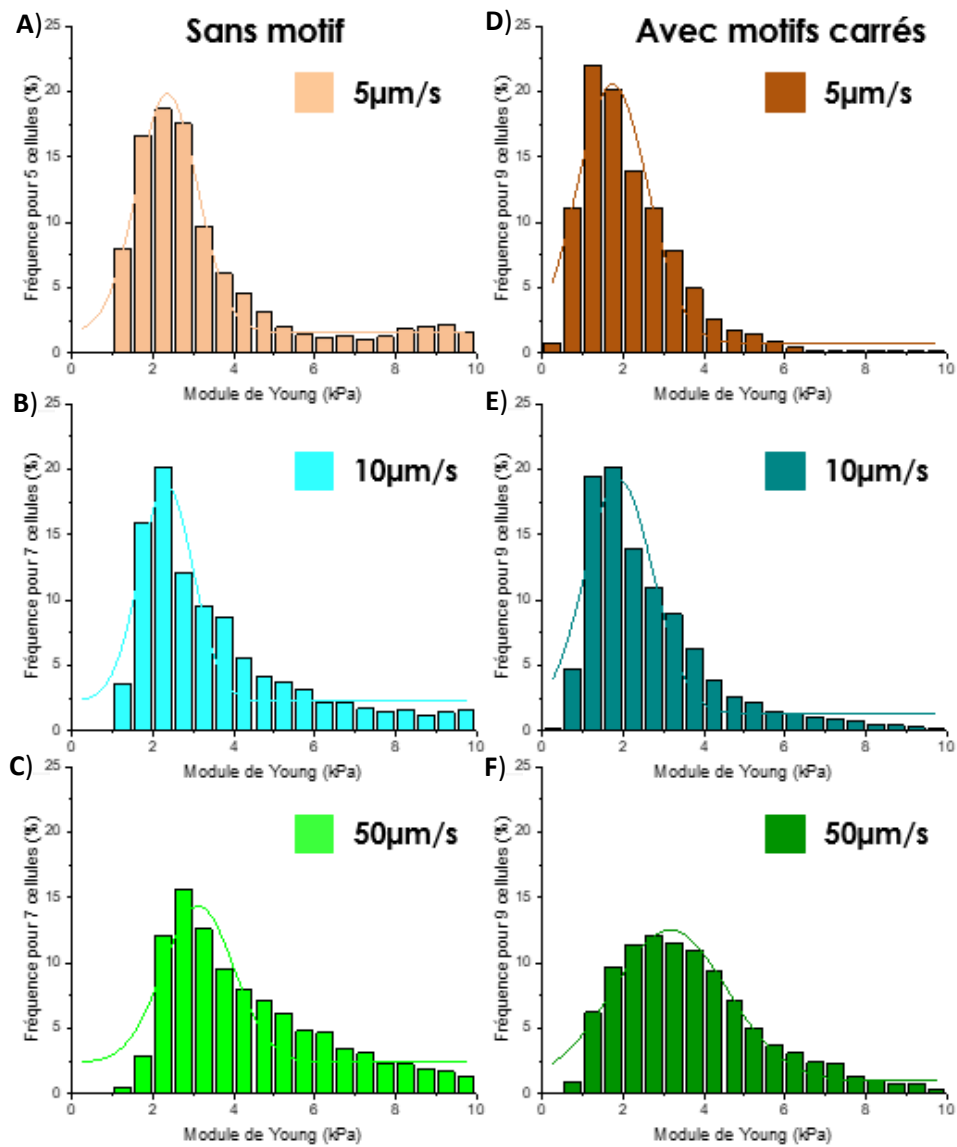


Figure 10 – Distribution du module élastique mesuré de populations cellulaires de PC3-GFP. En A, B et C, les mesures sont réalisées sur une population cellulaire PC3-GFP de cinq à sept cellules disposées sur une lamelle recouverte de fibronectine ne suivant aucun réseau et à trois vitesses d'indentation (A : 5µm/s ; B : 10µm/s ; C : 50µm/s). En D, E et F, les mesures sont réalisées sur une population cellulaire PC3-GFP de neuf cellules disposées sur des motifs de fibronectine carrés et à trois vitesses d'indentation (D : 5µm/s ; E : 10µm/s ; F : 50µm/s).

