



ECOLE DOCTORALE, PHYSIQUE CHIMIE, SCIENCES DE LA TERRE
DE L'UNIVERS ET DE L'INGENIEUR

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DÉPARTEMENT DE PHYSIQUE

ANNEE :

N° d'ordre :

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Optique - Laser

Présentée et soutenue publiquement par

FATOU NDOYE

Caractérisation des propriétés mécaniques de cellules cancéreuses en utilisant un dispositif de pince optique

Soutenance le 30/01/2017

JURY

AHMADOU WAGUE	Président
M. MANSOUR FAYE	Rapporteur interne
MAMADOU MBODJ	Rapporteur externe
ABABACAR S. NDAO	Examineur
FATOU KA GUEYE NDIAYE	Examineur
OUMAR KA	Co-Directeur de thèse
NDEYE ARAME BOYE-FAYE	Co-Directeur de thèse

A la mémoire de mon Père

A ma famille

A ma fille

Remerciements

Le travail décrit dans cette thèse fait partie des thèmes du Laboratoire "Manipulation optique OM-CNR" à Trieste (Italie). Il est soutenu financièrement par le Centre International de Physique Théorique (ICTP) en Italie. Je tiens à remercier le Centre International de Physique Théorique, pour leur soutien financier à travers le programme doctoral de recherche en alternance "Sandwich Training Educational Programme" (STEP) qui m'a permis de travailler dans ce projet.

Cette thèse est supervisée conjointement par le Professeur Dan Cojoc (OM-CNR, Italie) et le Professeur Joseph Niemela (ICTP, Italie), le Professeur Oumar Ka et le Professeur Ndeye Arame Boye Faye au Département de Physique de l'Université Cheikh Anta Diop à Dakar.

Mes sincères remerciements vont à l'endroit de mes superviseurs à ICTP, le Professeur Dan Cojoc et le Professeur Joseph Niemela ; merci beaucoup pour les conseils et l'orientation que vous m'avez fournis depuis mon mastère. Je suis profondément redevable à Professeur Dan Cojoc, pour m'avoir introduit le champ passionnant des pinces optiques, et pour l'opportunité qu'il m'a donnée de travailler dans son groupe de recherche, et pour ses encouragements qui m'ont poussée à faire de mon mieux à chaque étape de ce projet. Professeur Joseph Niemela a joué un rôle central dans la réalisation de ces travaux et a contribué de façon significative au progrès. Je lui suis profondément reconnaissante, car sans son soutien, il aurait été impossible d'accomplir ce travail.

Je voudrais remercier mes directeurs de thèse à l'UCAD, Professeur Oumar Ka et Professeur Ndeye Arame Boye Faye pour leur encadrement et soutien tout au long de ce travail. Je me rappelle des difficultés rencontrées durant le début de mes travaux de thèse ; ils ont toujours su être patients. Leur soutien, encouragement et aide au niveau professionnel et personnel ont rendu cette thèse possible.

Je remercie le Professeur George Thompson (ICTP, Italie) de son intérêt pour mon travail et mes progrès ; pour avoir accepté de lire mes manuscrits, fournissant toujours des suggestions et conseils utiles et essentiels dans mon avancement.

Mon premier séjour de deux mois en Italie précédant le démarrage de mon projet de thèse n'aurait pu être initié sans l'intervention du Professeur Ahmadou Wagué. Qu'il trouve ici mes sincères remerciements pour son aide mais aussi pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Mes remerciements spéciaux vont à l'endroit de Professeurs Mamadou Mbodj et Mansour Faye pour leur disponibilité, et pour avoir accepté d'être des rapporteurs pour ce travail et d'avoir produit leur jugement dans un temps record.

Je suis très reconnaissante aux Professeurs Ababacar Sadikhe Ndao et Fatou Ka Gueye Ndiaye pour avoir accepté de juger ce travail ; je vous adresse mes sincères remerciements.

Tous mes professeurs qui ont contribué à faire ressortir les qualités scientifiques qui sommeillent en moi méritent une mention spéciale. Bien que je ne puisse pas écrire chaque nom ici, chacun d'eux est incorporé dans ma mémoire pour la façon dont ils m'ont aidée à m'améliorer et tirer profit de mes erreurs.

Je tiens à remercier mes collègues du laboratoire OM-CNR (Italie), qui ont contribué de façon significative à ce travail. En particulier Muhammad S. Yousafzai, mais aussi les associés d'ICTP qui visitent le laboratoire. Giovanna Coceanno et Leonardo Venturelli méritent également des remerciements spéciaux, pour leurs efforts à nous fournir des échantillons biologiques et à prendre part à des discussions importantes concernant la manipulation de matériaux biologiques.

Je remercie aussi les équipes IT (Eletra, ICTP) pour leur support sans faille avec mon ordinateur et les programmes Matlab.

Mes remerciements aussi à tous mes collègues de l'ITNA (Institut de Technologie Nucléaire Appliquée, UCAD), pour leur soutien moral et professionnel. Je ne saurai citer de nom ; trouvez tous ici mes sincères remerciements.

Je n'oublie pas tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'avancement de mes travaux.

Mes sincères et aimables remerciements à ma "Maman", Madame Ndeye Arame Boye - Faye et mon "Papa", Monsieur Mbaye Ciss Faye, comme j'ai l'habitude de les appeler, pour m'avoir offert un "chez moi". Ils m'ont accueillie dans leur famille et m'ont toujours fait me sentir comme chez moi (avec toute la famille). Ils ont toujours fortement soutenu tous mes efforts académiques et personnels. Leur soutien inconditionnel et leur encouragement sont très appréciés.

Last but not least, je dois d'aimables remerciements à ma famille, dont la patience et l'amour m'ont permis de terminer ce travail. A ma magnifique fille, Arame, pour son amour et sa patience. Je remercie en particulier ma mère, pour tous les efforts qu'elle n'a jamais cessés de faire pour me mettre à l'aise et m'aider à me concentrer dans mes recherches. Je suis très reconnaissante à mes belles sœurs, pour avoir pris soin de ma fille durant mes absences. A mes frères et sœurs, qui ont toujours su être présents dans ma vie. Ils ont tous beaucoup perdu en raison de mes recherches loin d'eux. Sans leurs encouragements, leur soutien et leur compréhension, il m'aurait été impossible de terminer ce travail.

RESUME

Dans ce travail, un dispositif de pince optique (OT) comportant un module de mesure de force a été mis au point, afin d'étudier les propriétés mécaniques d'échantillons biologiques. Nous proposons une approche qui utilise une expérience d'indentation avec la pince optique afin d'examiner l'élasticité de cellules individuelles. Pour éviter des dommages aux cellules ou leur échauffement en raison de la puissance du laser, une bille sphérique de taille microscopique maintenue dans l'équilibre du piège est utilisée comme sonde et la cellule peut être déplacée contre la bille en direction axiale. Pour de petits déplacements de la bille hors de l'équilibre du piège, le potentiel de piégeage peut être considéré comme harmonique et le modèle linéaire de Hooke peut être utilisé pour évaluer la force appliquée sur la cellule et mesurer l'élasticité locale de la cellule.

Des expériences d'indentation axiale ont été réalisées pour étudier l'élasticité de cellules cancéreuses mammaires humaines, à partir de trois lignes: HBL-100 (normale), MDA-MB-231 (métastatique) et MCF-7 (luminale). Les résultats obtenus dans ces expériences ont montré que la cellule métastatique était plus souple et donc de module d'élasticité plus faible par rapport à la cellule normale myoépithéliale et celle luminale. Ce résultat confirme le caractère métastatique des cellules cancéreuses MDA-MD-231. Une étude en AFM (microscopie à force atomique) de ces cellules a également été réalisée en utilisant la même approche d'indentation. La même tendance est trouvée avec les valeurs expérimentales obtenues. De plus, au régime de force élevée comme cela est le cas dans l'AFM, la réponse cellulaire montre également des contributions visqueuses des composantes cellulaires dues au non homogénéité et au caractère visqueux des cellules. Néanmoins, avec l'OT, nous avons été en mesure de discriminer les cellules cancéreuses et les cellulaires normales, alors que les différences entre ces deux lignées cellulaires n'étaient pas significatives avec la technique AFM.

Pour évaluer l'influence de l'interaction cellulaire avec son micro-environnement, l'élasticité cellulaire a été étudiée en cultivant les cellules sur deux substrats différents: un substrat nu (plus rigide) et un substrat revêtu de collagène (plus mou). En utilisant la cellule HBL-100 en tant que modèle dans cette étude, l'élasticité de ces cellules lorsqu'elles sont cultivées sur les deux types de substrats a été évaluée en utilisant la technique d'indentation des pinces optiques. Les résultats montrent que les cellules interagissent avec leur environnement et adaptent leur élasticité au substrat le plus conforme.

Pour une analyse plus rigoureuse de l'élasticité cellulaire, la contribution des composantes latérales de la force appliquée à la cellule est évaluée pour deux types de cellules (MDA-MB-231 et HBL-100) ainsi que la variation induite sur l'élasticité de ces dernières. Les résultats issus de cette étude montrent que les cellules sont moins élastiques lorsque la composante totale de force est considérée; ce qui suggère qu'il faut tenir compte de ces paramètres dans les analyses des propriétés mécaniques de cellules.

MOTS CLES : PINCES OPTIQUES, MESURE DE FORCE, PROPRIETES MECANIQUES, INDENTATION AXIALE, CELLULE CANCEREUSE, MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE, ELASTICITE CELLULAIRE.

ABSTRACT

In this work, an optical tweezers apparatus comprising a force measurement module is constructed in order to study the mechanical properties of biological samples. Particles of microscopic and nanometric sizes can also be manipulated and their positions determined to a nanometric accuracy. We propose an approach that uses an indentation experiment with optical tweezers to investigate the elasticity of individual cells. To avoid damage to cells or their heating because of the laser power, a spherical bead of microscopic size maintained in the trap equilibrium is used as a probe and the cell can be moved against the bead in the axial direction. For small displacements of the bead out of trap equilibrium, the trapping potential can be considered as harmonic and the linear Hooke model can be used to evaluate the force applied to the cell. Using the Hertz model, the local elasticity of the cell can be extracted.

Axial indentation experiments were carried out to study the elasticity of human mammary cancer cells, from three lines: HBL-100 (normal), MDA-MB-231 (metastatic) and MCF-7 (luminal). The results obtained in these experiments showed that the metastatic cell was softer and therefore of lower elastic modulus compared to the normal cell and the luminal cell. This result confirms the metastatic character of MDA-MD-231 cancer cells. A study by AFM (atomic force microscopy) of these cells was also performed using the same indentation approach. The same trend is found with the experimental values obtained. Moreover, at the high force regime as is the case in AFM, the cellular response also shows viscous contributions of the cellular components due to non-homogeneity and the viscous nature of the cells. Nevertheless, with OT, we were able to discriminate cancer cells and normal cells, whereas the differences between these two cell lines were not significant with the AFM technique.

To evaluate the influence of cellular interaction with its microenvironment, cell elasticity was studied culturing cells on two different substrates: a bare (more rigid) substrate, and a collagen-coated substrate (softer). Using the HBL-100 cell as a model in this study, the elasticity of these cells when cultured on both types of substrates was evaluated using the indentation technique of OT. The results show that the cells interact with their environment and adapt their elasticity to the most conforming substrate.

For a more rigorous analysis of cellular elasticity, the contribution of the lateral components of the force applied to the cell is evaluated for two cell types (MDA-MB-231 and HBL-100) as well as the induced variation on the elasticity of these. The results from this study show that the cells are less elastic when the total force component is considered; suggesting that these parameters should be taken into account in the analysis of the mechanical properties of cells.

KEY WORDS: OPTICAL TWEEZERS, FORCE MEASUREMENT, MECHANICAL PROPERTIES, AXIAL INDENTATION, CANCER CELL, ATOMIC FORCE MICROSCOPY, CELL ELASTICITY.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	II
RESUME	IV
ABSTRACT	V
GLOSSAIRE	4
INTRODUCTION	7
CHAPITRE 1	11
CANCER ET PROPRIETES BIOMECHANQUES DES CELLULES	11
1.1 CANCER ET METASTASE	13
1.2 CIRCUITS DE REGULATION POUR UNE CELLULE PRO-CANCER	15
1.2.1 Formation de néoplasme	17
1.2.2 Transformation des cellules cancéreuses en cellules agressives et invasives	18
1.2.3 Croissance de la tumeur	19
1.3 CANCER DU SEIN	20
1.4 CANCER ET MODIFICATION DES PROPRIETES MECANIQUES	22
1.4.1 Modification des propriétés mécaniques dans les cellules cancéreuses du sein	24
1.4.2 Modification des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses à l'intérieur de leur environnement : cellule - cellule et cellule - ECM	24
CHAPITRE 2	27
THEORIE DES PINCES OPTIQUES	27
2.1 PIEGEAGE OPTIQUE : HISTORIQUE	29
2.2 PIEGEAGE OPTIQUE : CONCEPT PHYSIQUE	32
2.3 FORCES OPTIQUES SUR DES OBJETS	35
2.3.1 Régime de l'optique géométrique ($d \gg \lambda$)	36
2.3.2 Régime de Rayleigh ($d \ll \lambda$)	38
2.3.3 Autres régimes	39
2.3.4 Explication mécanique des forces agissant sur une particule piégée	40
2.4 REALISATION DU DISPOSITIF DE PINCE OPTIQUE	41
2.5 PINCES OPTIQUES COMME TRANSDUCTEUR DE FORCE	42
2.5.1 Techniques d'étalonnage de la position du piège	43
2.5.2 Technique d'étalonnage de la rigidité du piège	46
CHAPITRE 3	51
INSTALLATION D'UNE PINCE OPTIQUE MODULAIRE	51
3.1 CONSTRUCTION ET ALIGNEMENT D'UNE PINCE OPTIQUE	54
3.1.1 Construction d'un dispositif de pince optique	54

3.1.2	Alignement optique d'un dispositif de pince optique.....	58
3.2	PREMIERES EXPERIENCES DE PIEGEAGE.....	61
3.3	AUTRES EXEMPLES D'EXPERIENCES DE PIEGEAGE	63
3.4	MESURE DE LA RIGIDITE DU PIEGE.....	64
3.5	CONTRASTE AVEC LA MESURE DE LA SENSIBILITE.....	65
CHAPITRE 4		67
ETUDE DE L'ELASTICITE DE CELLULES CANCEREUSES PAR SONDAGE AXIAL AVEC UNE PINCE OPTIQUE		67
4.1	INDENTATION VERTICALE DE CELLULES VIVANTES ET MESURE DE L'ELASTICITE.....	70
4.1.1	Procédure expérimentale en utilisant la technique OT	72
4.1.2	Procédure expérimentale en utilisant la technique AFM	74
4.2	MODELE DE HERTZ.....	75
4.2.1	Module d'élasticité dérivée dans le cas d'un intervalle de forces fixe	77
4.2.2	Module d'élasticité dérivée dans le cas d'un intervalle de profondeur d'indentation fixe	78
4.3	PREPARATION DES ECHANTILLONS DE CELLULES.....	79
4.4	QUANTIFICATION ET ANALYSE DE L'ELASTICITE DES CELLULES.....	80
4.4.1	Etude des modules d'élasticité pour les trois cellules par AFM et OT	81
4.4.2	Influence de l'adhérence cellulaire sur l'élasticité.....	85
4.4.3	Influence des forces latérales sur le module d'élasticité des cellules.....	89
4.5	DISCUSSION.....	96
CONCLUSION.....		101
BIBLIOGRAPHIE		105
ANNEXES.....		117
A - INSTRUMENTS VIRTUELS DE LABVIEW.....		119
A-1	ACQUISITION DE DONNEES DU MOUVEMENT BROWNIEN	120
A-2	MESURE DE LA RIGIDITE DU PIEGE EN UTILISANT LA METHODE D'EQUIPARTITION	121
A-3	ACQUISITION DE DONNEES POUR UN SIGNAL SINUSOÏDAL GENERE	122
A-4	MESURE DE LA SENSIBILITE	124
B - CODE MATLAB POUR MESURER LA RIGIDITE DU PIEGE EN UTILISANT LA METHODE DE LA DENSITE SPECTRALE DE PUISSANCE.....		125
C - PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....		129

GLOSSAIRE

Cancer: une maladie provoquée par la transformation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive.

Carcinome: type de cancer le plus courant. Un carcinome se développe sur les tissus de l'épithélium.

Cellule endothéliale : le principal type de cellule trouvée dans le revêtement intérieur des vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques, et le cœur.

Cellule épithéliale: ensemble des cellules normales constituant la couche de l'épithélium.

Cytosquelette : il représente le squelette cellulaire dans le cytoplasme d'une cellule. C'est un réseau complexe de filaments protéiques (micro filaments d'actine, filaments intermédiaires et microtubules) qui s'étend à travers le cytoplasme. Il confère aux cellules eucaryotes leur aptitude à prendre des formes différentes et à se déplacer. Il est essentiel pour maintenir et modifier la structure et la forme des cellules vivantes eucaryotes.

Différenciation: en biologie, elle décrit les processus par lesquels les cellules immatures deviennent des cellules matures avec des fonctions spécifiques. Dans le cancer, cela décrit combien un tissu tumoral peut ressembler au tissu normal d'où il est venu. Les cellules cancéreuses bien différenciées ressemblent plus à des cellules normales et ont tendance à se développer et se propager plus lentement que les cellules cancéreuses peu différenciées ou indifférenciées. La différenciation est utilisée dans les systèmes de classification des tumeurs, qui sont différents pour chaque type de cancer.

Epithélium: couche de tissu qui recouvre les surfaces externes (peau, muqueuse des orifices) et internes (tube digestif, glandes) de l'organisme.

Etat post mitotique : Le processus d'une cellule se poursuit à chaque fois qu'elle se divise. Le cycle mitotique consiste en une série d'étapes au cours desquelles les chromosomes et autres matériaux cellulaires doublent pour faire deux copies. La cellule se divise alors en deux cellules filles, chacune recevant une copie du matériau doublé. Le cycle mitotique est terminé lorsque chaque cellule fille est entourée par sa propre membrane externe. Également appelé cycle cellulaire.

Extravasation: Il est utilisé pour décrire le mouvement des cellules d'un vaisseau sanguin dans le tissu lors d'une métastase (propagation du cancer).

Fibroblaste : une cellule du tissu conjonctif qui fabrique et sécrète des protéines de collagène.

Filopodes: projections étroites du cytoplasme des cellules migrantes, sont associés à la formation des points d'adhésions naissantes avec un substrat.

Homéostasie: c'est un état d'équilibre entre tous les systèmes du corps nécessaires pour le corps pour survivre et fonctionner correctement. Dans l'homéostasie, les niveaux d'acide, la pression artérielle, la glycémie, les électrolytes, l'énergie, les hormones, l'oxygène, les protéines, et la température du corps sont constamment ajustés pour répondre aux changements à l'intérieur et à l'extérieur du corps, pour les maintenir à un niveau normal.

Macrophage: un type de globule blanc qui entoure et tue les microorganismes, élimine les cellules mortes et stimule l'action d'autres cellules du système immunitaire.

Matrice extracellulaire (ECM): la matrice extracellulaire (ECM) est un réseau complexe de protéines sécrétées par les cellules (collagène, nidogène, perlécane) et des polysaccharides (glycosaminoglycanes, cellulose), qui s'assemblent en une structure organisée qui entoure les cellules. Elle agit comme un support physique des tissus et est impliquée dans le développement, la différenciation et l'homéostasie des tissus.

Métastase: tumeur formée à partir de cellules cancéreuses qui se sont détachées d'une tumeur primaire (tumeur primitive) et qui ont migré par les vaisseaux lymphatiques ou les vaisseaux sanguins dans une autre partie du corps où elles se sont installées. Les métastases se développent de préférence dans les poumons, le foie, les os, le cerveau. Ce n'est pas un autre cancer, mais le cancer initial qui s'est propagé. Par exemple, une métastase d'un cancer du sein installée sur un poumon est une tumeur constituée de cellules de sein ; ce n'est pas un cancer du poumon. Le risque de développer des métastases dépend des particularités de la tumeur primaire.

Microenvironnement tumoral: les cellules normales, molécules, et vaisseaux sanguins qui entourent et nourrissent une cellule tumorale. Une tumeur peut changer son microenvironnement, et le microenvironnement peut affecter la façon dont une tumeur se développe et se propage.

Néoplasme: c'est une tumeur constituée de cellules qui prolifèrent de façon excessive. Un néoplasme peut être cancéreux ou non. On parle aussi de néoplasie ou de néoformation.

Nodule : formation anormale, généralement arrondie et de petite taille, cancéreuse ou non, dans un organe ou à sa surface.

Oncogène: c'est un gène qui peut induire une transformation cellulaire.

Oncologie : une branche de la médecine qui se spécialise dans le diagnostic et le traitement du cancer. Il comprend l'oncologie médicale (l'utilisation de la chimiothérapie, l'hormonothérapie, et d'autres médicaments pour traiter le cancer), la radio-oncologie (l'utilisation de la radiothérapie pour traiter le cancer), et de l'oncologie chirurgicale (l'utilisation de la chirurgie et d'autres procédures pour traiter le cancer).

Propriétés biomécaniques: un terme utilisé pour se référer aux propriétés telles la rigidité, la déformabilité, l'élasticité des cellules biologiques.

Proto-oncogène: un gène impliqué dans la croissance cellulaire normale. Des mutations (modifications) dans un proto-oncogène peut l'amener à devenir un oncogène, ce qui peut provoquer la croissance des cellules cancéreuses.

Rigidité (également connu sous le nom **d'élasticité** ou **module d'élasticité**): une mesure de l'aptitude d'un matériau à résister à des forces de manière similaire à un solide. Le caoutchouc est élastique et montre peu de viscosité. Une matrice de collagène est élastique, mais non visqueuse, car elle ne coule pas. Le cytoplasme des cellules est à la fois élastique et visqueux (viscoélastique) en fonction de la vitesse de déformation.

Signaux de croissance mitogéniques: un signal mitogénique correspond à un ordre de prolifération. Les signaux mitogéniques sont intégrés par des circuits intracellulaires complexes, décidant si la croissance et la division de la cellule sont appropriées ou non.

Stroma: c'est un type de cellule qui compose certains types de tissu conjonctif (tissu qui entoure d'autres tissus et organes de support).

Transition épithéliale mésenchymateuse (EMT): un changement morphologique des cellules épithéliales qui se transforment d'une forme cubique à une forme allongée, suite à la transformation oncogénique. Celle-ci est souvent accompagnée d'une perte d'expression de la molécule d'adhésion E-cadhérine. Post-EMT, les cellules adoptent un phénotype de haute motilité.

Tumeur primaire: un terme utilisé pour décrire l'original, ou la première, tumeur dans le corps. C'est la tumeur principale à partir de laquelle peuvent s'échapper des cellules cancéreuses qui vont former des métastases dans d'autres parties du corps.

Viscosité: une mesure de la capacité d'un matériau à couler comme un liquide.