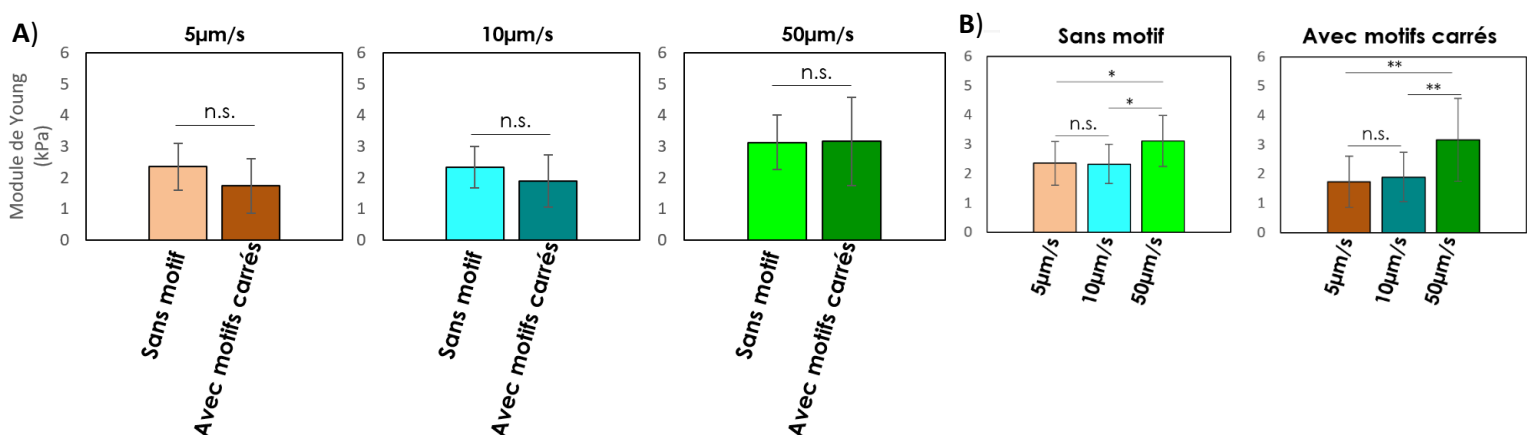


Figure 11 – Influence des motifs et de la vitesse d'indentation sur le module de Young mesuré de populations cellulaires de PC3-GFP. En A, comparaison des valeurs médianes du module élastique mesuré entre une population cellulaire disposée sur une lamelle recouverte de fibronectine ne suivant aucun réseau (barres de gauche) et une population cellulaire disposée sur des motifs de fibronectine carrés (barres de droite) et à trois vitesses d'indentation (5µm/s ; 10µm/s ; 50µm/s, de gauche à droite). En B, comparaison des valeurs médianes du module élastique mesuré à trois vitesses d'indentation différentes (5µm/s ; 10µm/s ; 50µm/s, de gauche à droite) pour une population cellulaire disposée sur une lamelle recouverte de fibronectine ne suivant aucun réseau (à gauche) et une population cellulaire disposée sur des motifs de fibronectine carrés (à droite). Les valeurs médianes sont calculées à partir des données de la figure 10. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des différentes mesures effectuées. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Student : n.s. = non significatif ; * = p-value ≤ 0,1 ; ** = p-value ≤ 0,05.

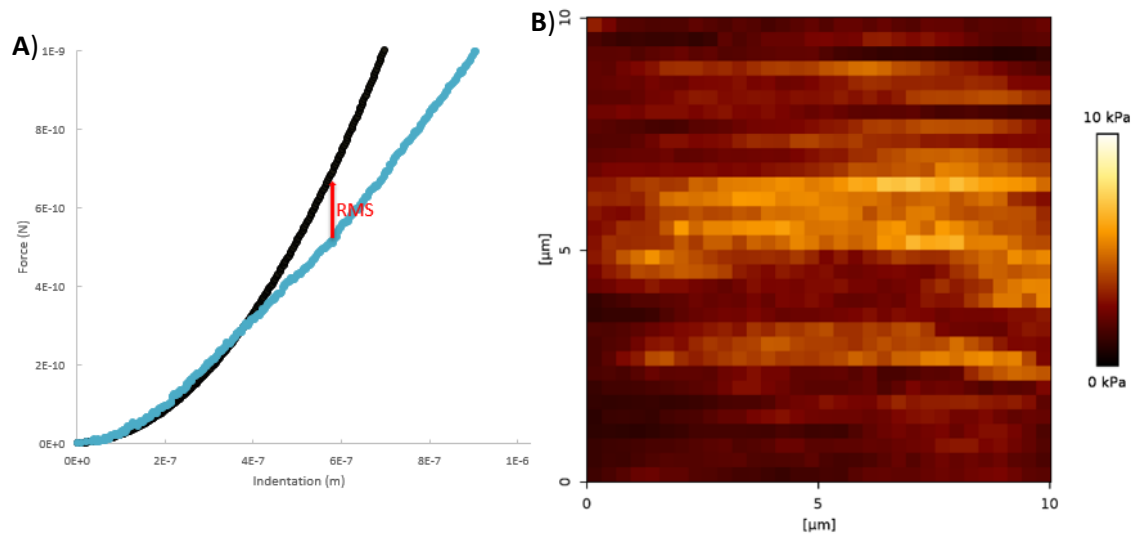


Figure 9 – Élasticité de la surface cellulaire d’une cellule PC3-GFP disposée sur un motif de fibronectine carré. En A, courbes d’indentation en fonction de la force pour un point d’une cellule PC3-GFP. Les données expérimentales sont représentées en bleu, l’ajustement en noir suit le modèle de Hertz considérant une pointe conique de demi-angle $17,5^\circ$ et pour $\nu = 0,5$. La flèche rouge représente une RMS, c’est-à-dire l’écart, en force, entre l’expérience et le modèle. En B, cartographie de l’élasticité de la surface cellulaire d’une cellule PC3-GFP. La carte a été enregistrée sur une zone de $10\mu\text{m}^2$ au centre de la cellule.

La figure 10 compare l’influence de la vitesse d’indentation et des motifs sur une population de cellules PC3-GFP. 1 024 mesures ont été effectuées sur chaque cellule et sur cinq à neuf cellules. Toutes les valeurs mesurées ont été représentées sous forme d’histogramme de distribution. L’influence de la vitesse d’indentation suit une tendance similaire pour les cellules ensemencées avec motifs carrés de fibronectine (fig. 10D, E et F) ou sans motif (fig. 10A, B et C). En effet, en augmentant la vitesse d’indentation jusqu’à $10\mu\text{m/s}$, le module élastique mesuré des cellules PC3-GFP ne change pas dans les deux cas. Cependant, au-dessus de $10\mu\text{m/s}$, le module de Young semble plus élevé, passant de $2,36 \pm 0,75\text{kPa}$ à $5\mu\text{m/s}$ sans motif (fig. 10A), $1,73 \pm 0,87\text{kPa}$ avec motifs (fig. 10D), à $3,13 \pm 0,87\text{kPa}$ à $50\mu\text{m/s}$ (fig. 10C), $3,16 \pm 1,41\text{kPa}$ (fig. 10F) respectivement. D’autre part, le fait d’incuber les cellules sur ces motifs carrés de fibronectine ou non ne change pas statistiquement le module de Young mesuré des cellules PC3-GFP. Les valeurs retrouvées à $10\mu\text{m/s}$ sont de $2,33 \pm 0,67\text{kPa}$ sans motif (fig. 10B) et $1,90 \pm 0,84\text{kPa}$ avec motifs (fig. 10E).