Références

<http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>

<http://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/A>

INTRODUCTION

L'étude des propriétés mécaniques des cellules vivantes, au niveau cellulaire et moléculaire, est devenue une méthode pour caractériser l'état des maladies humaines, y compris le cancer. Par exemple, des mesures de propriétés mécaniques ont prouvé que les cellules cancéreuses peuvent être reconnues par leur souplesse. D'une façon générale, on observe un nombre croissant de contributions à l'étude du rôle des interactions physiques impliquées dans la progression du cancer. Néanmoins, les mécanismes par lesquels ces changements mécaniques interviennent dans la transformation des cellules demeurent obscurs. L'hypothèse selon laquelle la biomécanique cellulaire peut jouer un rôle significatif dans la tumorigenèse, l'invasion du cancer et des métastases, gagne de plus en plus de soutien (Geiger & Peeper, 2009) (Makale, 2007) (Mierke, 2014) (Venugopalan, et al., 2014) (Guz, Dokukin, Kalaparthy, & Sokolov, 2014). En effet, l'invasion tumorale et l'évolution vers des métastases sont rigoureusement corrélées avec les altérations dans l'adhésion cellulaire, dans leurs propriétés migratoires et donc dans les propriétés mécaniques des cellules. Les déformations physiques de ces cellules, résultant de changements chimiques dans leur microenvironnement ainsi que de la réponse à une contrainte mécanique externe appliquée ou générée en interne, sont un facteur clé pour le processus métastatique. La métastase est l'état par lequel une cellule maligne se propage à partir d'une tumeur primaire vers un site distant; elle est considérée comme la principale cause de décès chez les patients atteints de cancer.

De nos jours, les études biologiques tirent pleinement parti des nombreuses techniques nouvelles, qui permettent d'étudier les propriétés biomécaniques des cellules cancéreuses à l'échelle d'une seule cellule. La technique appelée "pinces optiques" offre une option valable pour l'étude des processus cellulaires tels que la motilité, l'adhésion, la division cellulaire, etc..... En effet, ces processus impliquent des forces mécaniques dans la gamme de force de cette technique, ce qui en fait un outil idéal pour étudier les mécanismes de ces processus.

L'objectif principal de ce travail est de construire une configuration de pince optique et de développer une approche permettant de caractériser les propriétés mécaniques de cellules issues du cancer du sein. Nous avons développé une configuration de pince optique avec une haute résolution temporelle et une résolution spatiale nanométrique (bande passante 150 kHz) pour effectuer des mesures précises sur les cellules du cancer du sein sans causer de photo-dommages (Coceano, et al., 2016) (Yousafzai, et al., 2016) (Ndoye, et al., 2016).

Ce travail peut être divisé en deux parties: une partie théorique qui concerne les deux premiers chapitres et une partie expérimentale. Dans le chapitre 1, la biologie des cellules cancéreuses, en particulier les cellules cancéreuses du sein, est présentée. Les modifications biochimiques et biomécaniques qui peuvent accompagner l'apparition et la progression de la tumeur vers les métastases sont également discutées. Le chapitre 2 décrit les théories de base qui régissent le principe des pinces optiques, ainsi que l'application de la technique pour mesurer des forces calibrées sur des échantillons biologiques. La partie expérimentale du travail est abordée à partir du chapitre 3. Ce chapitre fournit les détails sur la construction de l'appareil des pinces optiques que nous avons utilisé pour effectuer ce travail. Les premières expériences de piégeage avec cette installation seront également mises en évidence dans ce chapitre. Alors que la capacité de manipulation directe, en trois dimensions, des cellules par la pince optique est décrite dans ce chapitre, une méthode indirecte est présentée dans le chapitre 4, avec piégeage et utilisation comme sondes de particules microscopiques. En effet, lorsqu'une particule est placée sur la surface d'une cellule, les mécanismes par lesquels la cellule détecte les stimuli mécaniques de l'extérieur et les traduit en signaux intracellulaires peuvent être étudiés. L'étude des propriétés biomécaniques des cellules cancéreuses mammaires provenant de trois lignes, caractérisées par un niveau d'agressivité différente, ainsi que celle de l'influence de leur milieu environnant, est présentée dans le chapitre 4. Elle nous a permis de caractériser la déformabilité de ces trois types de cellules et de les discriminer.

Les résultats obtenus ont été diffusés dans quatre articles:

- Coceano G., Yousafzai M. S., Ma W., **Ndoye F.**, Venturelli L., Hussain I., and Cojoc D. (2016). Investigation into local cell mechanics by atomic force microscopy mapping and optical tweezers vertical indentation. *Nanotechnology*, 27(6).
- Yousafzai M. S., **Ndoye F.**, Coceano G., Niemela J., Bonin S., Scoles G., and Cojoc D. (2016). Substrate dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation. *Optics and Lasers in Engineering*, 76, 27–33.
- Ndoye F.**, Yousafzai M. S., Coceano G., Bonin S., Scoles G., Ka O., and Cojoc D. (2016). The influence of lateral forces on the cell stiffness measurement by optical tweezers vertical indentation. *International Journal of Optomechatronics*, 10 (1), 53-62.
- Yousafzai M. S., Coceano G., Mariutti A., **Ndoye F.**, Amin L., Niemela J., Bonin S., Scoles G., and Cojoc D (2016). Effect of neighboring cells on cell stiffness measured by optical tweezers indentation. *J. Biomed. Opt.* 21(5)

CHAPITRE 1

Cancer et propriétés biomécaniques des cellules

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde (WHO, 2011). Les cancers du poumon, du côlon et de la prostate pour les hommes, du sein, des bronches et du rectum pour les femmes, sont les types de cancer les plus fréquents de nos jours. Chez les femmes, le cancer du sein est la tumeur la plus répandue et la métastase représente la cause de décès la plus fréquente chez les patients atteints de cancer (Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2001).

Lors des dernières décennies, il y a eu de nombreux efforts pour comprendre les mécanismes qui régissent le développement du cancer et la progression vers la métastase. L'objectif est de trouver des marqueurs moléculaires pour un diagnostic précoce et des cibles biologiques pour traiter le cancer. Les altérations génétiques et moléculaires bien connues qui caractérisent les cellules cancéreuses ne peuvent pas expliquer seules, de manière complète, le processus de transformation des cellules normales en cellules malignes et invasives. Par conséquent, les biologistes du cancer ont commencé à reconnaître qu'un élément critique du processus de transformation néoplasique implique des modifications spécifiques dans les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses et leur microenvironnement (la matrice extracellulaire, les cellules incorporées) (Kumar & Weaver, 2009). Ces changements se reflètent dans les nombreuses fonctions de la cellule, y compris la croissance, la motilité, le métabolisme, la communication, la signalisation et le remodelage (Ben-Ze'ev, 1985); (Alberts, *et al.*, 2002). Par conséquent, une caractérisation détaillée des modifications des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses serait bénéfique pour la compréhension des événements moléculaires sous-jacents qui conduisent à des métastases. Elle pourrait fournir des marqueurs potentiels sur la base des mesures mécaniques plutôt que des diagnostics moléculaires.

Dans ce chapitre, la maladie du cancer et l'évolution vers un stade de métastase seront tout d'abord présentées. Les facteurs qui caractérisent la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses et métastatiques seront ensuite décrits dans une seconde partie et la pathologie du cancer du sein dans une troisième. La dernière partie de ce chapitre permettra de discuter l'implication des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses dans la progression du cancer.

1.1 Cancer et métastase

Le cancer est une maladie qui résulte d'un dysfonctionnement des cellules biologiques. Les cellules malades prolifèrent de manière incontrôlée et peuvent perturber

le tissu jointif, provoquant la formation de tumeur. Une tumeur peut être bénigne, maligne ou métastatique.

Une tumeur bénigne est caractérisée par des cellules néoplasiques qui restent regroupées ensemble et forment une seule masse. Dans ce cas, une guérison complète peut être obtenue en supprimant la masse par voie chirurgicale. Cependant, des altérations génétiques dans ces cellules néoplasiques peuvent causer le passage de tumeur bénigne à tumeur maligne, donc au cancer.

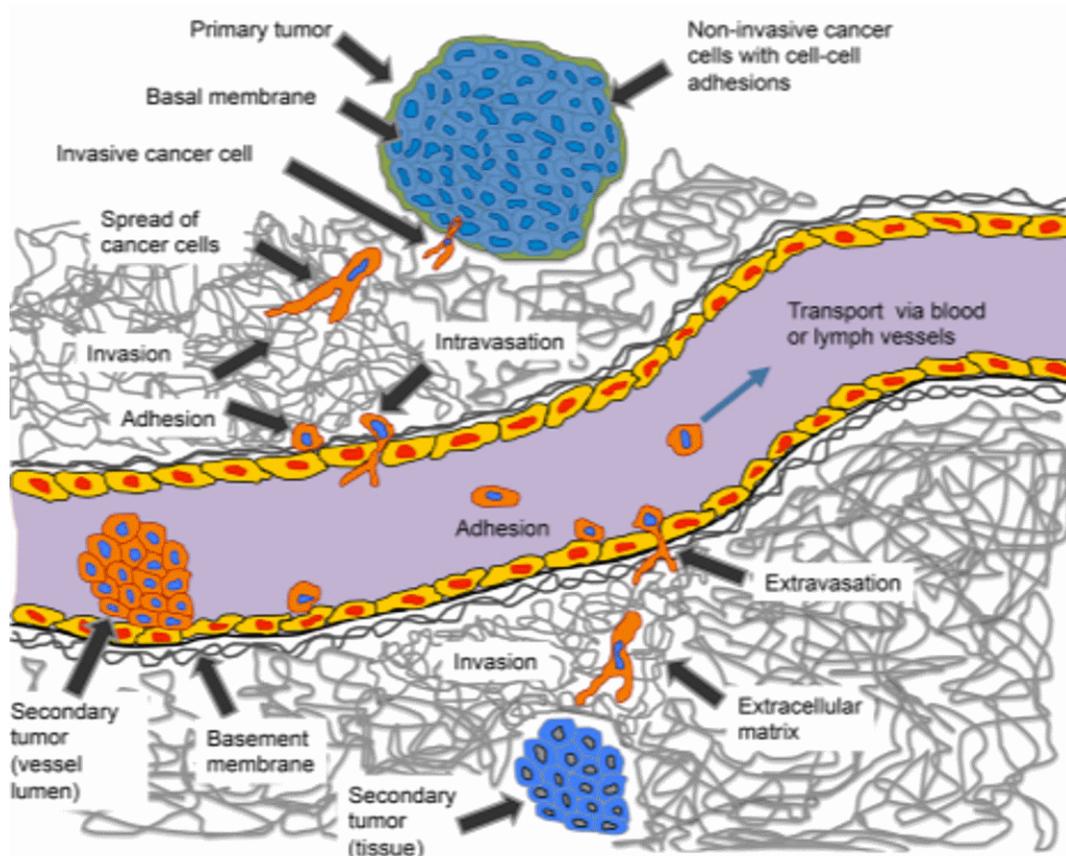


Figure 1.1 - Cascade métastatique.

Certaines cellules cancéreuses sélectionnées peuvent affaiblir leur adhérence cellule-cellule, traverser la limite de la tumeur comprenant la membrane basale autour de la tumeur primaire, pénétrer dans le microenvironnement tel que la matrice extracellulaire du tissu conjonctif et transmigrer à travers la membrane basale des vaisseaux sanguins ou lymphatiques (pénétration intra vasculaire). Ces cellules, transportées à travers le système vasculaire, peuvent adhérer à la paroi et se développer comme une tumeur secondaire ou, par extravasation, former une tumeur secondaire dans le tissu ciblé (Mierke, 2015).

La progression de la tumeur maligne conduit à la métastase. Le processus de métastase implique la propagation des cellules malignes d'une tumeur primaire vers des sites distants et constitue le pire scénario dans un cancer car elle est la cause principale (à 90%) de décès par cette maladie (Chaffer & Weinberg, 2011). Le processus complexe par

lequel une cellule saine se transforme en un dérivé métastatique comporte plusieurs étapes reflétant les modifications génétiques de la cellule elle-même (Hanahan & Weinberg, 2000). Le processus de métastase comprend de nombreuses étapes consécutives, appelées «cascade métastatique» (Geiger & Peeper, 2009). La cascade métastatique commence par la propagation des cellules cancéreuses de la tumeur primaire. Les cellules migrent ensuite dans le microenvironnement tumoral local. Ces cellules cancéreuses transmigrent par la suite dans le sang ou les vaisseaux lymphatiques (pénétration intra vasculaire) et sont transportées à travers le flux du vaisseau. Elles sont capables d'adhérer à la paroi du vaisseau, de croître et de former une tumeur secondaire dans le vaisseau. Ces cellules peuvent éventuellement transmigrer dans la matrice extracellulaire du tissu conjonctif à travers la paroi du vaisseau endothélial (par extravasation). Ces cellules cancéreuses migrent ensuite davantage en profondeur dans le tissu ciblé, se développent et forment une tumeur secondaire, ce qui signifie que la tumeur a métastasé (**Figure 1.1**).

Malgré les recherches intensives en oncologie, l'invasion du cancer et les métastases restent mal connues (Chaffer & Weinberg, 2011). Le mécanisme responsable du processus métastatique n'est toujours pas complètement élucidé.

1.2 Circuits de régulation pour une cellule pro-cancer

Les tumeurs sont plus que des masses insulaires de cellules cancéreuses qui prolifèrent ; au contraire, elles sont des tissus complexes, composés d'une multitude de types distincts de cellules qui interagissent (**Figure 1.2**). Afin de mieux décrire la transformation maligne des cellules néoplasiques et révéler le chemin fonctionnel qui permet aux cellules cancéreuses de favoriser la progression du cancer et des métastases, huit caractéristiques classiques du cancer ont été proposées (Hanahan & Weinberg, 2000); (Hanahan & Weinberg, 2011) :

- le maintien de la signalisation proliférative ;
- l'évasion des suppresseurs de croissance ;
- l'activation de l'invasion et la métastase ;
- l'habilité à une immortalité répllicative ;
- l'induction de l'angiogenèse ;
- la résistance à la mort cellulaire ;
- la reprogrammation du métabolisme énergétique ;
- l'évasion à la destruction immunitaire.
-

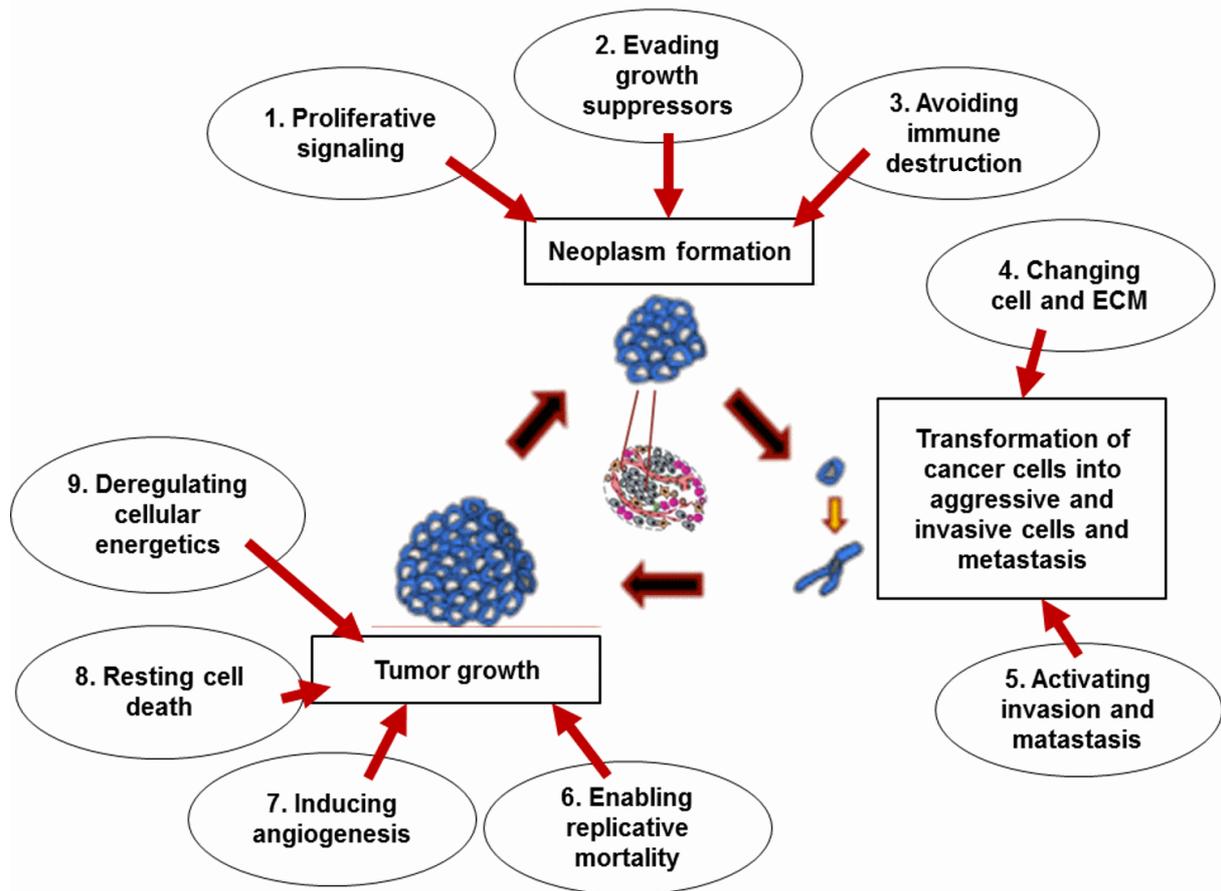


Figure 1.2 - Caractéristiques du cancer. Les sous-groupes sont associés à des événements qui mettent en évidence l'apparition et la progression du cancer. Adaptée de (Mierke, 2015) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Ces huit caractéristiques classiques du cancer décrivent les aspects biologiques des cellules cancéreuses dans la progression tumorale, mais aussi les contributions du microenvironnement à la tumorigénèse.

Les altérations génétiques et moléculaires des cellules cancéreuses sont bien étudiées, mais elles ne suffisent pas à elles seules pour expliquer le processus complexe de transformation maligne et celui de l'invasion. La capacité des cellules néoplasiques de se transformer et former une tumeur secondaire est accompagnée de diverses altérations moléculaires. Celles-ci influent sur les propriétés mécaniques des cellules envahissantes du cancer, leurs microenvironnements tels que la matrice extracellulaire (ECM), les cellules voisines telles que les cellules endothéliales, les macrophages associés au cancer et les fibroblastes (Rami-Conde, Drasdo, Anderson, & Chaplain, 2008) (Canetta, Duperray, Leyrat, & Verdier, 2005). Toutefois, le processus de modification des propriétés mécaniques dans le microenvironnement de la tumeur induite par la transformation des cellules saines vers des cellules malignes n'est pas encore entièrement compris (Fischer, Myers, Gardel, & Waterman, 2012) (Mierke, 2014). Par

conséquent, l'intérêt des biologistes pour l'étude des propriétés mécaniques du cancer s'est développé. Ils en sont arrivés à la conclusion que les modifications observées dans le phénotype mécanique de la cellule et son microenvironnement peuvent jouer un rôle important dans le processus de transformation néoplasique, l'invasion du cancer et les métastases (Kumar & Weaver, 2009) (Suresh, 2007) (Geiger & Peeper, 2009) (Makale, 2007) (Guz, Dokukin, Kalaparthy, & Sokolov, 2014) (Ketene, Schmelz, Roberts, & Agah, 2012).

Ainsi, ces huit caractéristiques classiques du cancer nécessitent l'inclusion d'une neuvième, décrivant les altérations dans les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses et de leurs microenvironnements, ainsi que des cellules incorporées (Mierke, 2014).

Mierke (Mierke, 2015) a proposé que ces neuf caractéristiques puissent être classées en trois groupes, qui sous-tendent le chemin moléculaire qui conduit à la métastase (**Figure 1.2**). Il s'agit du groupe concernant la formation de néoplasme, celui concernant la transformation des cellules cancéreuses en cellules agressives et invasives et, enfin, le groupe concernant la croissance tumorale (Mierke, 2013). Sur la **Figure 1.2**, l'auteur représente la neuvième caractéristique décrivant les changements dans les propriétés mécaniques des cellules cancéreuses par « Changing cell and ECM ».

1.2.1 Formation de néoplasme

Le développement normal des cellules humaines est favorisé par des proto-oncogènes qui sont impliqués dans la division cellulaire et leur croissance (Weinstein & Joe, 2006). La transformation des cellules normales en cellules cancéreuses fait intervenir deux groupes de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Un oncogène est la forme mutante d'un proto-oncogène normal, elle est impliquée dans la stimulation de la division cellulaire, l'inhibition de la différenciation cellulaire et la réduction de la mort cellulaire. Par contre, un gène suppresseur de tumeur est un gène normal qui ralentit la division cellulaire, répare les erreurs dans l'ADN ou indique aux cellules quand elles doivent mourir. L'initiation et la progression du néoplasme sont associées à l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Ces altérations génétiques conduisent à une prolifération cellulaire incontrôlable et à un cancer. Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur sont responsables des caractéristiques acquises par la plupart des types de cancer humain (Weinberg, 1996). Les processus qui interviennent dans la formation de néoplasme peuvent être catégorisés en trois groupes différents, comme mentionnés sur la figure 1.2:

a) Pour proliférer, les cellules normales reçoivent des signaux de croissance mitogéniques [Glossaire]. Ces signaux sont transmis dans la cellule par les récepteurs

transmembranaires qui se lient à des classes distinctes de molécules de signalisation : les facteurs de croissance, les composants de la matrice extracellulaire et les molécules d'adhérence ou d'interaction de cellule à cellule. Dans les cellules cancéreuses, les mutations oncogéniques agissent en simulant la signalisation de la croissance normale, ce qui leur permet de générer leurs propres signaux de croissance, perturbant ainsi le mécanisme homéostatique normal (*Sustaining proliferative signaling*).

b) Dans les cellules normales, les signaux antiprolifératifs fonctionnent pour maintenir l'homéostasie [Gloss.] du tissu cellulaire ; ils régulent les décisions des cellules à proliférer. Les signaux anti-croissance fonctionnent de diverses manières pour limiter la croissance des cellules. Ils peuvent bloquer la prolifération par deux mécanismes distincts. Dans le premier, les cellules peuvent être forcées de quitter le cycle prolifératif actif et d'entrer dans un état de repos (G_0) à partir duquel elles peuvent réapparaître, ultérieurement, lorsque les signaux extracellulaires le permettent. Dans le second mécanisme, les cellules peuvent être incitées à abandonner définitivement leur potentiel prolifératif pour entrer dans des états post-mitotiques, généralement associés à l'acquisition de traits de différenciation spécifiques. Les cellules cancéreuses, cependant, échappent à ces signaux antiprolifératifs (*Evading growth suppressors*).

c) La théorie de la surveillance immunitaire suggère que les cellules sont constamment surveillées par un système immunitaire d'alerte qui est responsable de la reconnaissance et de l'élimination des anomalies. Les cellules cancéreuses qui apparaissent semblent donc avoir réussi à éviter la détection par les différentes branches du système immunitaire, ou bien sont en mesure de limiter ou de désactiver des composants du système immunitaire ayant été dépêchés pour les éliminer, échappant ainsi à l'éradication (*Avoiding immune destruction*).

1.2.2 Transformation des cellules cancéreuses en cellules agressives et invasives

En principe, une seule cellule cancéreuse peut être suffisante pour provoquer la progression du cancer malin. Cependant, certaines de ces cellules cancéreuses subissent un processus de transition ou de sélection afin de pouvoir suivre, la série des étapes du progrès métastatique. Les processus accompagnant la transformation des cellules cancéreuses sont discutés dans les paragraphes suivants:

a) Les tissus normaux sont composés de cellules qui sont étroitement reliées entre elles par des structures jonctionnelles reliées aux filaments d'actine du cytosquelette [Gloss.]. Dans le cancer, la tumeur primitive et son microenvironnement peuvent modifier les conditions

de survie et les propriétés cellulaires d'un certain type de cellules cancéreuses. Celles-ci vont soutenir la suite de la sélection d'un sous-type agressif (très invasif) de cellules cancéreuses. Par conséquent, les cellules cancéreuses très invasives sont capables de briser les adhérences aux cellules voisines affectant ainsi les propriétés mécaniques de celles qui interagissent et de migrer à travers la limite de la tumeur primaire (comprenant la membrane basale entourant la tumeur) pour ensuite envahir le stroma [Gloss.] de la tumeur locale. Il est connu que ces cellules subissent une transformation qui est similaire à la transition épithéliale mésenchymateuse [Gloss.] (EMT), procédé qui altère la structure du cytosquelette cellulaire et modifie la membrane cellulaire (*Changing cell and ECM*).

b) Dans les tissus normaux, plusieurs classes de protéines sont impliquées dans les structures jonctionnelles des cellules à leur entourage. Dans les cellules épithéliales normales, l'adhésion cellule-cellule est réglemantée par le récepteur E-cadhérine, alors que le récepteur qui régularise l'adhérence des cellules au substrat extracellulaire est l'intégrine (Bauer, Mierke, & Behrens, 2007) (Sawada, et al., 2008).

Dans le cancer, la modification la plus largement observée dans les interactions cellule-environnement implique l'E-cadhérine. Ainsi, la fonction du récepteur E-cadhérine est apparemment perdue dans la majorité des cancers épithéliaux, par des mécanismes qui comprennent l'activation mutationnelle de l'E-cadhérine ou une réduction de son expression (Cavallaro & Christofori, 2004). En conséquence, les cellules acquièrent la capacité de migrer et d'échapper à la tumeur primaire (*Activating invasion and metastasis*).

1.2.3 Croissance de la tumeur

Plusieurs étapes morphogénétiques distinctes interviennent au cours du développement tumoral dans le site métastatique.

a) Les cellules normales sont capables de passer à travers un nombre limité de cycles successifs de croissance et de division cellulaire en raison de deux barrières distinctes contre la prolifération cellulaire : la sénescence, qui est décrite comme un état de non-prolifération cellulaire, et la crise, qui implique la mort cellulaire. Ces états sont régis par les télomères, dont les fonctions sont de protéger les extrémités de l'ADN chromosomique des fusions d'une extrémité à l'autre. Les télomères raccourcissent progressivement au cours du cycle cellulaire, processus qui assure un nombre fini de réplifications possibles de l'ADN. Dans les cellules cancéreuses, les télomères ne sont pas perturbés et, par conséquent, la réplification de l'ADN se poursuit indéfiniment (*Enabling replicative immortality*).

b) Dans les cellules normales, l'oxygène et les nutriments fournis par le système vasculaire sont essentiels pour la fonction et la survie cellulaires, ce qui oblige les cellules à résider dans un tissu d'une certaine taille. Les cellules cancéreuses, caractérisées par la prolifération des cellules, font accroître le tissu cellulaire à une taille plus grande que celle du tissu normal.

Par conséquent, pour assurer la subsistance nécessaire (pour leur fonction et la survie) afin de progresser vers une plus grande taille, les néoplasies naissantes doivent développer la capacité d'induire et de maintenir l'angiogenèse (*Inducing angiogenesis*) (Gimbrone M. A., Leapman, Cotran, & Folkman, 1972) (Gimbrone M. A., Leapman, Cotran, & Folkman, 1973).

c) Le programme de la mort cellulaire est présent sous forme latente dans tous les types de cellules. Les cellules cancéreuses acquièrent une résistance à la mort cellulaire en utilisant une variété de stratégies. La plus courante est la perte ou la mutation du gène suppresseur de tumeur TP53, qui agit comme un capteur pour les dommages de l'ADN, provoquant ainsi l'inactivation du régulateur de la mort cellulaire. Alternativement, les cellules cancéreuses peuvent augmenter l'expression des régulateurs contre la mort cellulaire ou des signaux de survie ou réguler à la baisse des facteurs pour la mort cellulaire (*Resisting cell death*).

d) Afin de favoriser la division et la croissance cellulaire, les cellules cancéreuses modifient leur métabolisme énergétique.

Les cellules normales, dans des conditions aérobies, transforment le glucose d'abord en pyruvate via la glycolyse dans le cytosol ensuite en dioxyde de carbone dans les mitochondries. Par contre, dans des conditions anaérobies, la glycolyse est favorisée et relativement peu de pyruvate est envoyé aux mitochondries consommant de l'oxygène. S'agissant du cancer, les cellules peuvent reprogrammer leur métabolisme énergétique, même en présence d'oxygène, et donc leur production d'énergie, en limitant leur métabolisme énergétique en grande partie à la glycolyse, conduisant à un état qui a été appelé "glycolyse aérobie" (*Deregulating cellular energetics*).

1.3 Cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle et les facteurs de risque comprennent principalement le régime alimentaire et l'activité physique, les facteurs de reproduction, un déséquilibre hormonal apparenté ou l'exposition aux rayonnements ionisants. Le cancer du sein représente la tumeur la plus fréquente dans les cancers féminins. Des classificateurs cliniques,

pathologiques et moléculaires sont utilisés pour détecter et prédire la progression du cancer du sein et de soumettre les patients à la thérapie appropriée (Andre & Pusztai, 2006).

Les carcinomes représentent un groupe de cancers du sein qui proviennent de tissus épithéliaux mammaires. Normalement, les cellules épithéliales sont étroitement interconnectées et liées à la membrane basale sous-jacente à travers des structures de jonction. Ces contraintes physiques sont également présentes dans de nombreux cancers bénins. Cependant, quand une tumeur progresse, les cellules de carcinome se libèrent de ces associations, d'abord en dissolvant les membranes basales sous-jacentes puis en envahissant les compartiments adjacents stromales [Gloss.] (Chaffer & Weinberg, 2011). La prolifération carcinomateuse peut être limitée à une invasion locale des structures voisines. Ceci est appelé carcinome *in situ*.

Le carcinome invasif du sein est un type de tumeur épithéliale maligne caractérisé par une invasion des tissus adjacents et une tendance marquée à former des métastases à des sites distants. Morphologiquement, les caractéristiques macroscopiques de cette tumeur varient considérablement : il y a une variation marquée de la taille de la tumeur avec une forme irrégulière, un contour étoilé ou une configuration nodulaire. Ces tumeurs sont mal délimitées. L'hétérogénéité du cancer du sein résulte de nombreux facteurs différents, tels que la cellule d'origine, les altérations moléculaires qui les provoquent ou la sensibilité et la capacité de défense de l'organisme du patient.

Plusieurs paramètres, tels que le type ou le grade histopathologique, le stade de la tumeur, le statut des récepteurs ou encore la présence ou non de gènes particuliers, sont utilisés pour classer les cancers du sein (Tavassoli & Devilee, 2000); (Pereira, et al., 1995) (Veronesi, Viale, Rotmensz, & Goldhirsch, 2006) (Perou, et al., 2000) (Sorlie, et al., 2003). Néanmoins, les tumeurs caractérisées par des traits histopathologiques similaires peuvent présenter, de manière significative, des résultats et une réponse au traitement différents. En effet, certains patients peuvent guérir et d'autres pas. Ainsi, l'hétérogénéité du cancer du sein rend difficile le choix du traitement le plus approprié et un pronostic de l'évolution clinique (Bertucci & Birnbaum, 2008). Par conséquent, une caractérisation plus approfondie pour définir les portraits de chaque tumeur et l'interprétation correcte de leurs modes de variation pourraient sans doute conduire à une compréhension plus complète des cancers du sein (Perou, et al., 2000) (Sotiriou, et al., 2003). Plus précisément, les signatures précises peuvent permettre d'identifier les patients ayant un bon ou mauvais pronostic de survie et conduire à la thérapie individuelle la plus efficace.

1.4 Cancer et modification des propriétés mécaniques

Les corrélations entre les propriétés biomécaniques des cellules et la maladie du cancer ont fait l'objet de considérables efforts de recherches scientifiques. La manière dont les propriétés mécaniques des cellules et des structures sous-cellulaires influencent et sont influencées par l'apparition et la progression du cancer a été intensivement étudiée (Mierke, 2014) (Ketene, Schmelz, Roberts, & Agah, 2012) (Plodinec, et al., 2012) (Venugopalan, et al., 2014). Dans ces processus, il existe une interaction mécanique continue entre les cellules et leur matrice extracellulaire et entre elles-mêmes. Cela se traduit par des modifications dans les propriétés biomécaniques des cellules (Schoen, Pruitt, & Vogel, 2013) (Wen & Janmey, 2013). Au cours de la progression du cancer, les cellules se développent d'un état complètement mature, post mitotique, vers un état où les cellules acquièrent les capacités de se reproduire, de se déplacer et de devenir immortelles. La structure du cytosquelette évolue d'un état assez ordonné à un état rigide plus irrégulier, influençant ainsi les propriétés mécaniques de la cellule globale. Par conséquent, les propriétés biomécaniques (rigidité, élasticité, déformabilité) des cellules cancéreuses peuvent fournir des informations utiles sur leur état et pourraient être considérées comme des marqueurs biologiques potentiels sur la base de mesures mécaniques plutôt que des diagnostics moléculaires (Guck, et al., 2005) (Cross, Jin, Rao, & Gimzewski, 2007).

Il a été démontré que bien que les tumeurs soient relativement rigides (du fait de leur ECM), les cellules tumorales elles-mêmes sont plus souples que leur contrepartie normale (Lincoln, et al., 2004) (Guck, et al., 2005) (Suresh, 2007). Elles sont capables de se déplacer et de se propager à travers l'ECM, ce qui suggère une interaction biomécanique continue entre les cellules et leur ECM, conduisant à l'adaptation de la mobilité cellulaire (Huang, et al., 2005). Ceci facilite leur passage de la tumeur primaire vers le site de métastases. Bien que cet aspect soit particulièrement évident lors de l'invasion du tissu et la phase de métastase, la modification globale des propriétés mécaniques d'un tissu commence beaucoup plus tôt, impliquant plusieurs processus physiologiques qui, en modifiant la structure de la membrane et du cytosquelette, convertissent une cellule maligne en une cellule métastatique (Plodinec, et al., 2012) (Costa, 2004).

La transition de lésions bénignes à un cancer invasif et métastatique est caractérisée par une augmentation de la réplication et de la motilité, la désorganisation du cytosquelette et la dérégulation des adhérences cellule-cellule et cellule-matrice (**Figure 1.3**). Différentes et nombre de molécules sont impliqués dans la carcinogenèse humaine. Leurs expressions sont

dérégulées lors du passage de cellules normales à des cellules tumorales très malignes (Christofori, 2006) (Jechlinger, et al., 2003).

La majorité des cancers humains (80-90%) proviennent des cellules épithéliales. Dans la progression du cancer épithélial, ces cellules sont capables d'affaiblir leur adhérence cellule-cellule, de remodeler l'adhérence cellule-matrice et d'obtenir un phénotype hautement migratoire. Par la suite, elles peuvent être en mesure de migrer à travers les autres cellules de la tumeur primaire et la membrane basale de la tumeur, d'envahir le microenvironnement de la tumeur et d'infiltrer les tissus hôtes (Hazan, Phillips, Qiao, Norton, & Aaronson, 2000).

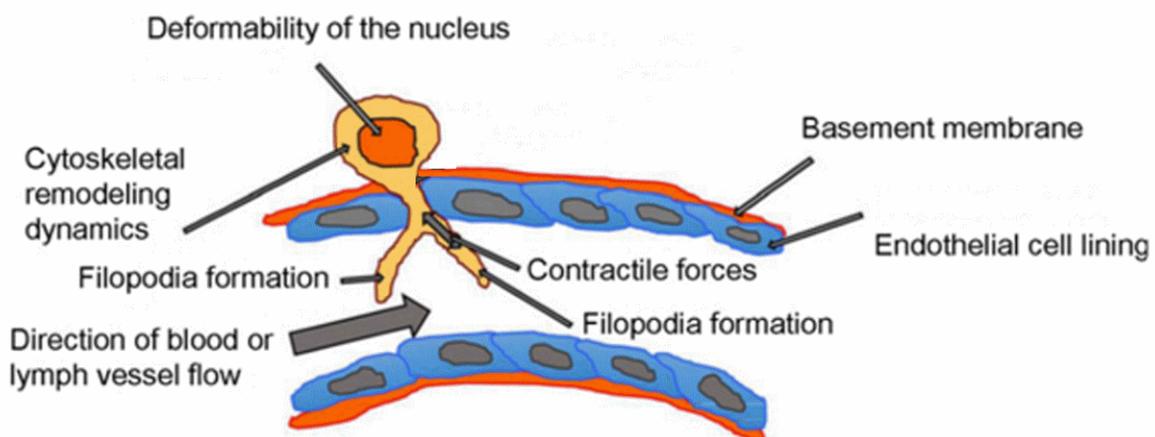


Figure 1.3 - Modifications des propriétés mécaniques dans le processus de transmigration cellulaire. Elles font intervenir de nombreux composants cellulaires : la déformation du noyau, la rigidité cellulaire ou la fluidité, la dynamique de remodelage des micros filaments du cytosquelette, les filaments intermédiaires et les microtubules, la capacité des cellules à produire et transmettre des forces contractiles. Pendant la migration transendothéliale, les cellules forment des filopodes qui perçoivent le microenvironnement mécanique et aident à déterminer le site de migration transendothéliale au sein de la paroi des cellules endothéliales (Mierke, 2014).

En plus de la rigidité de la cellule, la viscosité joue également un rôle important dans la définition des propriétés mécaniques d'une cellule. En effet, les cellules se comportent comme un matériau viscoélastique, présentant des caractéristiques à la fois solides et liquides (Kollmannsberger & Fabry, 2011). En raison de leurs propriétés viscoélastiques, les cellules se déforment d'une manière dépendante du temps. Leurs contraintes mécaniques se détendent lorsqu'elles sont soumises à une déformation constante; elles peuvent augmenter au cours du temps avec la déformation à la suite d'une charge constante (Kollmannsberger & Fabry, 2011). Par conséquent, la viscoélasticité de la cellule doit être prise en compte dans l'étude des propriétés mécaniques des cellules de cancer.

1.4.1 Modification des propriétés mécaniques dans les cellules cancéreuses du sein

Dans la dernière décennie, les propriétés mécaniques des cellules du cancer du sein ont été intensivement étudiées. De nombreux travaux expérimentaux ont été effectués pour tenter de distinguer, par analyse mécanique, les cellules cancéreuses des cellules non cancéreuses.

Par exemple, Lincoln *et al.* ont été les premiers à étudier la déformabilité des cellules épithéliales mammaires humaines non malignes et malignes en utilisant un tendeur microfluidique optique (MOS). Ils ont constaté que les cellules malignes peuvent s'allonger jusqu'à cinq fois plus que leurs homologues non malignes (Lincoln, et al., 2004) (Guck, et al., 2005). Dans une étude de 2008, les cellules mammaires malignes (MCF-7) sont apparues avoir un module d'élasticité apparent significativement plus faible (1,4-1,8 fois) que leurs équivalents non malignes (MCF-10A). Les images de microscopie (confocale et AFM) ont montré une différence significative dans l'organisation de leur structure sous-membranaire d'actine, ce qui contribue directement à révéler la différence dans l'élasticité des cellules (Li, Lee, Ong, & Lim, 2008).

1.4.2 Modification des propriétés mécaniques des cellules cancéreuses à l'intérieur de leur environnement : cellule - cellule et cellule - ECM

Chacune des cellules dans le corps a la même séquence d'ADN. Ainsi, l'information génétique devrait être essentiellement la même d'une cellule à une autre à l'intérieur d'un seul individu si d'autres facteurs n'interviennent pas pour provoquer une modification de l'information. Comme les cellules individuelles se multiplient et les tissus sont formés: les cellules communiquent entre elles et avec l'ECM de manière dynamique via des jonctions et des récepteurs, des hormones et d'autres facteurs. C'est cet échange mutuel d'informations entre les cellules et leur environnement qui permet l'organisation fonctionnelle des cellules dans les tissus et guide l'organogénèse au cours du développement. Le processus est indispensable et absolument nécessaire pour la vie multicellulaire. La communication entre les cellules et leur microenvironnement se produit à travers un réseau de signaux générés par des adhésions cellule-cellule et cellule-ECM et des molécules de jonction, ainsi que par la collaboration entre les autres types de cellules. Le milieu extracellulaire envoie des stimulants biochimiques et physiques sur les cellules, qui répondent au stress par de nombreux événements cellulaires tels que la rigidification, l'adoucissement, la maturation, l'afflux de calcium, des changements morphologiques, la génération de forces de traction ou d'adhérence locales (Discher, 2005), ainsi que des états pathologiques, notamment le cancer (Suresh, 2007) (Makale, 2007). En

conséquence, les composants intracellulaires tels que les protéines du cytosquelette, le cytoplasme ou la membrane contribuent aux propriétés mécaniques des cellules et des tissus.

Le cytosquelette de la cellule est constituée d'une structure très dynamique de filaments de protéines qui assurent la rigidité structurelle et la morphologie et permettent à la cellule d'exercer des forces et de produire un mouvement (Ingber, Prusty, Sun, Betensky, & Wang, 1995) (Stossel, 1993) (Janmey, 1998). Le noyau de la cellule fournit un degré de rigidité structurelle et de plasticité à la cellule (Dahl, Ribeiro, & Lammerding, 2008) (Guilak, Tedrow, & Burgkart, 2000).

L'ECM est reliée aux cellules environnantes par l'intermédiaire de protéines d'adhésion cellulaire qui agissent comme des récepteurs et attachent la matrice au cytosquelette (Ramage, 2011). Le collagène, la protéine fibreuse la plus abondante à l'intérieur de l'ECM, joue un rôle structurel et contribue aux propriétés mécaniques, à l'architecture moléculaire et à la forme des tissus.

Le collagène se lie aux récepteurs exposés à la surface cellulaire et régule la prolifération, la migration et la différenciation des cellules (Ricard-Blum, 2011). L'interaction avec les récepteurs de la surface cellulaire (intégrines) sert d'intermédiaire pour la transduction du signal entre la cellule et le milieu extracellulaire et vice-versa, dirigeant la morphologie, la physiologie de la cellule, les mouvements morphogénétiques et la migration (Lodish, Berk, Zipursky, & al., 2000) (Frantz, Stewart, & Weaver, 2010) (Albelda & Buck, 1990).

Plusieurs méthodes expérimentales existent aujourd'hui pour caractériser les propriétés mécaniques des cellules. Parmi ces méthodes, la technique dite des pinces optiques. Cette technique, accompagnée d'une nouvelle approche expérimentale, nous permettra d'étudier la viscoélasticité des cellules cancéreuses du sein de différents niveaux d'agressivité et l'influence, du point de vue mécanique, de l'environnement cellulaire. Ce qui suit est une introduction concise mais instructive à la technique des pinces optiques, puis un passage plus axé sur l'utilisation de pinces optiques pour les études des propriétés mécaniques cellulaires.

CHAPITRE 2

Théorie des pinces optiques

Depuis leur invention, la technique de pince et manipulation optiques est largement utilisée dans différents domaines tels que la biophysique, les sciences biologiques, la physique atomique, la chimie, etc.... Ces manipulations optiques sont applicables à des particules diélectriques microscopiques, de taille allant du nanomètre au micromètre (Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm, & Chu, 1986), à des atomes et à des molécules (Chu, Bjorkholm, Ashkin, & Cable, 1986), à des particules biologiques telles que des cellules vivantes (Ashkin, Dziedzic, & Yamane, 1987), à des virus et bactéries (Ashkin & Dziedzic, 1987).

Dans ce chapitre, une discussion du concept des pinces optiques sera suivie d'une description des forces "optiques" qui sont impliquées dans le piégeage optique. Une configuration de dispositif expérimental des pinces optiques que nous avons réalisé dans le cadre de ce travail sera ensuite présentée, de même que les exigences associées.

Différents aspects de l'utilisation de la configuration des pinces optiques comme un outil de mesure de force seront détaillés dans la dernière partie de ce chapitre. Pour une utilisation adéquate, le dispositif des pinces optiques doit être calibré. Les derniers paragraphes de ce chapitre présentent les différentes techniques utilisées dans ce travail pour le calibrage des pinces optiques.

2.1 Piégeage optique : historique

La théorie des pinces optiques est principalement basée sur les forces de pression de rayonnement, à savoir les forces exercées par un rayonnement électromagnétique sur la matière (Ashkin, 2006). La première observation de la pression de radiation remonte à 1609 avec Johannes Kepler, qui remarqua que la queue d'une comète s'éloignait toujours du Soleil. A partir de cette observation, il suggéra que les rayons solaires exercent une sorte de pression de radiation sur les particules. Sa théorie fut prouvée par la théorie du champ électromagnétique de James Clerk Maxwell. Au dix-neuvième siècle, il prédit que la lumière peut exercer des forces sur la matière. En 1970, Arthur Ashkin démontra la première observation de l'accélération des particules en suspension en utilisant la pression de radiation (Ashkin, 1970).

Dans son travail, Ashkin montra que des particules de taille microscopique peuvent être accélérées et piégées dans un puit de potentiel stable avec seulement la force de pression de radiation d'un laser continu. Il démontra que les particules à indice de réfraction élevé (i.e.

supérieur à celui du milieu environnant) sont entraînées dans l'axe du faisceau laser et accélérées dans la direction de propagation du faisceau.

En 1971, ce qui sera appelé ultérieurement "pince optique" a été utilisée pour la première fois dans une expérience de lévitation des particules microscopiques (Ashkin, 1971). Il a été démontré qu'un laser monomode focalisé et dirigé vers le haut peut soutenir des particules sphériques contre la force de gravité, orientée vers le bas, en utilisant la force de pression de radiation.

Ashkin a également montré que des sphères de tailles microscopiques peuvent être piégées à l'aide de deux faisceaux laser focalisés, se propageant en sens inverse (Ashkin, 1971) (Ashkin & Dziedzic, 1985). En 1978, il proposa pour la première fois qu'un seul faisceau laser fortement focalisé pouvait être utilisé pour piéger et manipuler des atomes par les forces de pression de rayonnement (Ashkin, 1978). Par la suite, Ashkin et ses collègues aux Laboratoires AT & T Bell réaliseront une expérience avec le premier faisceau laser monomode de piège optique, connu aujourd'hui sous le nom de « pince optique » (Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm, & Chu, 1986) (Chu, Bjorkholm, Ashkin, & Cable, 1986). Un faisceau laser unique, focalisé, a été utilisé pour piéger dans l'eau, de manière stable, dans les trois dimensions (3D), des particules de diamètres compris entre 25 nm et 10 μm .