Ces valeurs ont été obtenues en ajustant une distribution gaussienne aux histogrammes de la figure 10 et sont comparées deux à deux pour chaque vitesse en figure 11. Il est à noter cependant, que les histogrammes des cellules ensemencées sans motif ne suivent pas le modèle d’une gaussienne et présentent un étalement bien plus grand que pour les cellules sur motif. Ce résultat confirme l’hypothèse que les motifs donnent une meilleure résolution statistique, mais reste à confirmer avec un test statistique sur les différents écart-types de distribution.

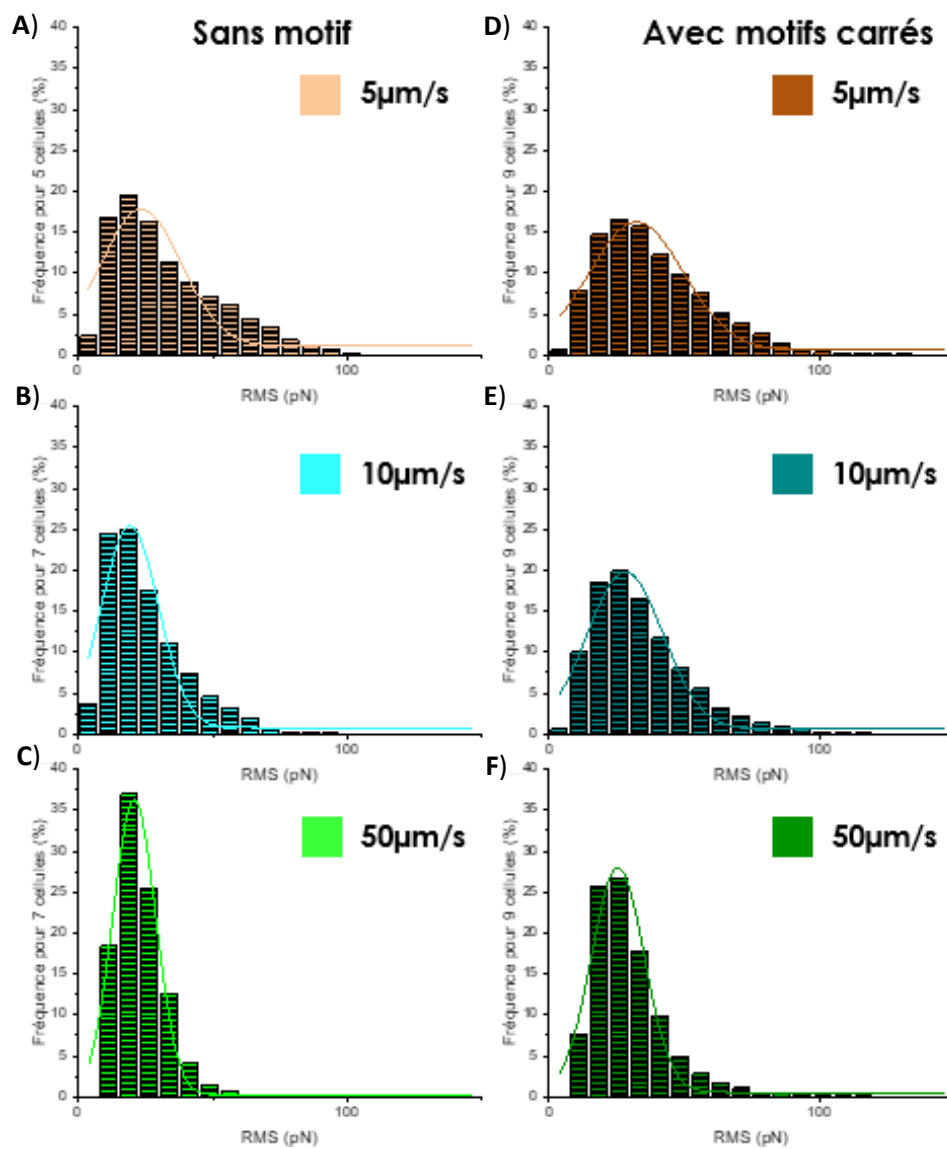


Figure 12 – Distribution de la RMS calculée sur des populations cellulaires de PC3-GFP. En A, B et C, les mesures sont réalisées sur une population cellulaire PC3-GFP de cinq à sept cellules disposées sur une lamelle recouverte de fibronectine ne suivant aucun réseau et à trois vitesses d'indentation (A : 5 $\mu\text{m/s}$; B : 10 $\mu\text{m/s}$; C : 50 $\mu\text{m/s}$). En D, E et F, les mesures sont réalisées sur une population cellulaire PC3-GFP de neuf cellules disposées sur des motifs de fibronectine carrés et à trois vitesses d'indentation (D : 5 $\mu\text{m/s}$; E : 10 $\mu\text{m/s}$; F : 50 $\mu\text{m/s}$).