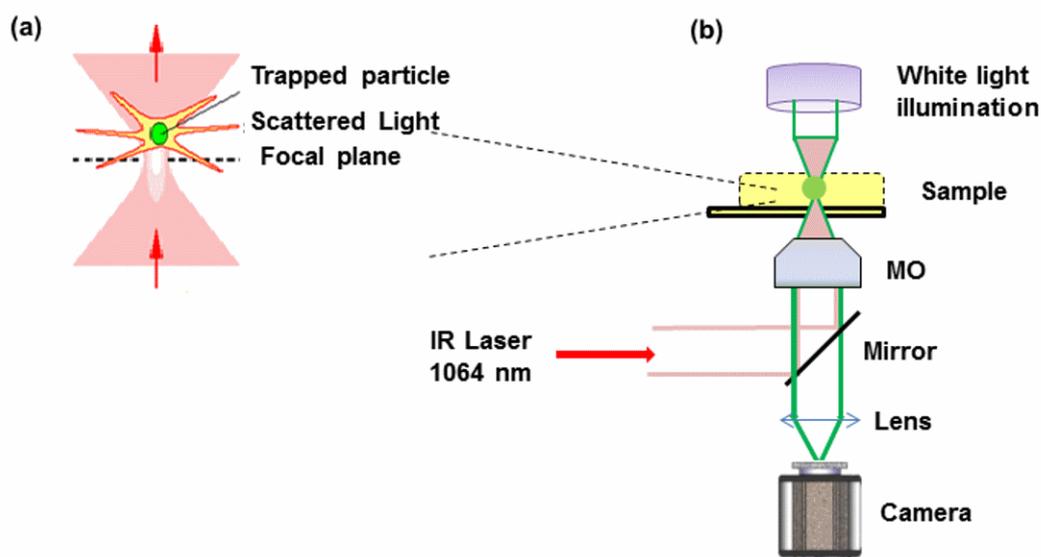


Figure 2.1 - Vue schématique d'un dispositif de piège optique.

(a) Croquis d'une particule soumise à un piégeage optique (Ashkin, 2006). L'objectif focalise le laser et crée un piège optique.

(b) Un faisceau laser est réfléchi par un miroir dichroïque et est dirigé vers une lentille objective. Le système d'imagerie est indiqué par le chemin optique des rayons lumineux (vert): la lumière blanche, qui sert à éclairer la chambre à échantillon, traverse la lentille objectif et le miroir dichroïque; une autre lentille permet de projeter l'image de l'échantillon sur une caméra pour le suivi de l'expérience en vidéo.

Une pince optique utilise les forces exercées par un faisceau de lumière fortement focalisé pour piéger les petits objets (**Figure 2.1**). La petite gamme de forces et les déplacements disponibles dans la pince optique rendent son utilisation appropriée pour des applications biologiques (Suresh, 2007) (Neuman & Nagy, 2008) (Moffitt, Chemla, Smith, & Bustamante, 2008) (Bustamante, Smith, Liphardt, & Smith, 2000) (Grier, 2003). Les premières études portant sur l'application des pinces optiques dans le domaine de la biologie ont été faites sur des particules assez grandes pour être manipulées directement plutôt que des molécules fixées à des sondes.

Le piégeage des particules biologiques a été proposé par Ashkin et Dziedzic (Ashkin & Dziedzic, 1987). Dans ce travail, ils ont rapporté leur étude sur le piégeage et la manipulation de cellules biologiques telles que les bactéries et les virus, en utilisant une lumière laser à argon dans le visible. Cependant, la forte absorption qui peut se produire dans la plupart des expériences biologiques conduit à prendre en compte le dommage induit par la lumière dans les expériences de piégeage optique pour des objets biologiques. Le photo-dommage résulte de l'exposition de l'échantillon piégé à une intensité lumineuse élevée qui peut être absorbée par les composants cellulaires et pourrait endommager la cellule.

Des progrès concrets ont été réalisés en vue de réduire les photo-dommages causés dans les systèmes de piégeage optique. Cela vient principalement du choix du laser de piégeage, avec des longueurs d'onde dans la région du proche infrarouge (Ashkin, Dziedzic, & Yamane, 1987), ou encore par la diminution de l'intensité lumineuse qui atteint l'échantillon. Les composants internes des cellules sont connus pour absorber une longueur d'onde dans la région visible alors que l'eau absorbe à des longueurs d'onde dans l'infrarouge lointain. Par exemple, les protéines et l'eau sont transparentes aux longueurs d'onde situées dans l'infrarouge (750-1200 nm) (Neuman & Block, 2004); le coefficient d'absorption de nombreux échantillons biologiques est faible dans cette fenêtre de longueur d'onde. En conséquence, la lumière peut être dirigée à travers l'échantillon avec une faible absorption.

La longueur d'onde typique utilisée pour les applications biologiques est d'environ 1 μm , longueur d'onde pour laquelle des tests de viabilité sur les cellules ont été faites (Neuman, Chadd, Liou, Bergman, & Block, 1999) (Ericsson, Hanstorp, Hagberg, Enger, & Nystrom, 2000). Pour cette raison, beaucoup de configuration des pinces optiques pour des applications biologiques utilisent les lasers infrarouge tels que Nd: YAG (néodyme: ytterbium-aluminium-grenat, 1064 nm), Nd: YVO4 (néodyme: ytterbium orthovanadate, 1064 nm) ou Nd: YLF (néodyme: ytterbium lithium-fluorure, 1047 nm ou 1053 nm).

Depuis lors, le piégeage optique a été très grandement utilisé dans l'étude de la biomécanique de différents systèmes biologiques, tels que des molécules, des cellules (Guck, et al., 2005) (Sleep, Wilson, Simmons, & Gratzer, 1999) (Difato, Pinato, & Cojoc, 2013), le cytosquelette (Wang, Butler, & Ingber, 1993) ou encore l'interaction cellule-substrat (Yousafzai, et al., 2016). Des échantillons biologiques ont été piégés et les pinces optiques ont été utilisées pour sonder les propriétés biomécaniques au niveau cellulaire (Nawaz, et al., 2012). L'avantage d'utiliser les pinces optiques sur des échantillons biologiques se trouve dans l'absence de contact physique avec l'échantillon et un faible photo-dommage induit sur ce dernier.

Un appareil de pince optique peut facilement être construit sur un microscope optique standard et ne nécessite pas une technologie complexe ou des coûts élevés. La **Figure 2.1** montre que le faisceau laser est focalisé par un objectif microscopique dans la chambre à échantillon (**Figure 2.1 (b)**). De petites particules qui diffusent dans le fluide de la chambre à échantillon sont confinées vers le point focal du laser et piégées par les forces exercées par le faisceau laser (**Figure 2.1 (a)**). Dans la plupart des expériences de piégeage, un objectif microscopique présentant une grande ouverture numérique (numerical aperture, NA) est utilisé pour obtenir un piégeage optique en 3D; un objectif avec une faible ouverture numérique ($NA < 0,9$) peut permettre un piégeage en 3D si la troisième dimension est une paroi (lamelle). Cependant, des expériences de piégeage impliquant l'utilisation d'objectifs à faible NA sont en général en 2D, confinant les particules le long de l'axe optique.

2.2 Piégeage optique : concept physique

Même si les pinces optiques sont une technique récente, la physique de base derrière le piégeage des particules par la lumière a été prédite il y a plusieurs siècles (1609) par Johannes Kepler, ensuite prouvée par la théorie du champ électromagnétique de James Clerck Maxwell. En effet, les pièges optiques utilisent les forces de pression de rayonnement, un terme qui se réfère généralement aux forces communiquées à la matière par l'absorption, la diffusion, l'émission ou la réémission de la lumière. Lorsqu'un faisceau de lumière incident rencontre un changement dans les propriétés optiques du milieu dans lequel il se propage, il peut être absorbé ou diffusé par l'objet se trouvant sur le trajet lumineux. Lorsque la lumière est diffusée par un objet dont l'indice de réfraction est différent de celui du milieu de propagation de la lumière, il s'en suit un changement de la direction de propagation de la lumière, conformément à la loi de Snell-Descartes. En conséquence de ce changement de direction, l'impulsion associée varie. La conservation de la quantité de mouvement exige que l'objet soit le siège d'un changement égal

et opposé en quantité de mouvement, ce qui donne lieu à une force agissant sur l'objet, comme illustré par la **Figure 2.2**. Dans ce cas, on considère un rayon lumineux avec une impulsion \vec{P} , incident sur une particule sphérique dont l'indice de réfraction est plus élevé que celui du milieu de propagation de la lumière. Selon la troisième loi de Newton, si un objet exerce une force sur un rayon lumineux faisant ainsi changer sa direction de propagation, par exemple durant la réflexion ou la réfraction, celui-ci exercera également sur l'objet une force égale mais de direction opposée. La force exercée sur l'objet peut donc être déterminée à partir de la conservation de la quantité de mouvement.

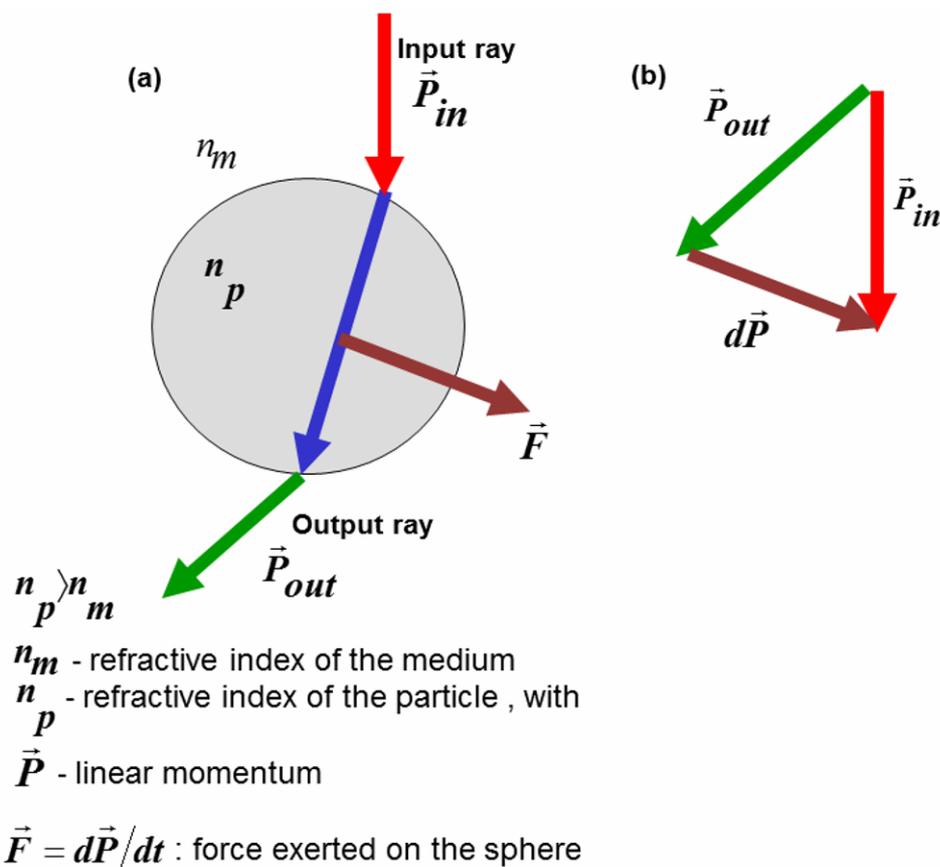


Figure 2.2 - Illustration, basée sur les rayons optiques, de la force agissant sur une particule dont l'indice de réfraction est élevé, en raison de l'impulsion transférée.

(a) : un rayon représentatif (\vec{P}_{in}) passe à travers une particule sphérique transparente. Le rayon change de direction de propagation et la force de réaction (\vec{F}) tire la sphère vers la droite.

(b) : un diagramme vectoriel indique le mécanisme accompagnant le changement dans l'impulsion du rayon incident. La différence de quantité de mouvement ($d\vec{P}$) produit une réaction égale et opposée dans la sphère.

Une explication qualitative du mécanisme de piégeage optique pour des particules sphériques peut également être donnée par l'optique géométrique (Ashkin, 1992). Dans ce cas, le faisceau lumineux peut être représenté par un ensemble de rayons, chacun se propageant à l'intérieur de la particule diffuseur suivant les lois de l'optique géométrique. Quand un rayon du faisceau de lumière rencontre la particule sphérique, cette dernière réfracte le rayon lumineux et fait dévier ainsi sa trajectoire, provoquant un changement de son impulsion. Cette variation de la quantité de mouvement est transférée à la particule, entraînant ainsi une force nette agissant sur celle-ci. La **Figure 2.3** représente la direction de la force résultante exercée sur la particule par une paire de rayons d'égales intensités, provenant d'un faisceau Gaussien fortement focalisé, pour les déplacements axiaux et latéraux de la particule par rapport à l'axe optique du faisceau. Dans les deux cas, la particule est déplacée vers le centre du piège (c'est-à-dire l'intersection des rayons incidents sur la particule) par les forces de pression de rayonnement.

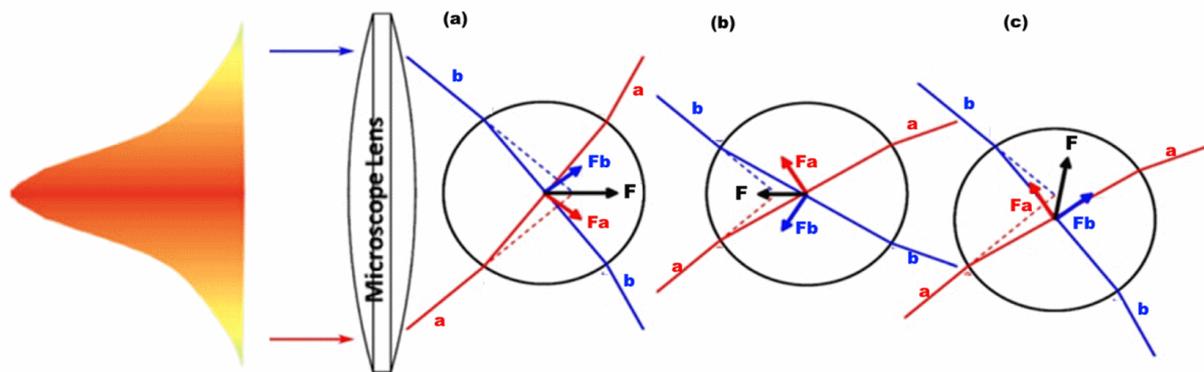


Figure 2.3 - Illustration, basée sur les rayons optiques, du piégeage d'une sphère diélectrique à haut indice de réfraction par un faisceau de lumière. La réfraction d'une paire de rayons (a et b) issus du faisceau se traduit respectivement par les forces F_a et F_b . La somme de ces deux forces correspond toujours à un retour vers la position d'équilibre, pour tout déplacement axial et transversal de la sphère par rapport à la position du piège (intersection des lignes en pointillées). (a) et (b) montrent la force axiale de rappel agissant sur la particule qui est déplacée axialement. De la même façon, (c) représente la force de rappel latérale sur la particule (Cizmar, Davila Romero, Dholakia, & Andrews, 2010).

Une description quantitative des forces impliquées dans le piégeage optique a été présentée par Ashkin (Ashkin, 1992). Dans son travail, il a étudié les forces appliquées par une pince optique sur une sphère diélectrique dans le régime de l'optique géométrique. Etant donné que ces forces sont calculées compte tenu de la réfraction des rayons lumineux à travers la sphère, elles sont donc fonctions du pouvoir lumineux de la lumière incidente. La force totale agissant sur la particule peut alors être donnée comme suit:

$$F = \frac{Q \cdot n_m \cdot P}{c} \quad (2.1)$$

Q représente une efficacité sans dimension qui dépend de l'objet piégé, n_m l'indice de réfraction du milieu de suspension, P est la puissance de la lumière incidente et c est la vitesse de la lumière. A titre d'exemple de l'estimation de ces forces, on considère une puissance de 10 mW : avec un rendement de piégeage de 0,5, la force de piégeage peut être estimée dans la gamme des pN.

De cette équation, on peut noter que pour réaliser une force de piégeage élevée, il faudrait augmenter n_m , P ou le facteur de rendement total Q . Toutefois, une augmentation de la puissance du laser de piégeage peut introduire des dommages ou le chauffage de l'objet pris au piège. De même, l'augmentation de l'indice de réfraction de la particule piégée peut conduire à des difficultés potentielles dans la réalisation de bons pièges (Ashkin, 1992). En conséquence, le paramètre de piégeage qui peut être considéré pour améliorer la force de piégeage est Q , l'efficacité du piège.

Fällman E. et Axner O. (Fällman & Axner, 2003) ont également étudié la façon dont les positions du piège ainsi que sa rigidité dépendent de la position de focalisation du laser dans la chambre à échantillon, de l'ouverture numérique de l'objectif et du degré de remplissage de la pupille d'entrée de l'objectif. Par leur étude et celle d'Ashkin en 1992, ils ont montré que l'expansion de la taille d'un faisceau laser gaussien afin de surcharger légèrement la pupille d'entrée de l'objectif peut augmenter le rapport de la force de piégeage à la force de diffusion. Il en résulte une amélioration de l'efficacité du piégeage.

2.3 Forces optiques sur des objets

Le concept de force de pression de rayonnement a été étudié pendant des siècles. Il n'est toutefois pas trivial de fournir une description théorique des forces impliquées dans le piégeage des particules de taille microscopique par un faisceau laser fortement focalisé. Dans une pince optique, une particule diélectrique près du centre de piégeage sera soumise à une force en raison du transfert de l'impulsion dans la diffusion du laser incident. La force optique résultante peut être divisée en deux composantes: une force de dispersion et une force de gradient (Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm, & Chu, 1986) (Svoboda & Block, 1994). La force de dispersion est proportionnelle à l'intensité lumineuse ; elle agit dans le sens de propagation de la lumière et a tendance à pousser la particule loin du point de focalisation du laser. Parallèlement, la force de gradient, proportionnelle au gradient de l'intensité lumineuse, agit dans la direction du gradient de l'intensité et a tendance à attirer les particules vers le foyer du laser. En fonction des indices de réfraction respectifs de l'objet diffuseur et du milieu environnant ainsi que de la géométrie de l'objet diffuseur, une particule peut être poussée par les forces de pression de rayonnement

vers le point de focalisation d'un faisceau laser convergent. Pour un piégeage stable dans les trois dimensions, la composante gradient de la force de traction de la particule en direction de la région focale doit être supérieure à la composante dispersion de la force, qui l'écarte de cette région. Un angle maximal de convergence des rayons permet d'avoir des forces axiales élevées et dirigées vers le centre du piège. La particule est maintenue dans le centre du faisceau grâce à la force transverse de gradient.

Dans la plupart des prédictions théoriques de forces impliquées dans les pinces optiques, l'objet à manipuler est supposé avoir une géométrie sphérique. Dans le développement d'un traitement théorique du piégeage optique, il y a deux cas limites dans lesquels la force agissant sur une sphère peut être calculée. Lorsque le diamètre de la sphère piégée (d) est beaucoup plus grand que la longueur d'onde λ du laser de piégeage ($d \gg \lambda$), les conditions de diffusion de Mie sont satisfaites ; les forces optiques peuvent être calculées à partir de l'optique géométrique (Ashkin, 1992). Quand la sphère piégée est beaucoup plus petite que la longueur d'onde du laser de piégeage, ($d \ll \lambda$), les conditions de diffusion de Rayleigh sont satisfaites ; les forces optiques peuvent être calculées en utilisant la théorie électromagnétique, en traitant ainsi la particule piégée comme un dipôle (Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm, & Chu, 1986).

2.3.1 Régime de l'optique géométrique ($d \gg \lambda$)

Lorsque la taille de la particule dans le piège est supérieure à la longueur d'onde du faisceau de lumière incidente, les lois de l'optique géométrique peuvent être utilisées pour estimer le modèle de diffusion. Dans ce cas, le faisceau lumineux peut être représenté comme un ensemble de rayons, chacun interagissant avec la particule suivant les lois de l'optique géométrique. Cette approche a été utilisée durant les deux dernières décennies pour estimer les forces de pression de rayonnement dans ce régime (Svoboda & Block, 1994) (Roosen, 1979) (Roosen & Imbert, 1976). La **Figure 2.3** donne un exemple typique du piégeage d'une sphère diélectrique (dont l'indice de réfraction est supérieur à celui du milieu environnant) par un faisceau Gaussien fortement focalisé. Sur cette figure, les rayons optiques indiquent les forces de gradient dans la direction du gradient d'intensité; ces forces proviennent d'une paire de deux rayons (a et b) avec la même intensité représentant une partie du profil du faisceau Gaussien et agissant sur la particule. En effet, les variations de la quantité de mouvement des rayons lumineux sont égales en amplitude ; ce qui provoque une force de réaction agissant sur la particule, dans le sens axial (Figure 2.3 (a) et (b)). Dans la Fig. 2.3 (a), la particule sphérique est située entre l'objectif et le point focal; tandis que dans Fig. 2.3 (b) la particule se trouve

derrière le point focal (le point focal est indiqué par l'intersection des lignes en pointillées qui montrent la direction des rayons s'ils n'étaient pas réfractés par la particule). Parallèlement, dans Fig. 2.3 (c), la particule est positionnée en dessous du point focal (i.e. latéralement). Sur ces figures, les forces de dispersion pointant dans la direction des rayons incidents ne sont pas représentées.

La force de gradient et la force de diffusion, résultant du régime de l'optique géométrique, ont été obtenues dans les premiers travaux effectués par **Ashkin *et al.* (1992)**. La **Figure 2.4** est une illustration du mécanisme de la diffusion d'un rayon lumineux de pouvoir p_i dans le régime de l'optique géométrique, avec représentation des forces de gradient et de diffusion. Le faisceau est focalisé par une lentille d'objectif le long de l'axe vertical de la particule (Fig. 2.4 (a)).

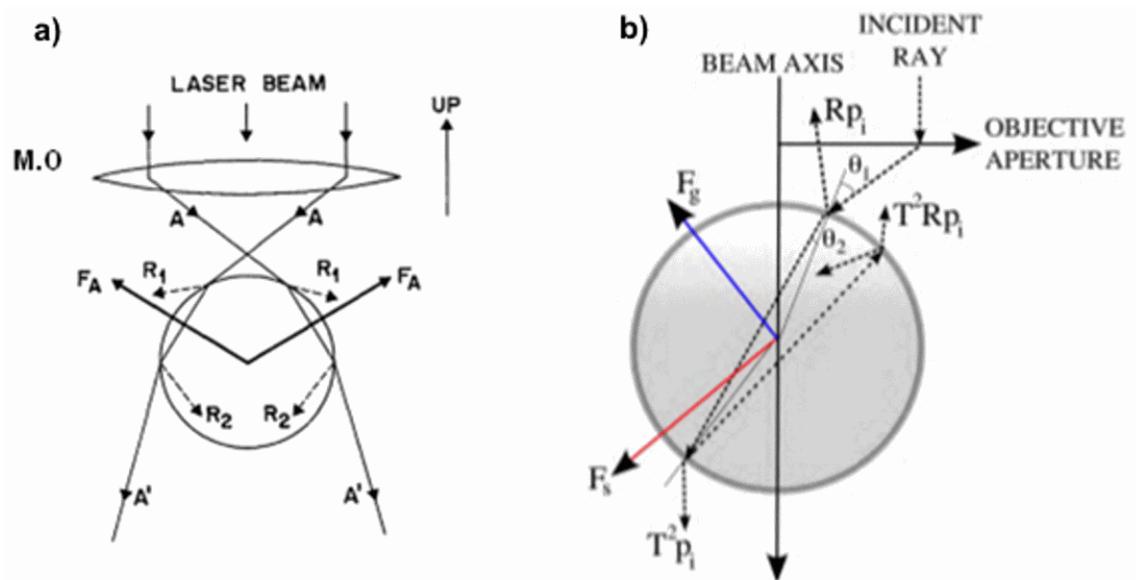


Figure 2.4 - (a) : Pince optique dans le modèle de l'optique géométrique, avec la position du piège située le long de l'axe vertical de la sphère. (b) : Géométrie d'un rayon incident donnant lieu à la force de gradient F_g et à la force de diffusion F_s (Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm, & Chu, 1986) (Svoboda & Block, 1994).