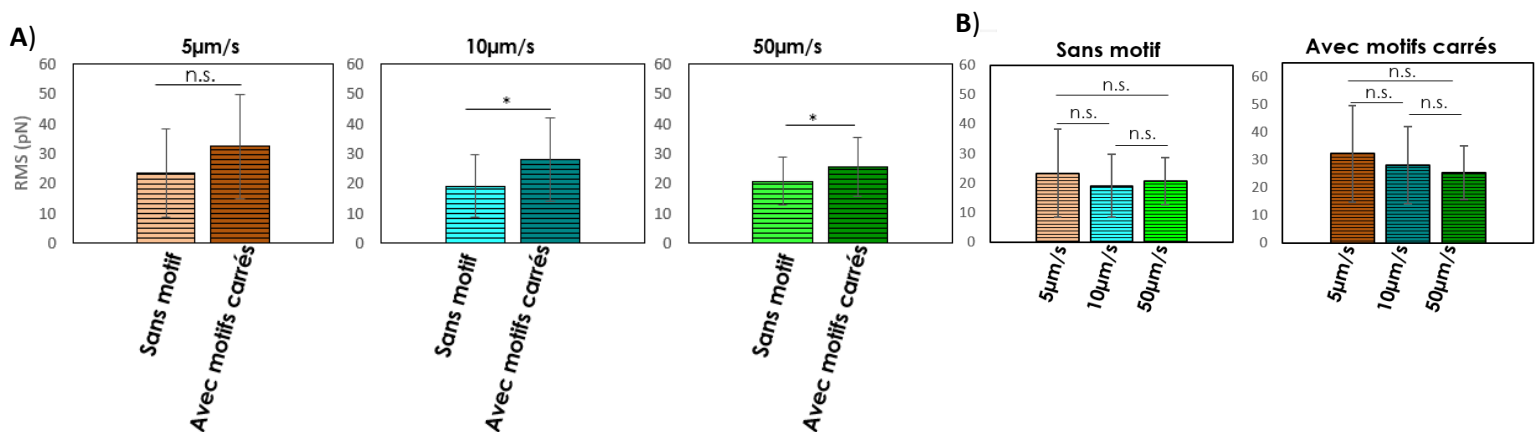


Figure 13 – Influence des motifs et de la vitesse d'indentation sur la RMS calculée de populations cellulaires de PC3-GFP. En A, comparaison des valeurs médianes de la RMS calculée entre une population cellulaire disposée sur une lamelle recouverte de fibronectine ne suivant aucun réseau (barres de gauche) et une population cellulaire disposée sur des motifs de fibronectine carrés (barres de droite) et à trois vitesses d'indentation (5 $\mu\text{m/s}$; 10 $\mu\text{m/s}$; 50 $\mu\text{m/s}$, de gauche à droite). En B, comparaison des valeurs médianes de la RMS calculée à trois vitesses d'indentation différentes (5 $\mu\text{m/s}$; 10 $\mu\text{m/s}$; 50 $\mu\text{m/s}$, de gauche à droite) pour une population cellulaire disposée sur une lamelle recouverte de fibronectine ne suivant aucun réseau (à gauche) et une population cellulaire disposée sur des motifs de fibronectine carrés (à droite). Les valeurs médianes sont calculées à partir des données de la figure 12. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des différentes mesures effectuées. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Student : n.s. = non significatif ; * = p-value $\leq 0,1$.

J'ai utilisé le modèle gaussien comme première approximation, mais, par la suite, il sera nécessaire d'utiliser une autre loi de distribution pour suivre au mieux la tendance de ces histogrammes et, le cas échéant, suivre des pics secondaires. Cela signifie également que les valeurs médianes du module élastique mesurées pourront être différentes. Les barres d'erreur de la figure 11 correspondent à la largeur du pic de la gaussienne à mi-hauteur (2σ).

La distribution des Root Mean Squares (RMS) est également représentée (fig. 12) et comparée pour les mêmes populations cellulaires. La RMS est une façon de quantifier la qualité de la modélisation de l'élasticité par le modèle de Hertz. C'est l'écart entre la mesure et le modèle de Hertz. Comme le montre la figure 13B, la vitesse d'indentation n'influence pas les valeurs de RMS, que ce soit pour la population cellulaire ensemencée sur une lamelle recouverte de fibronectine ne suivant aucun motif ou pour la population cellulaire ensemencée sur des motifs carrés de fibronectine. En effet, en augmentant la vitesse d'indentation jusqu'à 50 $\mu\text{m/s}$, la RMS calculée des cellules PC3-GFP ne change pas dans les deux cas. Aux vitesses de 5 et 10 $\mu\text{m/s}$, les RMS ne sont pas influencées par les motifs. Les valeurs retrouvées pour les cellules ensemencées sans suivre de réseau sont de $23,36 \pm 14,90\text{pN}$ à 5 $\mu\text{m/s}$ et $19,12 \pm 10,57\text{pN}$ à 10 $\mu\text{m/s}$ (fig. 12A et B et fig. 13B) ; la différence n'est pas significative.

En revanche, il y a une différence de qualité d'ajustement du modèle sur les valeurs expérimentales entre les cellules ensemencées sur des motifs de fibronectine carrés et sans motif. En effet, en comparant les valeurs des RMS entre ces deux populations, la valeur des RMS diffère à partir de 10 $\mu\text{m/s}$. Les valeurs retrouvées à 10 $\mu\text{m/s}$ sont de $19,12 \pm 10,57\text{pN}$ sans motif et $28,16 \pm 13,97\text{pN}$ avec motifs (fig. 12B et E et fig. 13A). Comme pour les valeurs du module de Young mesuré, ces valeurs ont été obtenues en ajustant une distribution gaussienne aux histogrammes de la figure 12 et sont comparées à la figure 13. Les barres d'erreur correspondent à la largeur du pic de la gaussienne à mi-hauteur. On peut aussi voir que l'erreur entre la mesure et le modèle choisi se réduit à plus grande vitesse.

3) Automatisation des mesures AFM

Afin de pouvoir automatiser les mesures de courbes de force en AFM, un script Jython permettant de piloter l'AFM a été développé. Le script que j'utilise se base sur celui publié par Séverac *et al.* [13] et adapté pour des cellules humaines immobilisées directement sur une surface de verre. Dans ce cas, l'utilisateur doit indiquer les coordonnées de la première cellule de la matrice, celles de la dernière, le nombre de cellules entre elles, ainsi que le nombre de mesures à réaliser par cellule. Le script peut alors calculer la distance entre chaque cellule. La pointe AFM va ensuite se placer sur la première cellule, l'indenter et enregistrer les courbes de force, puis se déplacer automatiquement vers la deuxième cellule et ainsi de suite.

Avant son utilisation, certains contrôles doivent être effectués. Il s'agit notamment de calculer l'erreur lors du déplacement x ; y de la pointe AFM due à la platine motorisée. La figure 14 permet d'observer ces erreurs sur les axes y et x , respectivement.

Une première correction a été implémentée sur les axes y et x . Cependant, les erreurs perdurent sur les deux axes, bien qu'elles aient été réduites, comme le montre la figure 15. Sur l'axe y , un décalage de $-1,71\mu\text{m}$ est retrouvé. Sur l'axe x , il est de $0,71\mu\text{m}$.

Après ces quelques corrections, j'ai été capable de mesurer une dizaine de cellules disposées sur une matrice de manière automatisée (fig. 16).

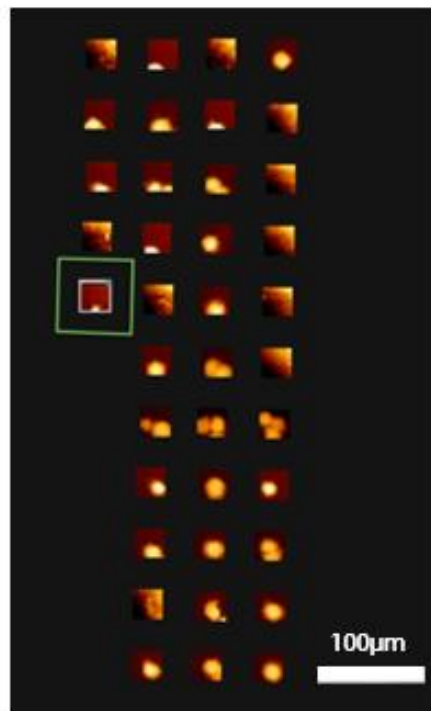


Figure 16 – Exécution du script sur les cellules PC3-GFP. Images AFM de topographie de surface prises pendant l'exécution du script sur des cellules PC3-GFP ordonnées sous forme d'une matrice réalisée avec l'appareil InnoStamp 40TM. L'encadré vert représente la cellule en cours d'indentation.

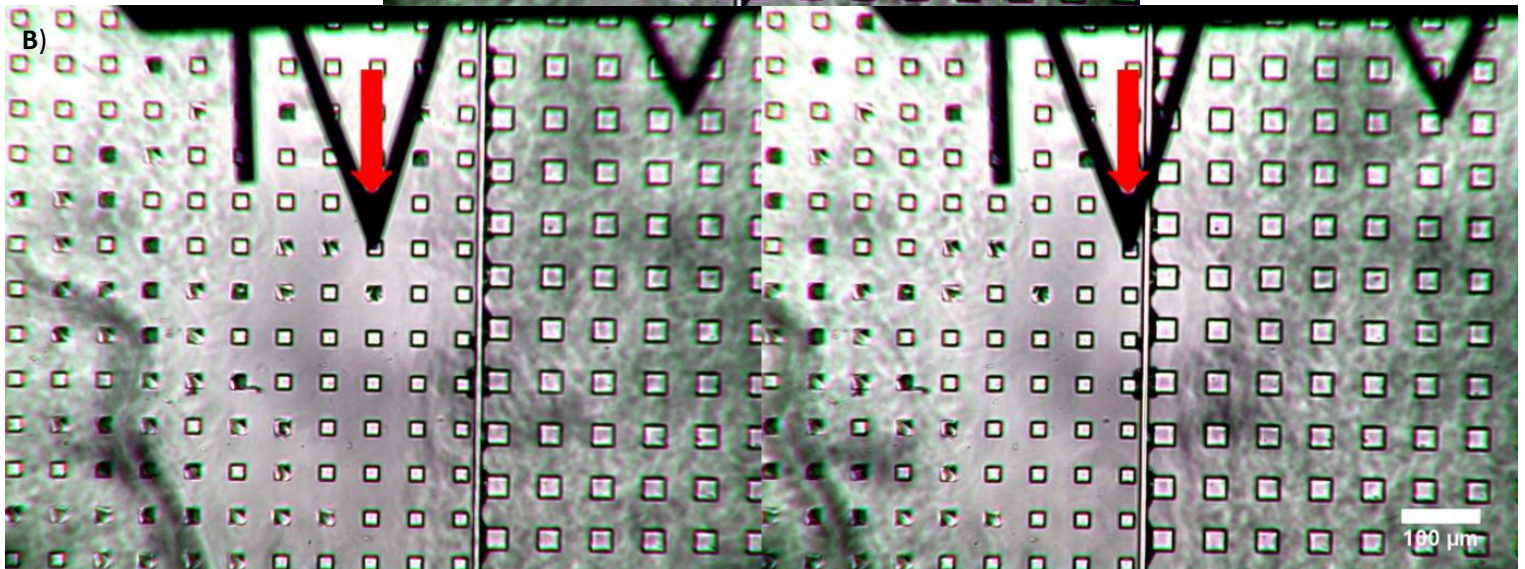
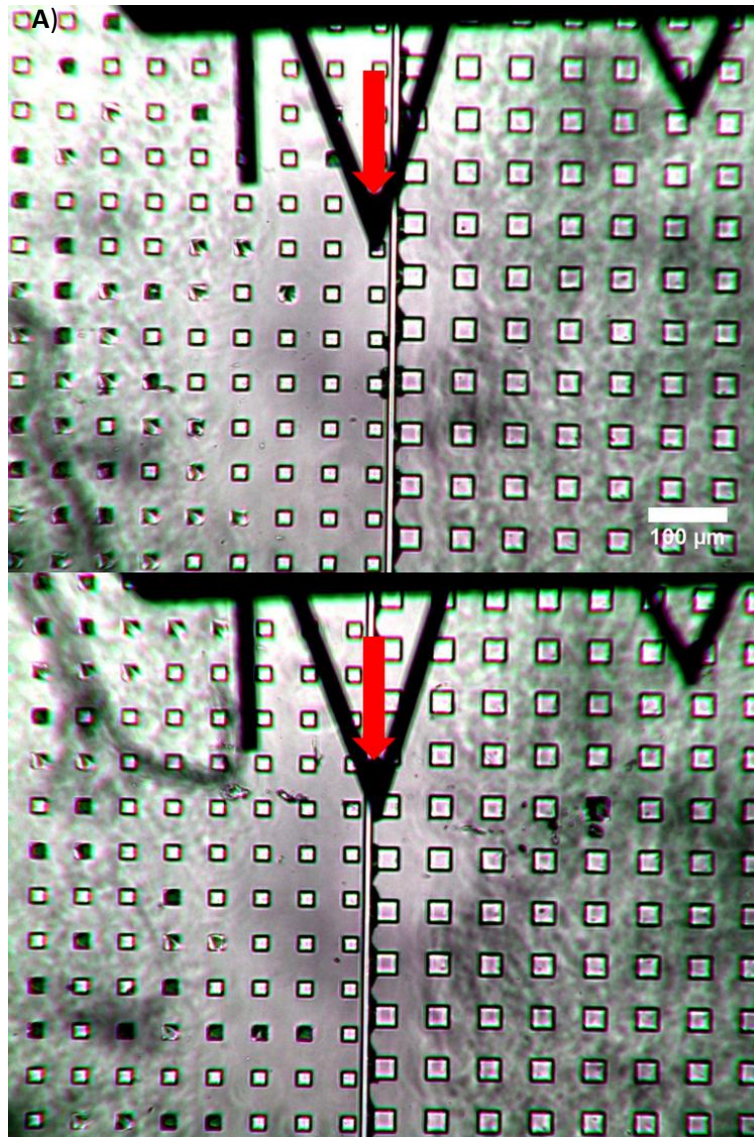