La force totale agissant sur la sphère est la somme des contributions dues au rayon réfléchi de pouvoir Rp_i et le nombre infini de rayons réfractés émergents de pouvoir successivement décroissant $p_i T^2$, $p_i T^2 R$, ... $p_i T^2 R^n$ Cette force peut alors être décomposée en deux composantes : la force de gradient F_g dans la direction du gradient de l'intensité et la force de diffusion F_s dans la direction du rayon incident.

Pour des particules sphériques diélectriques dont la taille est supérieure à la longueur d'onde du faisceau laser de piégeage, ces forces sont données par les expressions suivantes, telles que démontrées par Roosen et collègues (Roosen, 1979) (Roosen & Imbert, 1976):

$$F_s = \frac{n_m \cdot p_i}{c} \left(1 + R \cos 2\theta_1 - \frac{T^2 [(\cos(2\theta_1 - 2\theta_2) + R \cos 2\theta_1)]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\theta_2} \right) \quad (2.2.a)$$

$$F_g = \frac{n_m \cdot p_i}{c} \left(R \sin 2\theta_1 - \frac{T^2 [(\sin(2\theta_1 - 2\theta_2) + R \sin 2\theta_1)]}{1 + R^2 + 2R \cos 2\theta_2} \right) \quad (2.2.b)$$

Dans ces équations, l'angle θ_1 représente l'angle d'incidence, θ_2 est l'angle de réfraction, n_m est l'indice de réfraction du milieu environnant, p_i est le pouvoir lumineux du rayonnement incident et c est la vitesse de la lumière. Les paramètres R et T sont respectivement les coefficients de Fresnel pour la réfraction et la transmission. Les deux équations montrent la dépendance de ces forces de la polarisation; R et T sont différents pour les rayons polarisés perpendiculairement ou parallèlement au plan d'incidence.

Pour des faisceaux (de forme complexe) tels que les faisceaux très convergents utilisés dans les pinces optiques, les forces de gradients et de diffusion seront définies comme les sommes de vecteurs des contributions des forces des rayons individuels du faisceau (Ashkin, Dziedzic, Bjorkholm, & Chu, 1986).

2.3.2 Régime de Rayleigh ($d \ll \lambda$)

Lorsque la taille de la particule est très faible par rapport à la longueur d'onde de la lumière, λ , les forces de piégeage entrent dans le régime électromagnétique. La particule peut être assimilée à un dipôle, avec un moment dipolaire induit par le champ électrique de la lumière. L'interaction entre le dipôle induit et le champ électrique de la lumière crée un potentiel électrostatique qui donne naissance à une force de gradient pour un profil d'intensité variable dans l'espace (Eq. 2.3.a). La variation de la quantité de mouvement de la particule due à la dispersion peut être calculée, en considérant le flux de photons incident sur la particule et celui transmis après interaction, en considérant la conservation de l'impulsion. La force de dispersion résultante est estimée selon l'Eq. 2.3.b (Svoboda & Block, 1994). La compétition entre ces deux forces peut se traduire par un piégeage stable (Ashkin, 1992). Dans ce cas, la force de gradient attire la particule dans la région d'intensité plus élevée tandis que la force de dispersion attire la particule dans une position d'équilibre qui est légèrement en aval de l'intensité maximale.

D'après les calculs d'Ashkin, la force de gradient et la force de diffusion peuvent être obtenues à l'aide des expressions suivantes:

$$\vec{F}_g = -\frac{n_m^3 \cdot r^3}{2} \left(\frac{n_c^2 - 1}{n_c^2 + 2} \right) \nabla \vec{E}^2 \quad (2.3.a)$$

$$F_s = \frac{128\pi^5 r^6}{3\lambda^4} \left(\frac{n_c^2 - 1}{n_c^2 + 2} \right) \frac{n_m}{c} I_o \quad (2.3.b)$$

Dans ces équations, n_m est l'indice de réfraction du milieu environnant, r et n_p sont respectivement le rayon et l'indice de réfraction de la particule piégée, c est la vitesse de la lumière, $n_c = n_p / n_m$ est l'indice relatif de réfraction, E , I_o et λ représentent respectivement le champ électrique de la lumière incidente, son intensité et sa longueur d'onde.

Les équations 2.3 (a et b) montrent que la force de gradient est linéairement proportionnelle au gradient de l'intensité lumineuse tandis que la force de dispersion dépend linéairement de l'intensité lumineuse. Si l'indice de réfraction de la particule est supérieur à celui du milieu environnant, la force de gradient est dirigée vers le point d'intensité maximale, i.e., vers le point focal du faisceau lumineux. Dans ce cas, la particule peut être piégée dans une position d'équilibre légèrement décalée par rapport au centre du laser, du fait de la force de dispersion résultant dans la direction de propagation de l'intensité lumineuse. Par contre, une particule ayant un faible indice de réfraction (par rapport au milieu de propagation) sera repoussée en direction de la région à faible pente.

2.3.3 Autres régimes

Lorsque les dimensions de la particule piégée sont comparables à la longueur d'onde du laser de piégeage ($d \sim \lambda$), aucune des deux 'approches (celle de l'optique géométrique ou celle du dipôle) n'est valide. En l'absence d'un modèle précis pour ce régime intermédiaire, le comportement de la particule piégée est déterminé empiriquement (Ashkin, 1992).

Même si le piégeage des sphères diélectriques de taille microscopique a été étudié de manière intensive, la technique des pinces optiques ne se limite pas à ce cas particulier. Le piégeage des particules faites à partir de matières différentes et avec différentes formes géométriques a aussi été étudié. Il en est de même pour des particules de faible indice de réfraction (bulles d'air dans l'eau) ou des matériaux fortement diffuseurs (particules métalliques). Les objets ayant un indice de réfraction inférieur à celui du milieu environnant, tels que les bulles, sont généralement repoussés du piège optique car ils sont attirés dans la zone de faible intensité lumineuse le long

du gradient de lumière. Les objets qui sont fortement réfléchissants tels que les objets métalliques sont également repoussés d'un piège optique en raison de la pression de radiation. Dans ces cas, des arrangements de faisceaux plus complexes sont nécessaires pour maintenir le piégeage. Cependant, des particules métalliques de petites tailles, i.e., avec un diamètre faible par rapport à la longueur d'onde du laser de piégeage, peuvent être piégées, puisque dans ce régime la diffusion des métaux et celle des particules diélectriques sont considérées comme similaire (Svoboda & Block, 1994).

2.3.4 Explication mécanique des forces agissant sur une particule piégée

Le mécanisme de piégeage optique tel qu'illustré en **Figure 2.5** permet de comprendre le principe de piégeage optique, même si la caractérisation n'est pas complète. Les forces optiques ne sont pas les seules forces exercées sur la particule piégée. Une particule piégée est également soumise à des collisions avec les molécules du fluide (milieu de piégeage), provoquant ainsi une fluctuation de sa position autour de la position d'équilibre du piège, comme esquissé dans la **figure 2.5**.

Trois types de forces sont connues être impliquées dans un piégeage optique:

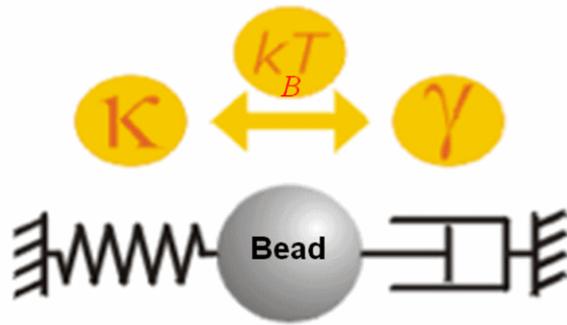
- la force de rappel (détaillée dans la partie 2.4.2) en raison du piège optique: $F = \kappa \cdot x(t)$, où $x(t)$ est le déplacement de la particule du centre du piège et κ la rigidité du piège;
- la force de traînée, due à la viscosité du milieu: $F_d = \gamma \cdot v$, où γ est le coefficient de traînée et v la vitesse du fluide;
- la force thermique $F(t)$, due à l'énergie thermique ($K_B T$) transférée à la particule:

$$F(t) = \xi(t) \sqrt{2\gamma k_B T}$$

La force thermique varie de façon aléatoire (en raison du mouvement brownien thermique). L'équilibre de la force totale qui régit la dynamique de la particule en mouvement brownien dans le piège et libre de toute forces extérieures peut alors être caractérisée par l'équation suivante (Ranaweera & Bamieh, 2004):

$$F + F_d = F(t) \quad (2.4)$$

Dans cette dynamique, les forces d'inertie sont négligées en raison d'un nombre de Reynolds faible pour les objets de petite taille.



κ : Rigidité du piège
 γ : Coefficient de trainée
 K_B : Constant de Boltzmann
 T : Température dans le milieu du piège

Figure 2.5 - Modèle mécanique des forces agissant sur une particule dans un piège. Le ressort représente la force de rappel due à la rigidité du piège; l'amortissement est dû à la traînée visqueuse; la flèche orientée à double sens représente les forces aléatoires dues à l'énergie thermique. (Tiré de <http://www2.bioch.ox.ac.uk/~oubsu/ebjknigh/motion.html>)

2.4 Réalisation du dispositif de pince optique

Une pince optique est le plus souvent construite en modifiant un microscope inversé, de sorte qu'un faisceau laser peut être introduit dans le trajet optique avant l'objectif. Au-delà des éléments nécessaires pour un simple piégeage et une manipulation d'objets, des éléments supplémentaires sont toutefois nécessaires, dépendant des paramètres de l'échantillon à étudier.

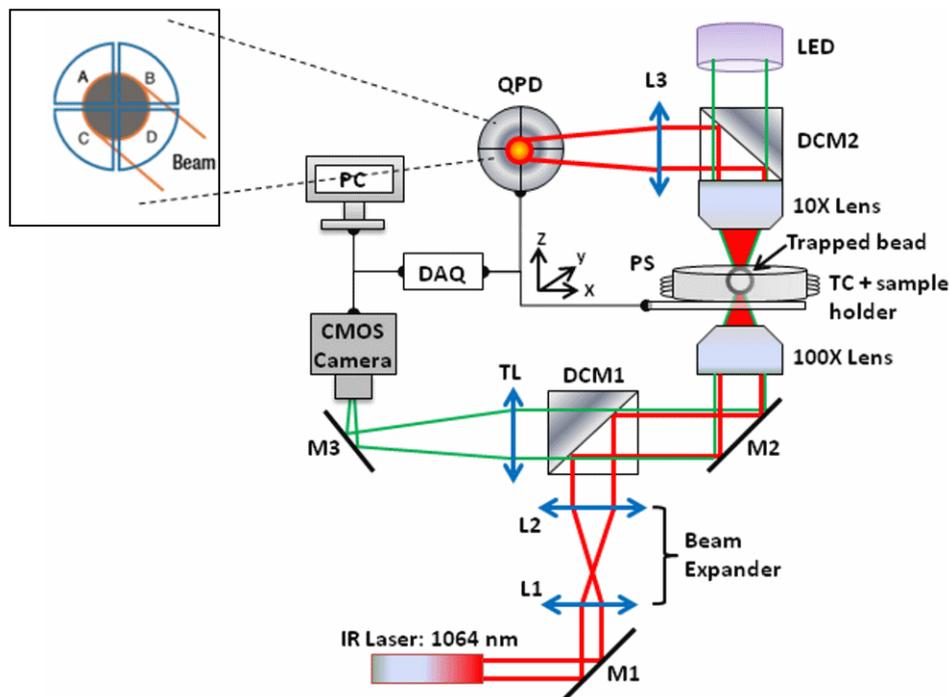


Figure 2.6 - Une configuration de dispositif de pince optique pour la mesure de forces. Trajets du faisceau de piégeage et de la lumière pour l'acquisition en vidéo - PS: nano-pièzo avec 3 axes; DAQ: carte numérique d'acquisition analogique; TL: lentille convergente; L1-L3 lentilles convergentes; M1-M3: miroirs; DCM: 1-2 miroirs dichroïques, TC: support du contrôleur de températures. L'encadré montre le schéma de la surface de la diode à quatre quadrants (QPD) pour le capteur des déplacements latéraux et axiaux. Figure modifiée à partir de (Yousafzai, et al., 2016). Les signaux de tension le long des quadrants sont additionnés par paires et les différences sont dérivées pour obtenir les déplacements dans les directions latérales (x , y) et axiales (z): $x = (A + B) - (C + D)$, $y = (A + C) - (B + D)$, $z = A + B + C + D$.

Dans ce travail nous avons utilisé un kit modulaire de base de pince optique de Thorlabs (Thorlabs), que nous avons modifié; les composants sont présentés dans la **Figure 2.6**. Un laser IR (monomode Yb laser à fibre YLM-5, 1064 nm, max 5 W, IPG Photonics GmbH) a été utilisé comme source laser de piégeage mais également comme laser de détection. La tête du laser a un collimateur intégré fournissant un faisceau laser TEM00 ayant un diamètre $D = 5\text{ mm}$. Après réflexion par le miroir M1, le faisceau passe à travers un élargisseur de taille du faisceau (2X), ce qui augmente son diamètre de sorte qu'elle débordé légèrement de la pupille d'entrée de l'objectif microscopique (Nikon 100X, NA 1,25 immersion avec de l'huile, WD 0.3). Le faisceau laser est ensuite focalisé dans la chambre de piégeage (boîte de Pétri) par l'objectif, où une particule est piégée au point focal résultant. Un support "fait-maison" de contrôleur de température (Tavano, Bonin, Pinato, Stanta, & Cojoc, 2011) est relié à la chambre d'échantillon pour maintenir les cellules à la température physiologique ($T = 37^\circ\text{ C}$) au cours des expériences. Celle-ci est montée sur un cube nano piézoélectrique, PS (Thorlabs, Nanomax avec trois axes de déplacement) permettant un contrôle avec une précision de 5 nm des déplacements de l'échantillon. Un deuxième objectif (Nikon 10x, NA 0,25 WD 7) permet de recueillir la lumière laser diffusée par la particule piégée. La lumière diffusée interfère dans le plan focal arrière (BFP) de la seconde lentille. Le motif d'interférence (IP) est projeté par une lentille L3 ($f = 40\text{ mm}$) sur le photo-détecteur à quatre quadrants QPD (Thorlabs, PDQ80A), dont la taille est de 7,8 mm, qui détecte les déplacements latéraux et axiaux de la particule piégée. L'échantillon est éclairé par une lumière provenant d'une diode à travers la seconde lentille microscopique. L'image de l'échantillon est ensuite projetée par le biais du premier objectif et une lentille (TL) sur le capteur d'une caméra CMOS (Thorlabs, CDC 1240C). Cette configuration de la pince optique permet également des mesures précises de position dans les trois directions (x, y et z), ainsi que l'étalonnage précis des forces de piégeage. La bande passante élevée disponible (150 kHz) permet d'atteindre une résolution spatiale du nanomètre et une résolution temporelle élevée.

2.5 Pincés optiques comme transducteur de force

Les pincés optiques ont été utilisées de manière intensive non seulement pour piéger et manipuler des biomolécules ou des cellules mais aussi pour mesurer directement et avec précision les forces impliquées. Cependant, la plupart des objets étudiés ne sont pas piégés directement mais manipulés par des sondes qui leur sont rattachées.

La théorie actuelle (telle que présentée dans la partie 2.3) étant peu fiable dans le calcul des forces optiques, ces dernières doivent être déterminées empiriquement. Pour de petits

mouvements d'une particule piégée dans le centre du piège optique, les forces agissant sur la particule peuvent être approchées comme un ressort linéaire agissant au centre du piège. A partir de la loi de Hooke, la force de rappel est donnée par l'expression suivante:

$$F = \kappa \cdot x \quad (2.5)$$

Dans cette expression, F est la force de piégeage optique agissant sur la particule, x représente le déplacement de la particule par rapport à la position d'équilibre du piège et κ est la constante de raideur du ressort, qui représente la rigidité du piège. Cette expression est supposée linéaire sur une plage de $\pm 300nm$ de déplacement de la particule par rapport à la position d'équilibre du piège (Neuman & Nagy, 2008) (Neuman & Block, 2004). Ainsi, la mesure de la force se réduit à une mesure de position, une fois que la rigidité du piège est étalonnée.

Plusieurs méthodes de mesure de la rigidité du piège ont été mises en œuvre, chacune avec ses avantages et inconvénients (Neuman & Block, 2004) (Visscher, Gross, & Block, 1996). Trois méthodes d'étalonnage de la rigidité du piège sont discutées en 2.5.2 la méthode d'équipartition, la méthode du spectre de puissance et la méthode de la force de traînée.

En conséquence de l'équation 2.5, les pinces optiques peuvent être utilisées comme transducteur de force. Elles l'ont été pour mesurer directement les forces sur des particules sphériques de taille microscopique (seules ou comme sondes) ou pour exercer des forces externes sur des cellules biologiques (de l'ordre de 10^{-1} - 10^2 pN) (Zhang & Liu, 2008) et étudier la réponse mécanique induite.

La **Figure 2.6** est une illustration de la configuration que nous avons utilisée dans ce travail pour effectuer des mesures quantitatives de position dans les trois directions (x, y et z) et un étalonnage précis de la rigidité du piège. Pour une position et une rigidité calibrées du piège, une mesure de force peut alors être effectuée. Les deux paragraphes suivants donnent les détails sur les méthodes utilisées pour étalonner la position et la rigidité du piège.

2.5.1 Techniques d'étalonnage de la position du piège

Pour pouvoir utiliser les pinces optiques comme un instrument de mesure quantitative permettant de mesurer des positions et des forces, le système de détection doit être calibré. Un procédé d'étalonnage du détecteur de position repose sur l'étude du mouvement thermique (brownien) dans le piège optique d'une particule de taille connue (Neuman & Block, 2004) (Berg-Sørensen & Flyvbjerg, 2004) (Berg-Sørensen, Peterman, Weber, Schmidt, & Flyvbjerg, 2006); une autre méthode d'étalonnage interprète les déplacements de l'objet emprisonné, en réponse à un déplacement connu le traversant (Neuman & Block, 2004) (Simmons, Finer, Chu,

& Spudich, 1996). Dans les deux cas, le mécanisme de mesure repose sur l'étude des interférences entre la lumière diffusée vers l'avant de la particule et la lumière non diffusée (Gittes & Schmidt, 1998). Le motif d'interférence produit est alors collecté par le deuxième objective et projeté sur le QPD. Ce dernier permet de détecter et mesurer les changements dans les distributions latérales et axiales de la lumière au niveau du plan focal arrière du deuxième objective. Lorsque la particule est au centre du piège, la lumière projetée à la surface du détecteur est centrée. Tout déplacement latéral de la particule piégée se reflète sur la surface du détecteur par un déplacement latéral de la tache lumineuse le représentant tandis qu'un déplacement axial se traduirait par une variation de l'intensité lumineuse mesurée sur le détecteur. La tension mesurée sur chacun des quatre quadrants du photo-détecteur (QPD) est additionnée par paires. La différence entre chaque paires est dérivée pour obtenir les déplacements de la particule piégée dans les directions latérales (x , y); et leur somme, le déplacement dans la direction axiale (z).

Les signaux différentiels peuvent également être normalisés par rapport au signal de la somme provenant des quatre quadrants afin de réduire la dépendance de la sortie mesurée par rapport à l'intensité lumineuse totale.

Nous présentons ci-après les détails sur les techniques d'étalonnage de la position que nous avons utilisées dans ce travail.

a) Méthode de la particule collée

Cette méthode d'étalonnage de la position est obtenue par le déplacement d'une particule fixée à la surface de la chambre à travers la zone de détection et en enregistrant les sorties du détecteur en fonction de la position. La courbe d'étalonnage obtenue permet de convertir la sortie de tension du QPD en distance (nanomètre). Pour une bille de silice de $3\ \mu\text{m}$ de diamètre, la courbe d'étalonnage obtenue à partir de cette méthode est représentée dans la **Figure 2.7**. Dans cet exemple, la lamelle qui retient la bille fixe est déplacée avec une fonction sinusoïdale. Le facteur de conversion, appelé aussi la sensibilité, est ensuite déterminée à partir de la pente de la partie linéaire de cette réponse.

Alternativement, cette sensibilité linéaire peut être déterminée par une analyse spectrale de puissance du mouvement de la particule dans le piège.

a) Méthode de la densité spectrale de puissance

Cette technique d'étalonnage repose sur l'analyse du mouvement brownien de la particule dans le piège optique. L'étalonnage est facilité par le fait que le nombre de Reynolds est généralement

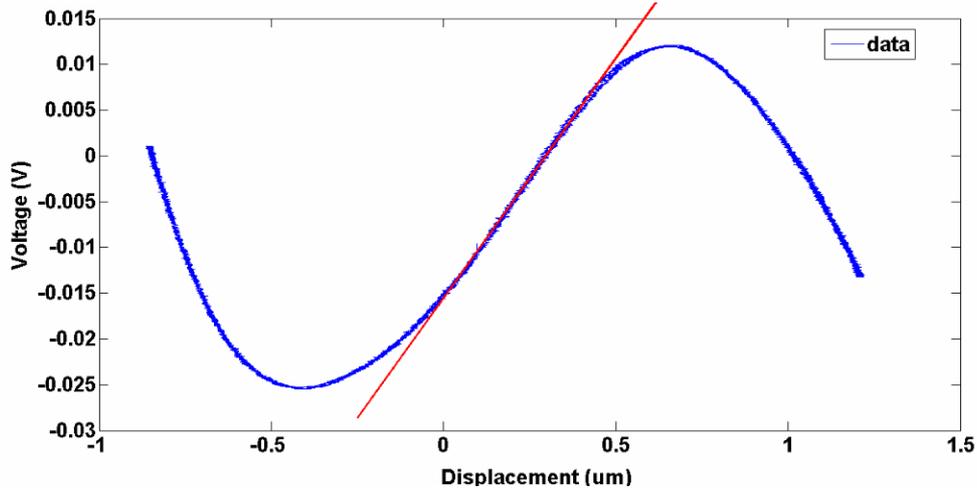


Figure 2.7 - Exemple d'étalonnage de position avec la méthode de la particule fixée à la surface. Le facteur de conversion tension/position est mesuré à partir de la pente dans la zone linéaire de la courbe. La réponse du détecteur par rapport au déplacement est linéaire dans une région d'environ 250 nm à partir du centre.

faible pour les particules sphériques de taille microscopique: $Re = \rho r v / \eta \sim 10^{-5}$, où v est la vitesse du fluide, r le rayon de la particule, ρ la densité de la particule et η la viscosité du fluide. Par conséquent, les forces d'inertie restent négligeables par rapport aux forces de traînée, F_d ,

appliquées sur la particule ‘stationnaire’. Ces dernières sont données par: $F_d = \gamma \cdot v$, où γ est le coefficient de traînée et v est la vitesse du fluide. Dans ce régime, l'équation du mouvement de la particule est celle d'un oscillateur sans masse, amorti et entraîné par le mouvement brownien. Le spectre de puissance pour la particule (objet) dans le milieu visqueux et immobilisé par un piège de rigidité κ a la forme d'une Lorentzienne (Svoboda & Block, 1994):

$$S_m(f) = \frac{K_B T}{\gamma \pi^2 (f_c^2 + f^2)} \quad (2.6)$$

Dans cette expression, $S_m(f)$ est exprimée en unité de déplacement²/Hz ; K_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue du milieu, γ le coefficient de traînée hydrodynamique (Equation 2.9) et f_c la fréquence de coupure. Le détecteur mesure un spectre de puissance non-étalonné $S_{vv}(f)$ (**Figure 2.8**), qui est lié au véritable spectre de puissance par la relation 2.7, dans laquelle ρ représente la sensibilité linéaire du détecteur (en volts/unité à distance).

$$S_{vv}(f) = \rho^2 \cdot S_m(f) \quad (2.7)$$

La sensibilité peut donc être trouvée en prenant en compte le produit du spectre de puissance (**Equation 2.6**) et la fréquence au carré, $S_{nn}(f) \cdot f^2$. Ce produit se rapproche asymptotiquement de la limite $K_B T \cdot (\pi^2 \gamma)^{-1}$ pour $f \gg f_0$. En insérant cette relation dans l'**Equation 2.7** on arrive à l'expression de la sensibilité (Equation 2.8).

$$\rho = \sqrt{\frac{\pi^2 \gamma}{K_B T} S_{vv}} \quad (2.8)$$

S_{vv} représente le plateau de l'ajustement Lorentzien.