Figure 14 – Visualisation de la déviation de l'automatisation sur l'axe y et x lors de l'exécution de l'algorithme. En A, images optiques prises à la première (haut) et à la onzième (bas) étape du script d'automatisation réalisées sur un timbre de PDMS servant à imprimer la fibronectine. En B, images optiques prises à la 1ère (droite) et à la 23ème (gauche) étape du script d'automatisation réalisées sur le même timbre de PDMS. Les flèches rouges indiquent les cantilevers utilisés pour l'acquisition des données. Grossissement X5.

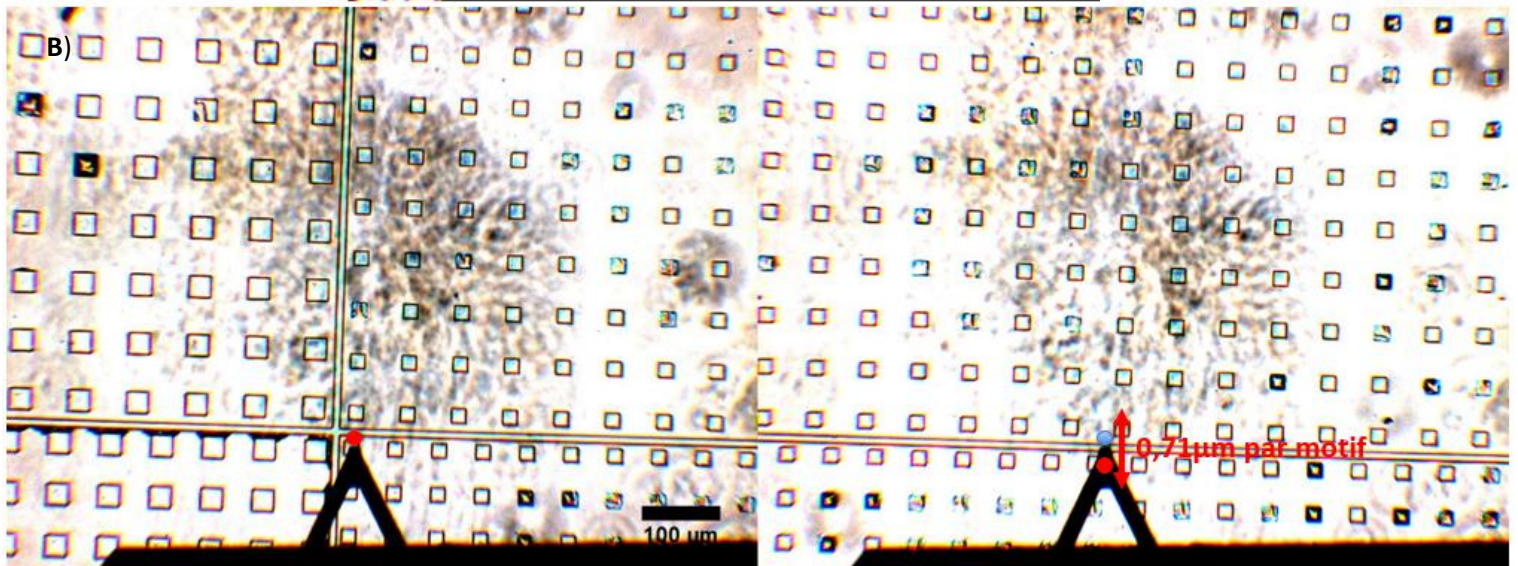
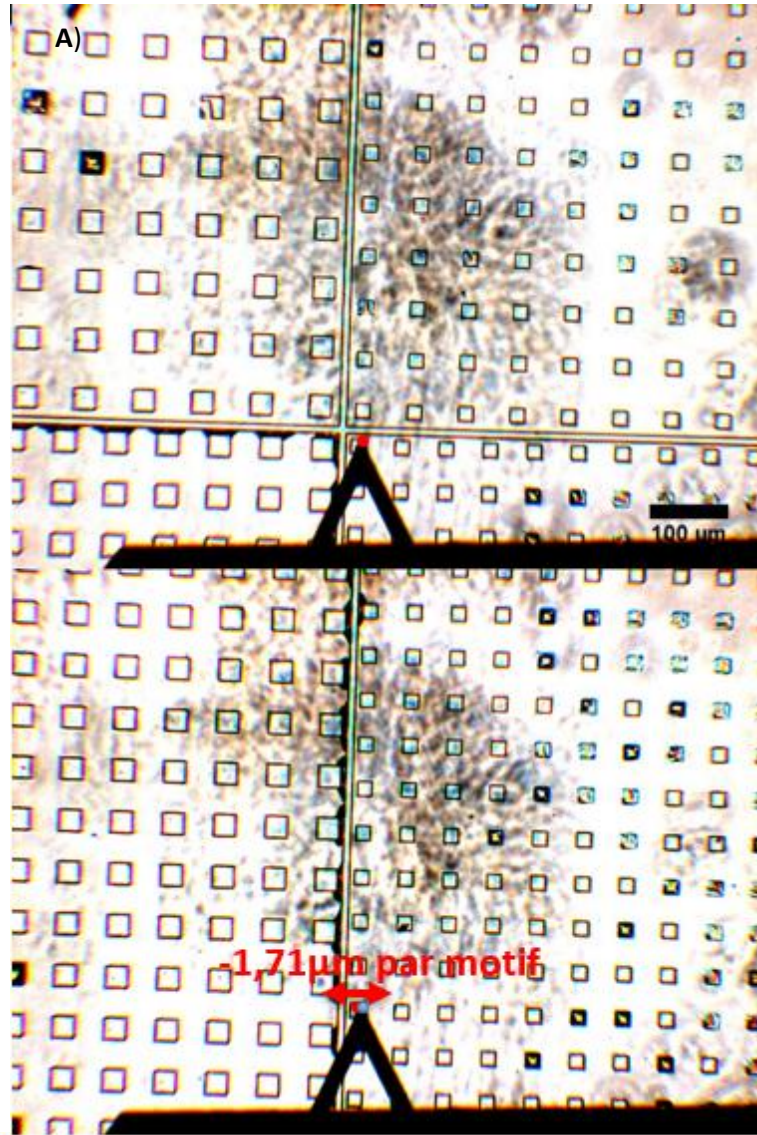


Figure 15 – Visualisation de la déviation de l'automatisation sur l'axe y et x lors de l'exécution de l'algorithme après une première correction de l'erreur. En A, images optiques prises à la première (haut) et à la onzième (bas) étape du script d'auto d'automatisation réalisées sur un timbre de PDMS servant à imprimer la fibronectine. En B, images optiques prises à la 1ère (gauche) et à la 111ème (droite) étape du script d'automatisation réalisées sur un timbre de PDMS servant à imprimer la fibronectine. Les points rouges représentent le placement attendu de la pointe AFM, les points bleus représentent le placement observé de la pointe AFM et les flèches rouges indiquent la déviation entre les placements attendus et observés de la pointe AFM. Grossissement X5.

VI- DISCUSSION

La combinaison des techniques de μ CP et d'AFM montre ici qu'il est possible de développer une méthode pour l'obtention de courbes de force sur des cellules, à haut débit.

Grâce au μ CP, des matrices ordonnées de cellules immobilisées de manière sélective sur de la fibronectine ont pu être fabriquées. Les cellules PC3-GFP ont adhéré sur des motifs carrés de fibronectine avec un taux de remplissage de plus de 50%. Ce taux de remplissage n'est certes pas suffisant et pourrait être amélioré en modifiant la forme des motifs de fibronectine, le choix de la protéine d'adhésion (collagène, laminine), les conditions d'incubation (en augmentant le temps d'incubation des cellules) et le type de cellules. Cependant, il est possible de présenter une telle matrice de cellules pour de l'automatisation AFM si une image optique de chaque zone à mesurer est réalisée avant son analyse par indentation. Cependant, c'est à l'utilisateur de faire le tri et de ne considérer que les courbes de force réalisées sur les zones présentant des cellules. Sachant que les cellules sont moins rigides que leur substrat en verre, il pourrait également être possible de ne considérer que les courbes de force rendant compte d'un module de Young inférieur à 10 ou 20kPa. À terme, il serait envisageable de considérer un script d'automatisation capable de détecter les cellules et de ne réaliser des courbes de force que sur celles-ci.

La préparation des cellules immobilisées de façon aléatoire sur la surface de la lamelle et sans prendre la forme d'un réseau et celle d'une matrice de cellules ensemencées sur une lamelle présentant un réseau de motifs carrés de fibronectine ont été réalisées dans des conditions expérimentales similaires ; il en est de même lors des mesures des propriétés mécaniques de ces deux types de matrices. L'analyse de l'influence des motifs a montré des valeurs de module de Young similaires : $2,33 \pm 0,67\text{kPa}$ sans motif et $1,90 \pm 0,84\text{kPa}$ avec motifs. Bien que les valeurs des écart-types calculées avec le modèle gaussien soient similaires pour les cellules immobilisées de façon aléatoire ou non, les histogrammes de la figure 10A et B montrent un premier pic aux alentours de 2kPa, suivi d'un étalement des valeurs jusqu'à 10kPa, qui disparaît sur les histogrammes de la figure 10D et E. Le fait de contraindre les cellules sur un motif en particulier semble homogénéiser la population cellulaire en comparaison avec des cellules s'étalant sans contrainte de motif. Ce résultat est néanmoins à confirmer en utilisant un autre modèle que celui utilisé sur les cellules immobilisées de manière aléatoire. De plus, il serait maintenant intéressant d'étudier l'influence d'autres formes que le carré, par exemple, des triangles ou des ronds.