Cette méthode d'étalonnage de la sensibilité a été prouvée être en accord à environ 20% avec la sensibilité mesurée par des moyens plus directs (Huang, Wang, Mehta, & Chiou, 2001) (Svoboda & Block, 1994). Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter la connaissance précise des déplacements de la particule (en unité de longueur) pour étalonner le piège optique. Cependant, le calibrage obtenu par cette technique est valable pour de petits déplacements, pour lesquels une approximation linéaire du signal de position est valide. En outre, la bande passante du système de détection doit être suffisante pour enregistrer avec précision le spectre de puissance complet sans distorsion, en particulier dans le régime à haute fréquence. Cependant, les étalonnages précis exigent une connaissance précise de γ qui peut être assez élevé près des surfaces en raison de la loi de Faxen (Svoboda & Block, 1994), illustrée par l'expression suivante:

$$\gamma = \frac{6\pi\eta r}{1 - \frac{9}{16}\left(\frac{r}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{256}\left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{r}{h}\right)^5} \quad (2.9)$$

r est le rayon de la particule piégée, h la distance depuis la surface de la chambre jusqu'au centre de la particule piégée et η la viscosité du milieu de piégeage (en Pascal.seconde). Par conséquent, les étalonnages spectraux de puissance près des surfaces doivent prendre en compte cette correction.

2.5.2 Technique d'étalonnage de la rigidité du piège

Il existe différentes méthodes de détermination des forces de piégeage, en passant par l'étalonnage de la rigidité du piège (**Equation 2.5**).

Une méthode d'étalonnage de la rigidité du piège est basée sur l'étude du mouvement brownien de la particule maintenue dans le piège. Dans ce cas, deux méthodes seront présentées: la

méthode d'équipartition et la méthode de la densité spectrale de puissance. Une autre méthode d'étalonnage, basée sur les forces de viscosité générées dans le milieu, sera également discutée.

a) Méthode d'équipartition

Par le théorème d'équipartition, un objet dans un potentiel harmonique avec une rigidité κ peut être décrit par l'équation suivante (Simmons, Finer, Chu, & Spudich, 1996):

$$\frac{1}{2} K_B T = \frac{1}{2} \kappa \langle x^2 \rangle \quad (2.10)$$

Le paramètre K_B est la constante de Boltzmann, T la température absolue et x les déplacements de la particule par rapport à la position d'équilibre du piège. Le calcul de la variance en position $\langle x^2 \rangle$ permet d'estimer la rigidité du piège κ , bien que l'on ait besoin d'un détecteur de position qui soit calibré:

$$\kappa = \frac{K_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (2.11)$$

Le principal avantage de la méthode d'équipartition est qu'elle ne dépend pas explicitement de la traînée visqueuse sur la particule piégée. Ainsi, pour mesurer la rigidité du piège, la forme de la particule, sa hauteur au-dessus de la surface de la chambre ainsi que la viscosité du milieu peuvent ne pas être connues. Toutefois, pour être précise, la méthode d'équipartition nécessite une bande passante adéquate. Une bande passante limitée conduit à une faible variance $\langle x^2 \rangle$, en raison du lissage. Cette méthode nécessite également un étalonnage précis de la position; si l'étalonnage de la position est incorrecte, alors $\langle x^2 \rangle$ sera aussi incorrecte et en conséquence, l'estimation de κ sera incorrecte.

Une méthode alternative pour calibrer la raideur du piège consiste à mesurer le spectre des fréquences du mouvement brownien de la particule dans le piège.

b) Méthode de la densité spectrale de puissance

Le spectre de puissance d'une particule dans un mouvement brownien est donné par l'**Equation 2.6** qui est décrite par un ajustement de forme Lorentzienne (**Figure 2.8**). La rigidité κ du piège peut être calculée si le coefficient de traînée γ sur la particule est connu (**voir Equation 2.9**).

Elle est alors donnée par:

$$\kappa = 2\pi\gamma \cdot f_c \quad (2.12)$$

Fait intéressant, la détermination de f_c ne repose pas sur un étalonnage précis de la position ou de la sensibilité (en unité de Volt/nm). Le spectre de puissance du signal de tension a la même forme que celle des positions mises à l'échelle du nanomètre, si le signal de tension est linéaire dans les déplacements de la particule. Par conséquent, f_c peut déterminer avec précision la rigidité κ du piège dans la gamme linéaire du détecteur sans la nécessité d'une calibration spatiale.

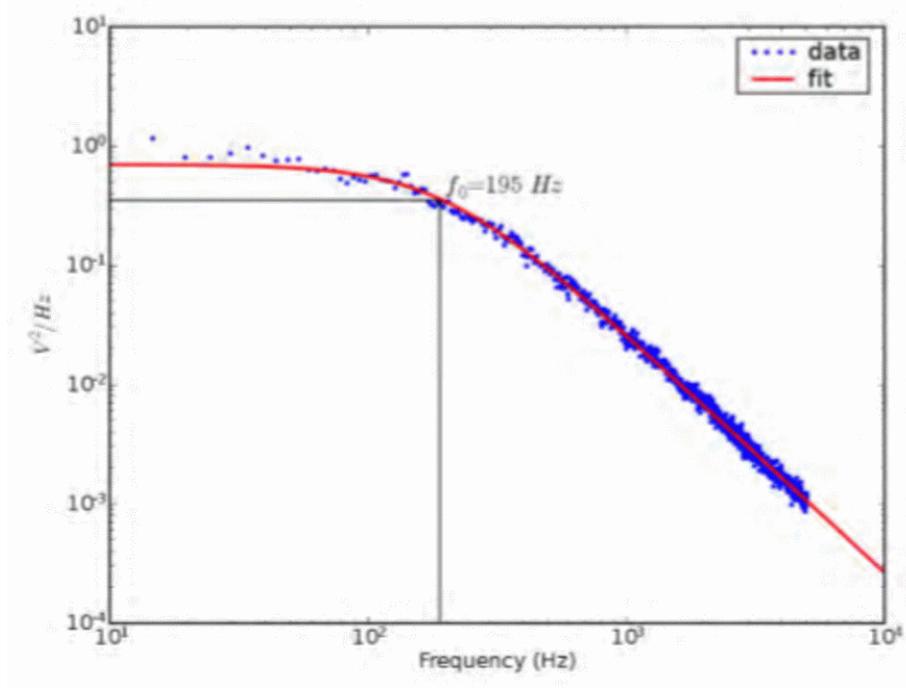


Figure 2.8 - Exemple du spectre de puissance mesuré (points) d'une bille de silice de 1 μm de diamètre, ajusté par une Lorentzienne (trait continu). Le signal de tension a été acquis à 20 KHz, avec une fréquence de coupure de 195 Hz.

La détermination de la rigidité du piège optique par le procédé du spectre de puissance nécessite un système de détection avec une bande passante suffisante pour enregistrer fidèlement le spectre au-delà de la fréquence de coupure (typiquement plus élevée de plus d'un ordre de grandeur). En plus de la détermination de la rigidité, le spectre de puissance d'une particule piégée peut être utilisé pour diagnostiquer des problèmes dans des expériences de piégeage optique. Par exemple, les écarts avec la forme Lorentzienne idéale, qui sont faciles à enregistrer, peuvent être utilisés comme indicateur d'un piège ou d'un système de détection de position qui n'est pas vertical (i.e. non aligné). Les sources extérieures de bruit de l'appareil peuvent également générer des pics supplémentaires dans le spectre de puissance.

c) Méthode de la force de traînée

La rigidité du piège peut également être étalonnée à partir de l'étude de la traînée visqueuse exercée par l'écoulement du fluide sur l'objet piégé (Huang, Wang, Mehta, & Chiou, 2001) (Svoboda & Block, 1994). Une méthode directe consiste à mesurer le déplacement, par rapport à la position d'équilibre, d'une particule piégée de taille connue, déplacement dû aux forces de viscosité du milieu. Ces forces peuvent être générées par un déplacement par rapport à la particule piégée, avec une vitesse constante connue, de la surface de la chambre qui maintient le liquide visqueux entourant la particule piégée. La vitesse d'écoulement peut alors être déterminée en faisant osciller cette surface avec une fréquence et une amplitude fixes (Neuman & Block, Optical trapping., 2004). Etant donné que la viscosité du liquide est connue, une force donnée peut être appliquée à la particule piégée si l'on mesure la vitesse du liquide. La force due à la traînée visqueuse est alors donnée par l'équation suivante, en appliquant la loi de Stokes:

$$F_d = \gamma \cdot v \quad (2.13)$$

γ est le coefficient de traînée visqueuse (voir l'équation 2.9) et V la vitesse constante à laquelle la surface est déplacée. En conséquence, l'équilibre des forces sur la particule déplacée (c'est-à-dire que la force de piégeage et la force de traînée sont en équilibre) se traduit comme suit:

$$K \cdot x = \gamma \cdot v \quad (2.14)$$

x est le déplacement de la particule par rapport à la position d'équilibre du piège. Dans cette expression, $K \cdot x$ représente la force de rappel qui attire et maintient la particule dans le piège.

Même si l'on a besoin d'un détecteur de position calibré, la rigidité du piège peut être déterminée en mesurant le déplacement de la particule piégée par rapport à la position d'équilibre du piège, en réponse aux forces visqueuses appliquées :

$$K = a \cdot \gamma \quad (2.15)$$

a est la pente de la courbe $v = f(x)$ (en seconde⁻¹). Dans ce procédé, la région linéaire de piégeage dans laquelle la rigidité est une constante doit être considérée; cette région peut être déterminée à partir du déplacement de la particule par rapport à la position d'équilibre du piège.

Étant donné que les forces résultent des effets hydrodynamiques sur l'objet piégé, un soin doit être pris lors du piégeage à proximité des surfaces, en raison de la contribution du coefficient de traînée dans cette zone.

CHAPITRE 3

Installation d'une pince optique modulaire

La méthode la plus courante et simple utilisée pour la construction d'un instrument de pince optique consiste à faire usage d'un microscope optique, qui intègre déjà les capacités d'imagerie nécessaires ainsi qu'un bon objectif et peut aussi être utilisé pour former un piège. La plupart des fabricants fournissent des instruments qui peuvent être connectés, de manière flexible, ou intégrés dans un microscope optique classique inversé (Nikon) (Hamamatsu). Dans ce cas, un faisceau laser peut être introduit dans le trajet optique, avant l'objectif; le microscope fournit alors les fonctions de focalisation par l'intermédiaire de l'objectif, la projection des images formées (étudiées) et la manipulation des éléments piégés. Néanmoins, des installations de pince optique sont maintenant disponibles sur le marché et ne coûtent que quelques centaines de dollars (Bechhoefer & Wilson, 2002) (Matthews, 2009) (Piggee, 2008).

La construction d'une installation de base d'une pince optique est le plus souvent assez simple (Block, 1990) (Block, 1998). En principe, seuls quelques composants optiques sont nécessaires: une source laser pour le piégeage, des éléments optiques pour façonner la forme du faisceau, des miroirs pour assister la direction du faisceau et un objectif dont l'ouverture numérique est assez grande pour fournir un piège stable. Cette configuration de base est limitée à la simple manipulation d'objets et ne peut donc servir qu'au piégeage des objets. Toutefois, ce système peut être facilement modifié pour fournir des fonctionnalités supplémentaires afin de l'adapter à une large variété d'applications au fur et à mesure que les besoins de recherche évoluent. Par exemple, en incorporant un moteur piézoélectrique à la configuration de base, le système permet une manipulation avec précision du piège dans les axes x , y ou z . Un détecteur sensible à la variation en position, capable de détecter des variations jusqu'à une résolution nanométrique, permet la détermination des déplacements des objets piégés par rapport au centre du piège optique. Des pièges optiques multiples peuvent être également incorporés dans un système de pince optique, pour des applications plus complexes.

Dans ce chapitre, seront présentés dans les détails le kit modulaire de pince optique construit pour ce travail ainsi que les critères de conception et une description détaillée des étapes pour l'alignement de l'installation. Les premières expériences de piégeage effectuées avec la configuration seront présentées ce qui permettra de démontrer les capacités de

manipulation des pinces optiques sur des particules de taille microscopiques incluant les objets biologiques. Il en sera de même pour le piégeage multiple de particules en deux dimensions. Ce chapitre se terminera par la description des programmes Matlab et Labview développés pour l'acquisition et l'analyse des données de la dynamique de l'objet piégé en mouvement brownien (afin de mesurer la rigidité du piège et la sensibilité).

3.1 Construction et alignement d'une pince optique

3.1.1 Construction d'un dispositif de pince optique

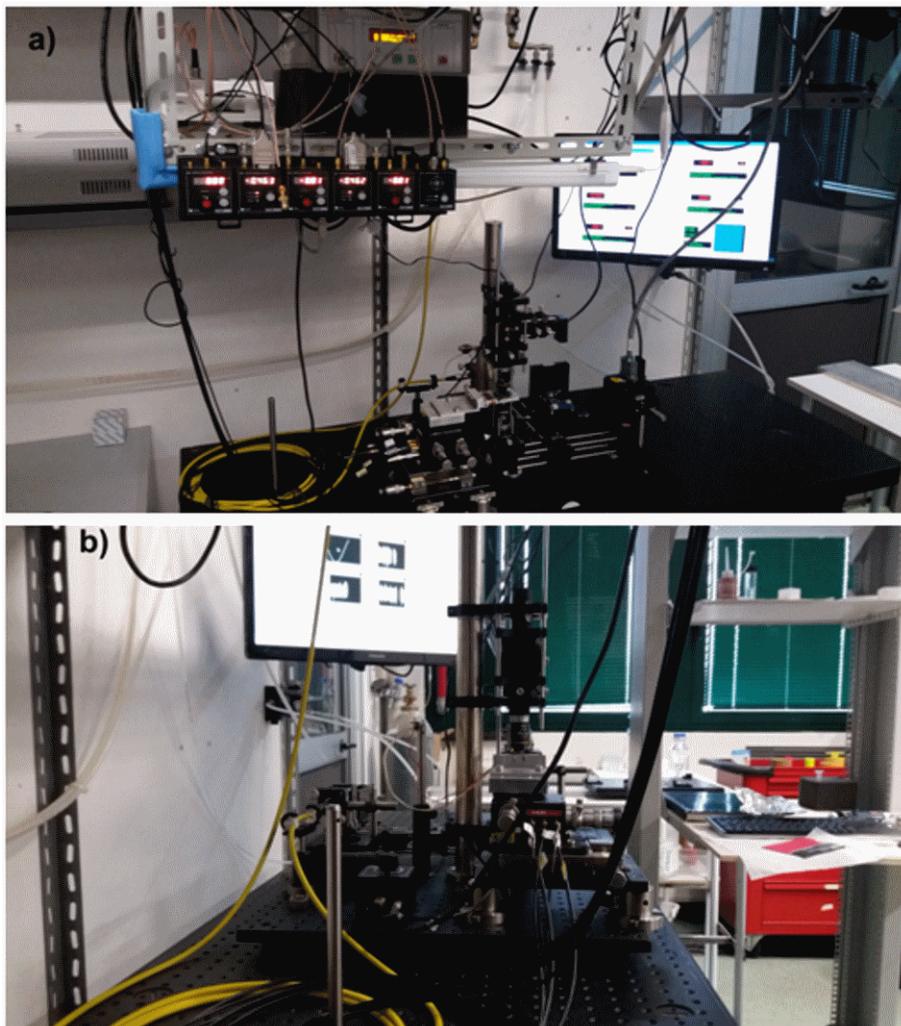


Figure 3.1 - Configuration de la pince optique construite - (a) Vue de face ; (b) : Vue latérale.

Le dispositif expérimental utilisé durant ce travail effectué au laboratoire de manipulation optique au CNR-IOM (Italie) a été obtenu en apportant quelques modifications au kit modulaire de pince optique de Thorlabs (Thorlabs). Les photos présentées dans la **Figure 3.1** montrent une vue d'ensemble de la configuration de la pince optique, construite sur la base d'un microscope classique inversé "fait maison". Elle offre une plus grande flexibilité de

l'installation lors du positionnement de divers composants optiques montés sur une table optique. Les buts principaux de cette configuration sont la capacité de fournir une image des organismes biologiques en étude et de procéder à des mesures quantitatives de la position et des forces sur les objets biologiques, en fonction de la lumière laser diffusée.

Pour la construction d'une installation de pince optique, certaines propriétés de ses composants doivent être prises en compte, afin d'améliorer la performance de l'installation. Pour ce qui est du laser de piégeage, l'exigence fondamentale est qu'il fournisse un faisceau gaussien monomode avec une bonne stabilité dans sa direction de propagation afin d'éviter des déplacements parasites de la position du piège dans le plan de l'échantillon. De ce fait, il va converger pour produire le plus petit diamètre du faisceau possible et produire ainsi le piège harmonique le plus efficace. Une faible fluctuation de la puissance du laser est tout aussi indispensable, afin de réduire au minimum les variations de la rigidité du piège. Comme indiqué auparavant, la longueur d'onde du laser est également un paramètre important à considérer lorsque les objets biologiques sont concernés.

Un deuxième aspect important de l'installation du piège optique est l'objectif utilisé pour focaliser le laser et former un piège optique stable. Afin de générer un piège stable tridimensionnel, il est nécessaire de produire la plus grande pente d'intensité possible. En produisant un gradient d'intensité élevé, la force de gradient devient dominante par rapport à la force de diffusion. Comme indiqué, ceci est réalisé à l'aide d'un objectif avec une ouverture numérique élevée. **Figure 3.2** donne une esquisse de la variation de l'ouverture numérique en fonction de l'angle d'ouverture de l'objectif.

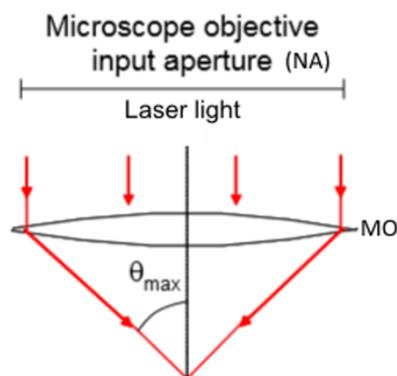


Figure 3.2 - Focalisation du laser par une lentille objectif MO.

Par conséquent, pour obtenir une grande ouverture numérique et donc un piège optique très stable dans les trois directions, le faisceau laser entrant dans l'objectif doit être suffisamment large pour remplir l'ouverture d'entrée de l'objectif. L'expression suivante permet

d'évaluer l'ouverture numérique NA en fonction de l'indice n du fluide d'immersion et de l'angle d'ouverture θ :

$$NA = n \cdot \sin(\theta) \quad (3.1)$$

La plus grande ouverture numérique est par conséquent réalisée lorsque le faisceau laser remplit complètement l'ouverture de l'entrée de l'objectif, ce qui correspond à un angle maximum d'ouverture θ_{max} . L'ouverture numérique maximale est donc déterminée par n , l'indice de réfraction du milieu immédiatement après l'objectif. Les objectifs à immersion d'huile (indice de réfraction jusqu'à 1,5) sont souvent utilisés dans les pinces optiques. Les objectifs à immersion d'eau peuvent également être employés.

Pour des mesures quantitatives de position et de force sur les objets dans le piégeage optique, un système de détection précis est nécessaire. Comme déjà mentionné dans le chapitre 2, plusieurs techniques ont été mises au point pour la détection précise d'une variation de position : la méthode de suivi vidéo, la méthode des photodiodes à quatre quadrants ou encore un procédé interférométrique (Neuman & Block, 2004) (Crocker & Grier, 1996) (Visscher, Gross, & Block, 1996) (Denk & Webb, 1990). Dans tous ces cas, le temps de réponse et la sensibilité dans la variation de position doivent être pris en considération au moment de choisir la méthode de détection à utiliser. Par exemple, la méthode basée sur le suivi vidéo est le schéma de détection de position le plus simple et peut être utilisé pour suivre un objet dans le piège optique avec une résolution plus petite comparée aux autres techniques. Cette méthode a un temps de réponse limité et n'est pas aussi pratique pour les systèmes nécessitant une réaction positionnelle rapide. Par contre, la photodiode à quatre quadrants, placée soit dans un plan image ou dans un plan focal arrière, peut être utilisée pour la détection de position sur deux ou trois dimensions, basée sur l'interférométrie. Les photodiodes à quatre quadrants, qui dans certains cas utilisent un faisceau laser séparé pour la détection, ont à la fois un temps de réponse plus rapide et une sensibilité en position plus grande.

C'est en tenant compte de ces considérations que l'appareillage de pince optique présenté dans la **Figure 2.6** a été construit. Pour les expériences portant sur des échantillons biologiques, un régulateur de température a également été ajouté (température physiologique des cellules en vie maintenue à 37°C) (Tavano, Bonin, Pinato, Stanta, & Cojoc, 2011). L'ensemble expérimental est monté sur un moteur Nanomax à trois axes de Thorlabs, permettant un contrôle jusqu'à 5 nm de résolution dans le déplacement de l'échantillon.

Afin de visualiser une image de l'échantillon, une source de lumière blanche LED est utilisée pour illuminer la chambre d'échantillon. Un second objectif (Nikon 10X NA 0.25 WD

7) permet de recueillir et de focaliser dans la chambre d'échantillon cette lumière. Le même objectif utilisé pour créer le piège est également utilisé pour visualiser les échantillons dans le piège. L'image de l'échantillon peut donc être projetée sur une caméra CMOS (Thorlabs, CDC 1240C) par l'usage de cet objectif et une lentille (AC254-200-A) de distance focale de 20 cm. Les miroirs dichroïques, positionnés à un angle d'environ 45° par rapport à la trajectoire du faisceau laser, ainsi que les miroirs simples reflètent la lumière infrarouge et laissent passer la lumière visible. La **Figure 3.3** ci-avant montre une esquisse des composants sur les trajectoires optiques du dispositif.