Cependant, il a été montré, dans cette étude, qu'une vitesse d'indentation élevée augmentait la valeur du module de Young apparent : $1,73 \pm 0,87\text{kPa}$ à $5\mu\text{m/s}$ à $3,16 \pm 1,41\text{kPa}$ à $50\mu\text{m/s}$; ce qui signifie que l'appareil mesure les cellules comme plus rigides. Or, la tendance est similaire dans le cas des cellules contraintes par des motifs carrés de fibronectine et dans celui des cellules non-contraintes. Il est alors tout à fait possible d'envisager de faire des mesures d'automatisation à une vitesse d'indentation élevée, de l'ordre de $50\mu\text{m/s}$, si les valeurs du module élastique mesurées sont toutes réalisées et comparées à une même vitesse d'indentation sur différentes populations cellulaires. Les analyses ne prétendent alors pas mesurer une valeur de module de Young absolue, mais une valeur de module de Young mesurée (ou apparente) pour des conditions d'expérimentation particulières et comparable dans ces mêmes conditions d'expérimentation. Par conséquent, il est tout à fait envisageable de tester une vitesse d'indentation encore plus élevée lors de prochaines expériences, d'autant plus que les RMS semblent diminuer à plus grande vitesse pour les cellules ensemencées sur des motifs carrés de fibronectine.

En revanche, les analyses des RMS montrent que le modèle ne suit pas parfaitement la tendance des valeurs expérimentales. Il pourrait alors être intéressant d'utiliser un autre modèle plus adapté. L'équipe de Wang [18] a considéré deux forces pour son modèle : la force de répulsion intermoléculaire considérant le module élastique E et la force de tension dans le plan portée, d'une part, par la fibre d'actine en résistant à la force d'indentation (porteuse de tension), et, d'autre part, par le microtubule en y cédant (porteur de compression). Cette deuxième force tient compte de la précontrainte intracellulaire σ . Les auteurs ont appelé ce modèle le mécanome cellulaire. Il leur a permis de mieux s'ajuster aux données expérimentales des courbes de force. Cependant, ils ne montrent pas d'analyse quantitative de type RMS ou autre.

En perspective à ce projet, il reste maintenant à réaliser quelques corrections sur le script afin de finaliser l'automatisation pour générer un grand nombre de données compatibles avec les exigences des algorithmes de Machine Learning. De plus, nous comparerons différentes lignées cellulaires avec différents degrés de malignité. La lignée PC3-GFP, à haute tumorigénicité, sera comparée aux lignées LNCaP, à faible tumorigénicité, et RWPE-1, une lignée non-cancéreuse. Un travail sera également fait sur la forme de l'indenteur en testant d'autres formes comme des sphères ou des pyramides et éventuellement sa fonctionnalisation chimique ainsi que sur d'autres formes de motifs comme des cercles ou des triangles pour trouver les paramètres les plus appropriés pour l'automatisation et augmentant la précision de la mesure. Enfin, grâce à l'analyse par Machine Learning sur de grandes quantités de données

produites et à plusieurs paramètres tels que la rigidité, l'adhérence, nous espérons pouvoir discriminer au mieux les différentes populations cellulaires.

VII- CONCLUSION

Les traitements biochimiques des lamelles de verre par la méthode de μ CP, permettant d'une part, l'attachement spécifique des cellules aux protéines de l'ECM, et empêchant d'autre part, l'adhésion de ces cellules aux molécules passivantes, proposent une méthode d'immobilisation cellulaire compatible avec une analyse automatisée. De plus, ce travail montre que le fait de contraindre les cellules sur des motifs carrés de fibronectine ne modifie pas leur rigidité mesurée par AFM et aurait tendance à homogénéiser ce paramètre mécanobiologique sur une population cellulaire. Enfin, les essais d'automatisation du script Jython ont pu souligner les étapes à améliorer, à savoir l'erreur due au mouvement de la platine motorisée, également consommatrice en temps. Afin de réduire le temps sur les mesures, il a été montré que les analyses peuvent être effectuées à vitesse élevée, ce qui permettrait d'augmenter le nombre de cellules analysées.

VIII- RÉFÉRENCES

- [1] Foncy *et al.* Fabrication of biomolecule microarrays for cell immobilization using automated microcontact printing, *Methods in Molecular Biology* (2018)
- [2] Lekka *et al.* Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy, *European Biophysics Journal* (1999)
- [3] Smolyakov *et al.* Elasticity, adhesion and nanotubes extrusion on breast cancer cells provide a signature of their invasive potential, *ACS Applied Materials and Interface* (2016)
- [4] Bao *et al.* Cell and molecular mechanics of biological materials, *Nature Materials* (2003)
- [5] Xu *et al.* Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells, *PLoS One* (2012)
- [6] Wu *et al.* A comparison of methods to assess cell mechanical properties, *Nature methods* (2018)
- [7] Dulińska *et al.* Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* (2006)
- [8] The NanoWizard AFM handbook, *JPK Instruments* (2005)
- [9] Lange *et al.* Microcontact printing of DNA molecules, *Analytical Chemistry* (2004)

- [10] Lagraulet *et al.* InnoStamp 40TM and InnoScan 1100ALTM: a complete automated platform for microstructured cell arrays, *Nature Methods* (2015)
- [11] Proa-Coronado *et al.* Beyond the paradigm of nanomechanical measurements on cells using AFM: an automated methodology to rapidly analyse thousands of cells, *Nanoscale Horizons* (2020)
- [12] El-Kirat-Chatel *et al.* Nanoscale analysis of caspofungin-induced cell surface remodelling in *Candida albicans*, *Nanoscale* (2013)
- [13] Séverac *et al.* Automation of bio-atomic force microscope measurements on hundreds of *C. albicans* cells, *Journal of Visualized Experiments* (2021)
- [14] Gavara, A beginner's guide to atomic force microscopy probing for cell mechanics, *Microscopy Research and Technique* (2017)
- [15] Lévy *et al.* Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods, *Nanotechnology* (2002)
- [16] Shahin *et al.* Glucocorticoids remodel nuclear envelope structure and permeability, *Journal of Cell Science* (2005)
- [17] Krieg *et al.* Atomic force microscopy-based mechanobiology, *Technical Reviews* (2019)
- [18] Wang *et al.* Mechanomics biomarker for cancer cells unidentifiable through morphology and elastic modulus, *Nano Letters* (2021)