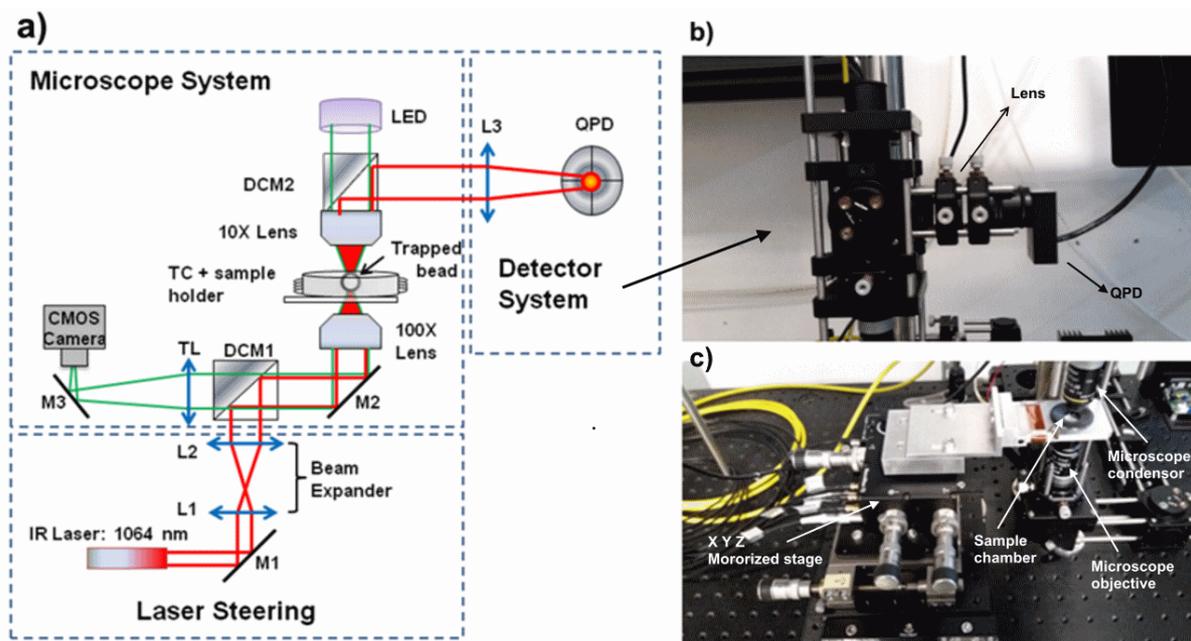


Figure 3.3 - Mise en évidence des composants de la pince optique. (a) : Composants dans les chemins optiques; (b) Système de détection de la position ; (c) Système de piègeage et de manipulation.

Le système de piège optique est contrôlé par un ensemble d'appareils électroniques modulaires constitué d'un ordinateur, du contrôleur de la caméra CCD, de contrôleurs des cubes du piézoélectrique dans les trois directions et d'un contrôleur du photo-détecteur à quatre quadrants (**Figure 3.4a**). Une carte d'acquisition numérique (DAQ - NI USB 2561) a été utilisée principalement pour acquérir les signaux de sortie du photo-détecteur et pour générer les commandes d'entraînement des cubes piézoélectriques (**Figure 3.4b**), par l'intermédiaire d'un programme LabView. Une vidéo numérique de l'échantillon étudié peut être visualisée en temps réel à partir de la caméra CCD.

Le **tableau 3.1** résume les informations sur les différents composants individuels de la configuration de pince optique construite. Le programme LabView nécessaire au

fonctionnement de ces composants sera discuté dans les deux derniers paragraphes de ce chapitre et présenté en annexe.

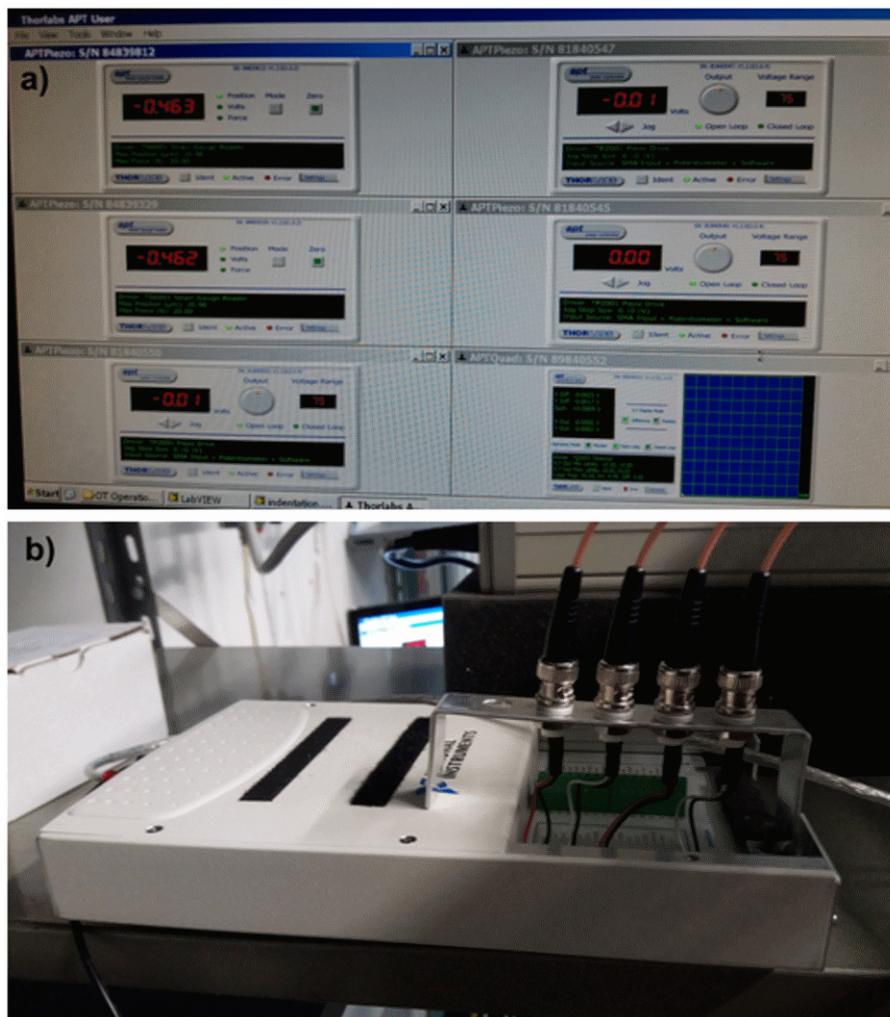


Figure 3.4 - Vue des systèmes de détection, piézoélectrique et de position. (a) Interface de l'ordinateur avec des déplacements relatifs mesurés grâce à un photo-détecteur à quatre quadrants et également avec des piézoélectriques; (b) Carte d'acquisition de données pour l'échantillonnage et la mesure des trois voies du détecteur (signaux x, y, et z), d'une part, et pour envoyer un signal au moteur piézoélectrique, d'autre part.

3.1.2 Alignement optique d'un dispositif de pince optique

Pour l'alignement optique de la configuration, la procédure recommandée par le fabricant ThorLab (OBTK / M mode d'emploi) a été adaptée. À une longueur d'onde $\lambda = 1,064$ nm, le faisceau laser se trouve dans le régime du proche infrarouge; il est donc invisible. Pour détecter la position du faisceau laser en différents endroits et vérifier la collimation, une plaque d'alignement (modèle CPA1) avec un trou central de 1 mm de diamètre a été utilisée. Le faisceau est ensuite centré sur le premier miroir (M1). En raison de contraintes spatiales, un changement d'angle de 90° dans le trajet optique a été parfois nécessaire, en utilisant des miroirs. La plaque

d'alignement est remontée dans le chemin optique du faisceau réfléchi par le premier miroir M1 (**Figure 3.3**) et les dispositifs de réglage sur le miroir sont utilisés pour centrer le faisceau sur l'axe optique. L'ensemble formant l'écarteur du faisceau est ensuite inséré dans le chemin optique. A ce stade, le premier miroir dichroïque (DCM1) n'est pas installé.

Tableau 3.1 - Liste des composants avec leurs caractéristiques.

COMPOSANTS	DETAILS
YLM-5	Laser à fibre Yb, d'IPG Photoniques GmbH, 1.064 nm, 5W max
IR Mirror revêtu	Mirror Dichroïque
Amplificateur de faisceau	Doublet de lentille; agrandissement d'un faisceau laser par un facteur de deux
OTKOBJ	Objectif, Nikon 100X 1.25 NA WD 0.3
OTKCON	Lentille, Nikon 10X 0.25 NA WD 7
MAX311D/M	Moteur Piézoélectrique à 3 axes fonctionnant avec des lecteurs de rétroactions et des lecteurs manuels différentiels
LNR50DD/M	Moteur avec une large zone de déplacement, gamme 50 mm
TPZ001	T-Cube pilote piézoélectrique, 1 kHz, 3 gammes de tension
TCH002	Contrôleur hub des T-cubes
LEDD1B	T-Cube Driver de la LED, 1200mA Courant max délivré
LED	Source de lumière blanche,
QPD	PDQ80, Module de détection de position, $\pm 2V$; 150 kHz
TSG001	T-Cube lecteur de la jauge de contrainte, 0-10V
TQD001	T-Cube PSD pour alignement automatique
LB 1027-B	lentille sphérique convexe, $f = 40$ mm
NE06B	ND filtre, IR revêtu
DCC1240C	CMOS caméra, résolution 5.3 μ m/pixel
AC254-200-A	lentille achromatique, $f = 20$ cm
NIDAQ card	USB-2561

En réglant la distance entre les deux lentilles L1 et L2, la collimation du faisceau laser est vérifiée à nouveau. L1 et L2 sont placées l'une de l'autre à une distance égale à la somme de leurs distances focales. Après avoir réinséré DCM1 dans le trajet du faisceau laser, la plaque d'alignement permet de vérifier que le faisceau restait central après sa réflexion. L'alignement du segment vertical du système microscopique est, elle, vérifié à l'aide de deux iris ; le premier est situé à l'arrière de la lentille objectif 100X et le second est disposé à l'arrière de la lentille objectif 10X.

Lorsque le faisceau laser arrive sur M2, il est réfléchi verticalement vers le haut jusqu'à l'ouverture arrière de l'objectif 100X. Pour vérifier l'alignement du laser dans ce segment, nous avons d'abord enlevé les deux lentilles (100X, 10X). Le premier iris est ensuite fermé (i.e. ouverture correspondant à sa plus petite taille) et les dispositifs de réglage sur M1 et DCM1 sont utilisés pour optimiser le faisceau émis et pour le centrer. La plaque placée au premier iris permet de contrôler l'alignement du faisceau. Par la suite, le second diaphragme est fermé et le premier diaphragme ouvert; les dispositifs de réglage sur M2 sont alors utilisés pour optimiser le débit du faisceau le traversant et pour centrer ce dernier. Nous avons ensuite vérifié si la lumière continue de passer à travers les deux diaphragmes lorsque que les deux iris sont presque entièrement fermés.

La même procédure est répétée en ce qui concerne l'alignement de la source lumineuse avec l'axe optique. Nous avons d'abord enlevé le second miroir dichroïque (DCM2) et remplacé la source lumineuse d'éclairage par un iris. Ce dernier étant fermé, les ajusteurs sur les miroirs permettent alors de centrer le faisceau lumineux.

Pour vérifier l'alignement du faisceau laser dans le segment vertical, il est utile de revenir sur le chemin optique dans le sens inverse, c'est-à-dire à partir de la position de la lumière d'éclairage. Pour ce faire, la caméra CCD et la lentille sont insérées dans le trajet optique. En plaçant un miroir à divers endroits, c'est-à-dire successivement aux positions des objectifs et de la lumière d'éclairage, nous avons vérifié à chaque fois si le laser réfléchi reste centré sur la caméra, en combinaison avec différentes position de la plaque sur le trajet du laser réfléchi.

Pour positionner les objectifs 100X et 10X à une distance correspondant à environ la somme de leurs distances focales, une lame de verre d'une épaisseur de 170 μm a été utilisée comme plan d'échantillon et le faisceau laser focalisé en sa surface à travers l'objectif 100X. La focalisation du faisceau laser au niveau du plan de l'échantillon a été obtenue en ajustant la position de l'amplificateur du faisceau. En utilisant la caméra, il est possible de visualiser (sur

un écran vidéo) le point brillant correspondant au laser focalisé sur le plan de l'échantillon. Ensuite, par un déplacement du second objectif (10X), la lumière d'éclairage est également concentrée sur la lame de verre (ce qui correspond à la position où la surface supérieure de la lame de verre est au foyer) ; ceci permet de ramener les deux foyers du microscope à la même position axiale.

Pour vérifier l'alignement du faisceau laser réfléchi, la plaque d'alignement est placée à la sortie du deuxième miroir dichroïque (DCM2), l'iris placé à la sortie de DCM2 étant fermé. L'alignement du faisceau laser sur le centre de la plaque est vérifié en utilisant les ajusteurs sur DCM2. Une lentille est ensuite insérée afin de projeter sur le QPD l'image du plan focal arrière du second objectif. Les dispositifs de réglage sur la cage de translation portant la lentille permettent de centrer le faisceau laser sur la plaque placée après cette lentille. Le QPD est ensuite placé à une distance égale à la distance focale de cette dernière. Lors de cette dernière étape, les ajusteurs sur le QPD sont également utilisés pour optimiser l'alignement du laser au centre du capteur du QPD.

Des précautions appropriées au sujet du laser IR sont prises pour éviter des lésions oculaires. Afin de minimiser tout risque d'exposition au laser, en plus de l'utilisation de lunette de protection, la puissance minimale nécessaire pour avoir une image du faisceau a été utilisée pendant la procédure d'alignement. Pour s'en assurer au niveau du capteur optique, la puissance du laser a été mesurée à divers endroits du trajet du faisceau avec un appareil portatif de mesure de puissance laser (S302C [Thorlab]). La gamme de puissance accessible va de 100 μ W à 2 W.

3.2 Premières expériences de piégeage

Comme indiqué précédemment, un laser infrarouge est capable de piéger et de manipuler des particules microscopiques. La pince optique construite a été utilisée pour piéger et manipuler des particules microscopiques sphériques. L'expérience la plus simple de piégeage qui peut être effectuée par une pince optique est faite en considérant une seule particule. Afin de réaliser le piégeage et la manipulation des particules en suspension dans un milieu aqueux, une rampe de puissance a été appliquée jusqu'à ce que la particule soit attirée au centre du piège optique. La position du foyer optique (par conséquent, celle de la particule piégée) peut ensuite être grossièrement déplacée sur les axes x, y et z en changeant la position du centre du piège optique ou en déplaçant la chambre contenant la particule piégée grâce au piézoélectrique.

Des billes microscopiques de silice ont été utilisées comme particules test pour la mise en place du piège initial. La figure 3.4 montre l'image d'une bille de silice de 1,5 μ m

de diamètre piégée dans de l'eau, à une hauteur d'environ 6 μm par rapport à la surface de la chambre d'échantillon. La configuration de la pince optique utilisée est celle qui est représentée dans la figure 3.1.

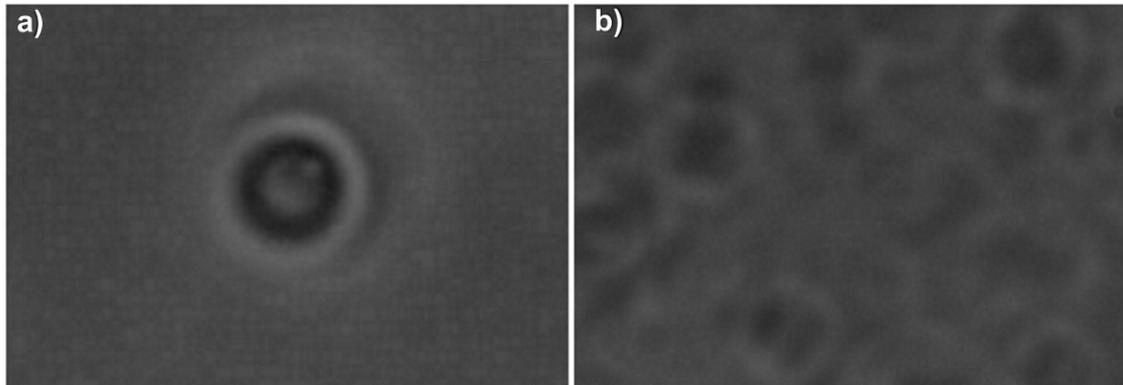


Figure 3.5 - Images séquentielles de billes de silice vues à partir d'une caméra CCD. (a) Bille de silice de diamètre 1.5 μm piégée. (b) La lame microscopique a été déplacée dans la direction axiale et les billes de silice reposant sur la surface de la lame en verre peuvent être vues dans l'arrière-plan et ne sont pas focalisées. La bille piégée s'est échappée du centre du piège. L'enregistrement vidéo de l'évènement a été effectué à une fréquence de 10 images / seconde et les images (a) et (b) sont séparées par 300 images.

En déplaçant la lame de verre dans la direction axiale, tel que représenté sur la fig. 3.5 (b), le piège optique est déplacé dans la direction verticale et la bille s'échappe du centre du piège. Dans cette démarche, il est important que le mouvement soit fait en douceur et lentement, afin de maintenir la particule dans le centre du piège car le piégeage est plus faible dans la direction de propagation du faisceau laser (Neuman & Block, 2004).

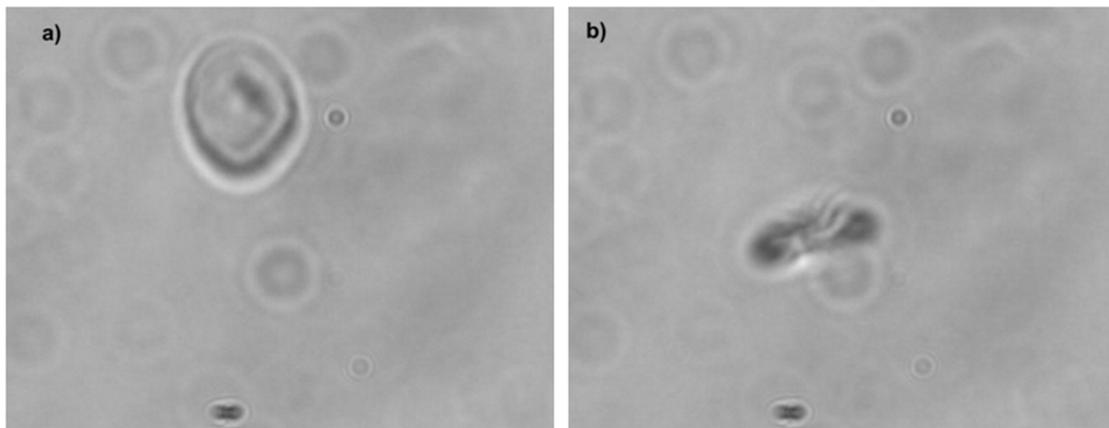


Figure 3.6 - Images d'une cellule de globule rouge. (a) Cellule flottante loin du piège optique; (b) Cellule piégée, à environ 10 μm au-dessus de la surface de la chambre d'étude. Images obtenues à partir d'expériences de piégeage de cellules de globule rouge effectuées avec Dr. Alireza Moradi, chercheur Associé à ICTP.

En utilisant la pince optique décrite ci-dessus, des cellules individuelles de globule rouge (red blood cell, RBC) en une solution physiologique ont également été piégées au centre du piège. La Figure 3.6 représente des images d'une RBC unique.

L'organisme reprend un mouvement de nage, apparemment pas affecté par le laser de piégeage qui est focalisée à une profondeur d'environ 10 μm dans la chambre d'échantillon (fig. 3.6 a), sous une puissance appliquée de 500mW (environ 26,4 mW au niveau du plan de la cellule). Cependant cette même puissance du laser est suffisante pour piéger une RBC flottante à la même profondeur lorsque l'organisme se rapproche du foyer du laser, comme on peut le voir sur la fig. 3.6 b.

3.3 Autres exemples d'expériences de piégeage

La pince optique peut être configurée pour piéger plusieurs objets simultanément, en balayant le faisceau de piégeage à travers l'échantillon (Visscher, Gross, & Block, Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing, 1996) (Cizmar, Davila Romero, Dholakia, & Andrews, 2010). Dans la pratique, un tel balayage dans un piège optique à trois dimensions peut être créé par un balayage rapide d'un seul faisceau entre deux ou plusieurs positions de piège à un rythme plus rapide que le temps de relaxation brownien de l'objet piégé (Visscher, Brakenhoff, & Krol, 1993) (Kaputa, Kuzmin, Kachynski, Cartwright, & Prasad, 2005) ou en scindant le faisceau incident afin de produire plusieurs trajets de faisceaux (Cojoc, et al., 2004) (Woerdemann, Holtmann, & Denz, 2009).

De multiples pièges à partir d'une seule source laser peuvent être générés par des miroirs galvanométriques à balayage, des déflecteurs acousto-optique (AOD) ou des déflecteurs électro-optiques (EOD). Grâce à un système de boucle de rétroaction, les miroirs galvanométriques fournissent un positionnement précis et reproductible permettant un mouvement rapide latéral de la position du piège (1-2 kHz) (Neuman & Block, 2004). Les AOD et EOD, de leur côté, offrent des vitesses de balayage plus élevés (Visscher, Gross, & Block, 1996) (Valentine, et al., 2008). Par conséquent, si le laser est balayé assez vite, une particule piégée ne peut pas détecter l'absence temporaire du piège optique lorsque les autres positions sont balayées.

Une approche alternative pour générer de multiples positions de pièges à partir d'un seul faisceau laser est fournie par les éléments optiques diffractifs (DOE), tels que des modulateurs spatiaux de lumière (SLM). La génération de pièges et de directions multiples dans ce cas repose sur le motif holographique qui entraîne le laser incident à disperser en des foyers séparés

dans la chambre d'échantillon. La **figure 3.7** est un exemple d'image d'un piégeage multiple de particules dans le plan d'un échantillon, au moyen d'un élément optique diffractif.

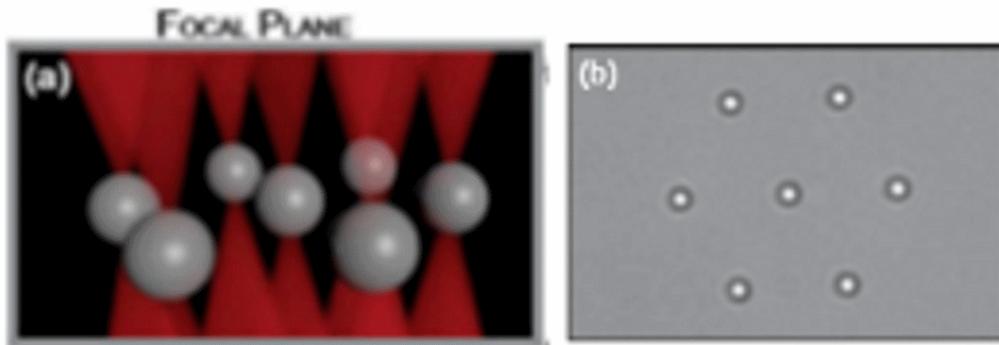


Figure 3.7 - Images d'un arrangement hexagonal de sept pièges optiques de billes de polystyrène. (a) Visualisation de la géométrie de piégeage dans le plan d'échantillon; (b) Image visualisée par une caméra, bille de diamètre = 1 μm [modifiée à partir de (Ott, Nader, Reihani, & Oddershede, 2014)].

3.4 Mesure de la rigidité du piège

Pour de petits mouvements d'une particule piégée près du centre d'un piège optique, la dynamique de la particule peut être approximée comme un ressort linéaire au centre de piégeage, comme indiqué dans le chapitre 2. La force de rappel peut alors être déterminée en utilisant la loi de Hooke. Par conséquent, les pièges optiques sont caractérisés par une rigidité fixe.

Plusieurs méthodes d'étalonnage ont été mises au point dans la détermination de la rigidité du piège (voir 2.5.2) à partir des déplacements de la particule du centre de piégeage. Lorsque la position de la particule est décalée par rapport au centre du piège, nous avons mesuré ces déplacements dans les directions axiales et latérales à l'aide de la photodiode à quatre quadrants. Dans le suivi des déplacements de la particule piégée, le code LabView qui a été développé permet d'acquérir en temps réel au cours des expériences les fluctuations des positions de la particule piégée par rapport à la position d'équilibre, en utilisant le système d'acquisition DAQ.

Les trois voies de tension analogiques de la photodiode à quatre quadrants sont ensuite échantillonnées et mesurées. Ces signaux correspondent aux fluctuations sur x , y et z de la position de la particule piégée par rapport au centre de piégeage. La fréquence d'échantillonnage a été fixée à un taux de 10 kHz, bien au-dessus de la fréquence de coupure du piège (Neuman & Block, 2004). Les instruments virtuels (VI) utilisés pour collecter les données du mouvement

brownien de la particule au cours des expériences sont présentés dans les pages annexes (Annexe A-1).

Les données brutes acquises pour les positions de la particule dans le piège sont ensuite traitées, hors ligne, à l'aide de codes mis au point pour calculer les trois composantes de la rigidité du piège. Un programme Labview a été développé pour mesurer cette rigidité en passant par la méthode d'équipartition (Annexe A-2).

En variante, la raideur du piège est déterminée par l'analyse spectrale de puissance du mouvement de la particule piégée. L'équation de la densité spectrale de puissance (**Equation 2.6, Chapitre 2**) et son ajustement par une lorentzienne permettant d'évaluer la rigidité sont mis en œuvre numériquement dans Matlab. Le code Matlab présenté dans les pages annexes (Annexe B) donne une procédure détaillée pour mesurer la rigidité du piège.

Contrairement à la méthode de la densité spectrale de puissance, la méthode d'équipartition nécessite un système de détection de position calibrée car les signaux analogiques de sortie mesurés avec le QPD ont la dimension d'une tension.

3.5 Contraste avec la mesure de la sensibilité

L'étalonnage de position est accompli en déplaçant une particule fixée à la surface de la chambre à échantillon à travers la zone de détection et en enregistrant la sortie du détecteur en fonction des positions (voir 2.5.1). Un code Labview personnalisé permet le suivi en temps réel du mouvement de la particule fixe par rapport aux déplacements calibrés du moteur piézoélectrique, en utilisant le DAQ. La particule est déplacée avec un balayage périodique dans la dimension d'étude tandis que le signal de position et le signal de sortie du détecteur sont enregistrés simultanément. Les instruments virtuels, utilisés pour générer le signal périodique qui déplace le moteur piézoélectrique (et par conséquent la particule) et pour mesurer simultanément la position calibrée de la particule à partir des signaux de sortie de la jauge piézoélectrique et du détecteur, sont présentés dans les annexes (Annexe A-3).

Afin de mesurer la sensibilité, les données brutes recueillies pour les positions de la particule sont traitées hors ligne, en utilisant LabView (Annexe A-4). Dans cette analyse, la sensibilité est extraite en considérant un domaine linéaire des déplacements avec de petites fluctuations. Cette région doit aussi coïncider avec une région dans laquelle la réponse du détecteur est linéaire.

CHAPITRE 4

Etude de l'élasticité de cellules cancéreuses par sondage axial avec une pince optique

La mesure des propriétés mécaniques des cellules est couramment utilisée pour quantifier les changements intervenant au niveau de la cellule résultant de son interaction avec l'environnement cellulaire, concernant les traitements médicamenteux, la migration cellulaire, la progression de maladie, y compris le cancer. Un certain nombre de techniques ont été développées dans le but d'étudier les propriétés mécaniques des cellules (Suresh, 2007) (Rodriguez, McGarry, & Sniadecki, 2013). Ces techniques, en général, partagent un objectif important: l'application et la mesure de forces sur des cellules individuelles, afin d'étudier les propriétés mécaniques de ces dernières.

La technique de la pince optique a été utilisée pour ce travail, dans le but d'étudier les propriétés viscoélastiques de cellules vivantes. Les mesures ont été réalisées avec une expérience d'indentation pour analyser les propriétés élastiques de cellules du cancer du sein provenant de trois lignes: MDA-MB-231, MCF-7 et HBL-100. Ces cellules sont le plus souvent choisies comme modèles expérimentaux de cellule dans les études portant sur le cancer du sein (Lacroix & Leclercq, 2004). La **figure 4.1** représente un cliché pris au microscope optique de ces trois cellules. MDA-MB-231 représente une cellule basale du cancer du sein à partir du site métastatique, alors que MCF-7 est une cellule luminale du cancer du sein. D'autre part, HBL-100 est une cellule humaine immortalisée, qui a été développée à partir du lait d'une femme de 27 ans de race blanche avec aucune preuve de lésions cancéreuses du sein (Caron de Fromentel, et al., 1985).

Par ailleurs, une pince optique permet d'exercer, en général, des forces dans la gamme 10^{-1} - 10^2 pN sur un objet piégé, avec une résistance du piège dans la gamme de 10^{-3} - 1 pN/nm. La nature viscoélastique, inhomogène et anisotrope des cellules vivantes les rendent sensibles aux forces appliquées et aux taux de charge (Chiou, Lin, Tang, Lin, & Yeh, 2013). Par conséquent, pour la caractérisation des propriétés viscoélastiques de ces cellules, il était important de procéder à des mesures d'indentation, obtenues avec la microscopie à force atomique (AFM) (Nawaz, et al., 2012) (Coceano, et al., 2016). En effet, l'AFM et l'OT fournissent des données complémentaires à la compréhension des propriétés mécaniques des cellules. L'AFM permet généralement d'appliquer des forces dans la gamme 10 - 10^4 pN, avec une résistance du cantilever supérieure à 10 pN/nm.

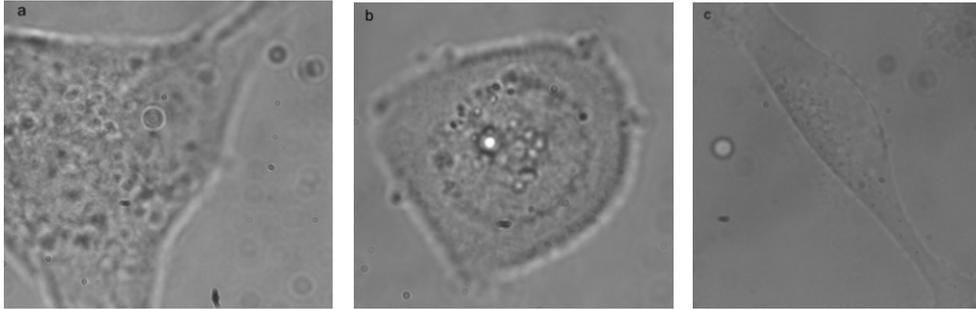


Figure 4.1 - Image microscopique, prises en cours d'expérience, des trois cellules individuelles: (a) HBL-100, (b) MCF-7 et (c) MDA-MB-231.

Dans ce chapitre, nous discuterons tout d'abord de la procédure utilisée dans une expérience d'indentation verticale et de la manière dont l'élasticité des cellules individuelles peut être extraite localement. Les modes opératoires expérimentaux pour l'indentation verticale en utilisant les techniques OT et AFM pour sonder localement l'élasticité des cellules seront ensuite présentés en détail. Le paragraphe suivant sera consacré au modèle mathématique et aux approximations de montages utilisés pour extraire le module d'élasticité des cellules. La présentation de la méthode de préparation des cellules ainsi que celle des résultats expérimentaux obtenus durant ce travail compléteront ce chapitre.

4.1 Indentation verticale de cellules vivantes et mesure de l'élasticité

Une indentation est une technique bien établie utilisée pour étudier les propriétés élastiques comme le module d'élasticité des échantillons biologiques (VanLandingham, 2003). Dans un procédé d'enfoncement, une sonde de taille microscopique ou nanométrique est déplacée pour indenter la cellule ; les interactions entre la cellule et la sonde sont contrôlées à partir des déplacements de cette dernière.

Les techniques qui sont impliquées dans les expériences d'indentation sont principalement basées sur la mesure des variations des forces d'interaction entre la cellule et la sonde. Dans la pratique, l'indentation verticale est réalisée par déplacement axial soit de la sonde (i.e. déplacer la position de focalisation du laser) et maintenir fixe la cellule à la surface de la chambre d'étude ou, au contraire, déplacer la cellule et maintenir fixe la position de la sonde dans le piège (Nawaz, et al., 2012) (Bodensiek, Li, Sánchez, Nawaz, & Schaap, 2013) (Dy, Kanaya, & Sugiura, 2013) (Li, Lee, Ong, & Lim, 2008). Le mouvement de la cellule peut être réalisé par des mouvements contrôlés d'un moteur piézoélectrique dans les directions x , y et z . Les propriétés mécaniques de la cellule peuvent être déterminées en enregistrant l'extension de

la force pendant le cycle d'indentation. La force appliquée n'est pas mesurée directement mais est généralement déterminée à partir de mesures indépendantes de la rigidité du piège et des déflexions de la sonde par rapport à la position d'équilibre. Pour de petits déplacements du pénétrateur (i.e. la sonde), les forces F exercées sur la cellule peuvent être décrites de manière approximative par la loi de Hooke (Neuman & Nagy, 2008):

$$F = \kappa \cdot x \quad (4.1)$$

Dans cette relation, κ est la rigidité du piège et x la déviation de la sonde. Cette approximation linéaire est valable dans une petite région de déflexion de la sonde par rapport à la position d'équilibre ($\pm 300nm$) (Neuman & Nagy, 2008) (Neuman & Block, 2004).

La détermination précise du déplacement et de la force exige l'étalonnage du détecteur de position, ainsi que la mesure de la rigidité du piège optique. Dans ce travail, le calibrage du détecteur de position est réalisé en déplaçant la sonde (fixée à la surface de l'échantillon) à travers une distance connue tout en enregistrant le signal de position généré.

Alors que plusieurs procédés de calibrage du détecteur de position ont été développés (Neuman & Block, 2004) (Visscher, Gross, & Block, 1996), le plus polyvalent, universel et sensible est l'interférométrie du plan focal arrière (BFP) (Gittes & Schmidt, 1998) (Rohrbach & Stelzer, 2002) (Allersma, Gittes, deCastro, Stewart, & Schmidt, 1998) (Pralle, Prummer, Florin, Stelzer, & Horber, 1999). Elle repose sur l'interférence entre la lumière diffusée par la sonde et la lumière non diffusée, afin de mesurer, en trois dimensions, la position de la sonde par rapport à la position d'équilibre. L'interférence est mesurée à l'aide d'une photodiode à quatre quadrants (QPD) ou d'un autre détecteur sensible à la position (PSD), placé dans un plan conjugué optique au BFP du condenseur. Dans ce cas, le BFP du condenseur est projeté sur le QPD ou PSD (Chapitre 2 section 2.4). Les détecteurs sont sensibles aux asymétries de l'intensité dans le motif d'interférence. La sonde, à la position d'équilibre, produit un motif d'interférence symétrique et une valeur nulle du signal de détection. Un déplacement latéral de la sonde entraîne un profil d'interférence asymétrique, qui génère un signal de détection proportionnel au déplacement de la sonde. Le déplacement axial de la sonde modifie également le motif d'interférence, donnant lieu à un changement dans l'intensité totale arrivant sur le détecteur. Une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre et des bandes passantes de 150 KHz ont été obtenues avec ce système (Rohrbach & Stelzer, 2002) (Peterman, van Dijk, Kapitein, & Schmidt, 2003).

Au cours de l'indentation verticale de la cellule, le module d'élasticité de cette dernière est étudié en mesurant, à la fois, la force exercée sur la surface cellulaire et la déformation de la membrane cellulaire. Lors de l'interaction avec la sonde, la membrane cellulaire se déforme en raison des forces appliquées par la sonde, ce qui provoque une tension de la membrane. Pour extraire le module d'élasticité de la cellule localement, la profondeur de pénétration (I_d), qui définit le degré de déformation de la membrane cellulaire lors de son interaction avec la sonde, doit être évaluée. Le paramètre I_d est mesuré à partir de la différence entre les déplacements de la cellule et de la bille, au cours de leur interaction. La courbe $F(I_d)$ résultant de la force par rapport à l'indentation est ensuite généralement adaptée à un modèle mathématique, afin d'en extraire l'élasticité de la cellule localement, selon la méthode expérimentale utilisée. L'un des modèles mathématiques d'ajustement les plus répandus est le modèle de Hertz (section 4.2). Ce modèle a été développé initialement pour décrire l'indentation de deux sphères élastiques et a depuis été modifié pour décrire l'indentation d'un demi-espace infini élastique par un petit objet rigide de géométrie définie.

Un autre paramètre qui peut influencer fortement la réponse mécanique de la cellule est la contrainte appliquée sur la membrane cellulaire lors de l'indentation (VanLandingham, 2003). Dans ce cas, il est important de prendre en compte les vitesses de déformation avec lesquelles l'élasticité de la cellule est sondée. Il a été démontré que, à de faibles forces (<100 pN), la sonde déformera principalement la périphérie de la cellule, tandis qu'à des forces plus élevées, la sonde pénètre plus profondément dans la cellule et son intérieur plus visqueux sera mesuré (Nawaz, et al., 2012). Dans ce dernier cas, les effets visqueux peuvent contribuer au module d'élasticité de la cellule. En indentant la cellule à des vitesses de chargement différentes, ses propriétés viscoélastiques peuvent être étudiées et les effets visqueux de l'intérieur de la cellule quantifiés.

4.1.1 Procédure expérimentale en utilisant la technique OT

Pour être en mesure d'examiner la réponse mécanique cellulaire à des forces de déformation faibles, nous avons développé une configuration OT qui fonctionne verticalement par rapport au support d'échantillons. Le dispositif OT a été adapté et utilisé pour l'indentation axiale de cellules et pour la mesure de force. La configuration complète a été décrite dans la section 2.3 du chapitre 2. Dans notre approche, une petite quantité d'une concentration diluée de billes de diamètre $3 \mu\text{m}$ a été introduite dans la chambre d'échantillons contenant les cellules à étudier. En déplaçant le support d'échantillon avec le moteur piézoélectrique, une bille flottant librement est portée et piégée à la position de focalisation du laser. Ensuite, une cellule d'intérêt

est sélectionnée et ramenée en dessous de la bille piégée (figure 4.2a gauche). Le substrat sur lequel la cellule est fixée est déplacé verticalement suivant une onde sinusoïdale tandis que le point focal est maintenu à une position fixe. Une indentation verticale de la cellule (figure 4.2a droite) peut être observée; lorsque celle-ci intercepte et interagit avec la bille, provoquant ainsi un déplacement vertical de la bille (figure 4.2b) produisant une force qui lui est proportionnelle. Les déplacements verticaux de la bille dans le piège sont acquis au moyen d'un QPD, au cours du cycle d'indentation et de rétraction. La Figure 4.2 est une illustration de la procédure d'indentation avec la technique OT.

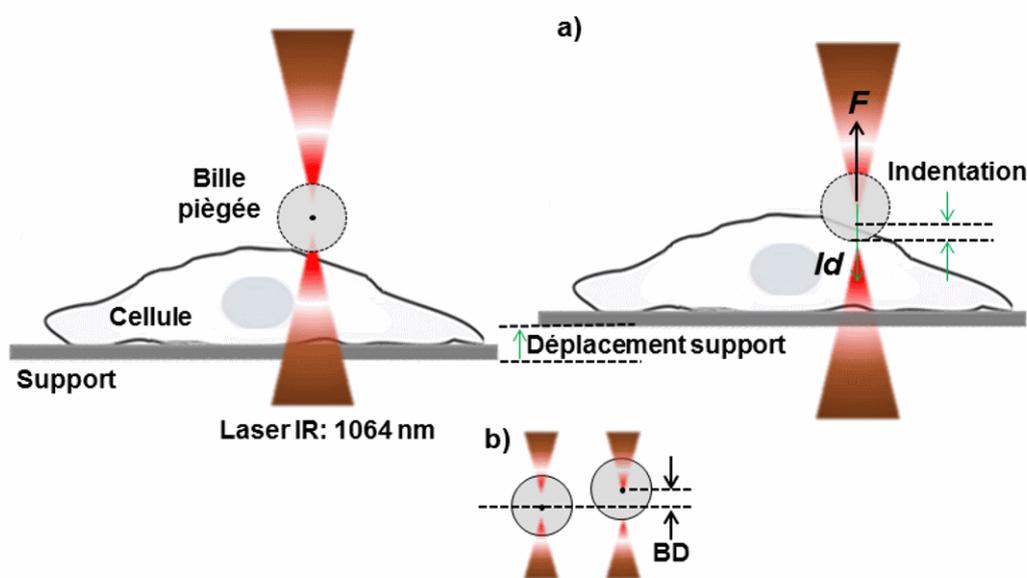


Figure 4.2: a) Approche expérimentale pour l'indentation verticale cellulaire avec la technique OT. A gauche: en utilisant un moteur piézoélectrique, la cellule est portée légèrement en dessous de la bille piégée. A droite: le support est déplacé dans la direction verticale ; la bille pénètre alors la membrane cellulaire, avec une profondeur d'indentation I_d ; F est la force de réaction appliquée par la cellule à la bille piégée lors de l'expérience. b) BD est le déplacement de la bille par rapport au centre du piège.

Récemment, l'élasticité cellulaire locale a également été étudiée, dans une expérience d'indentation verticale dans laquelle, au lieu de déplacer la cellule contre la sonde, la particule optiquement piégée est déplacée contre la cellule stationnaire (Dy, Kanaya, & Sugiura, 2013) (Bodensiek, Li, Sánchez, Nawaz, & Schaap, 2013). Dans ces deux articles, la position de la particule piégée est déplacée axialement par translation d'une lentille positionnée devant l'objectif microscopique pour faire varier la position du piège et en mesurant son déplacement lors de l'interaction avec la cellule.

La formation d'une membrane d'attache a également été identifiée comme étant une méthode utilisée dans les pinces optiques afin d'étudier les propriétés viscoélastiques de cellules individuelles (Dai & Sheetz, 1995) (Dai & Sheetz, 1999) (Li, et al., 2002) (Tavano, Bonin, Pinato, Stanta, & Cojoc, 2011). Dans ce cas, une particule sphérique de taille microscopique piégée est utilisée comme sonde et la courbe force-allongement est mesurée pendant la formation de la membrane d'attache. Dans une expérience classique d'attache, la particule est capturée dans le piège optique, puis mise en contact avec une cellule isolée qui est fixée à la surface du substrat. En tradant le support piézoélectrique à une vitesse constante pour déplacer l'échantillon loin de la position de la particule piégée, de longues membranes d'attache peuvent ensuite être formées. Les forces exercées par ces attaches de la membrane sur la particule peuvent être obtenues par le suivi de la position de la particule dans le piège. Des paramètres caractérisant la viscoélasticité de la cellule peuvent donc être évalués localement, en mesurant les quantités suivantes: la rigidité d'attache, la longueur de l'attache et la viscosité. Les propriétés viscoélastiques la cellule peuvent donc être mesurées à partir de l'ajustement de la courbe force-allongement (Tavano, Bonin, Pinato, Stanta, & Cojoc, 2011).

4.1.2 Procédure expérimentale en utilisant la technique AFM

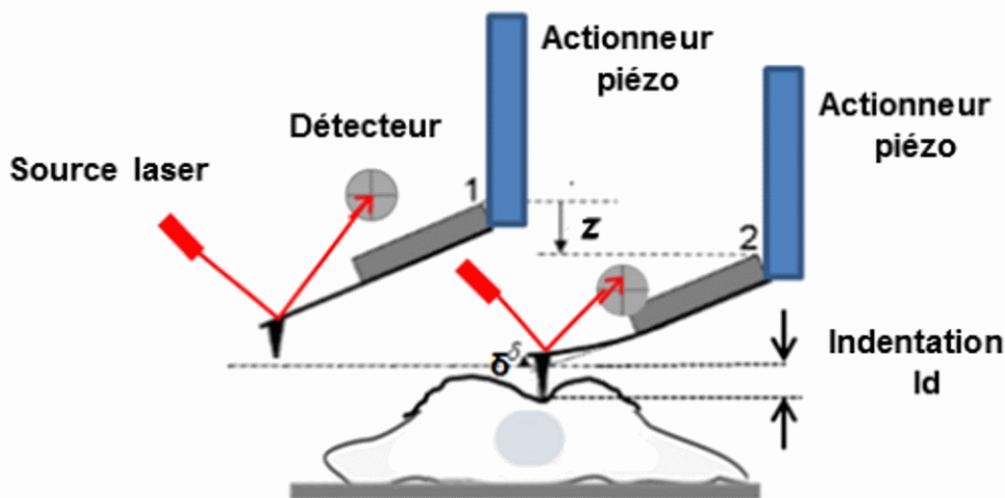


Figure 4.3 - Approche expérimentale pour l'indentation verticale de la cellule avec l'AFM. Le cantilever est déplacé vers la cellule avec une distance z (hauteur mesurée). Tandis que la cellule est en adhérence à la surface du substrat, le cantilever indente la surface de la cellule. La poutre se penche alors dans la direction opposée (δ), par conséquent, la cellule est indentée (I_d). La déviation (δ) est mesurée au moyen d'un faisceau laser réfléchi par le cantilever et est détectée par une photodiode.

La configuration de l'AFM utilisée est constituée d'un catalyseur Bioscope, travaillant à force maximale pour des mesures quantitatives cartographiques, fonctionnant en mode oscillant et contrôlé par un Nanoscope V (Bruker). Ce système permet d'évaluer et de quantifier les propriétés mécaniques de la cellule en cours d'étude, de façon automatique (Pittenger, Erina, & Su, 2010). Ce système intègre également un microscope optique inversé permettant de prendre simultanément l'image de la cellule. L'approche expérimentale utilisée pour étudier la réponse mécanique de la cellule, pour une indentation verticale avec la technique AFM, est proposée dans la figure 4.3.

Un moteur piézoélectrique est généralement utilisé pour contrôler la position axiale z de la sonde, qui consiste en un bras de levier flexible avec une pointe de forme fixée à son extrémité. En déplaçant verticalement le cantilever avec une fonction sinusoïdale pendant que la surface de la cellule est balayée, les déviations du levier en fonction de sa position z peuvent être surveillées. Lorsque le système de l'AFM est utilisé en mode oscillant, la pointe du cantilever tapote doucement la surface de la cellule. Lorsque la pointe du cantilever est doucement en contact avec la surface de la cellule, les forces d'interaction entre la pointe et la cellule occasionnent la déviation du cantilever, qui est suivie par un laser réfléchi sur le dos du cantilever vers une photodiode (QPD). La déviation du cantilever permet de mesurer les propriétés de la surface cellulaire telles que la force d'adhérence entre la surface cellulaire et la pointe ou les propriétés viscoélastiques de la cellule, lors d'un contact intermittent avec la surface. Au cours des expériences, alors que la cellule subit un balayage tramé, l'image de celle-ci peut également être enregistrée. Au cours de l'expérience, le microscope intégré permet de capturer directement des images de la cellule.

4.2 Modèle de Hertz

Pour extraire l'élasticité à partir d'une courbe force-distance d'une expérience d'indentation, les données sont adaptées à un modèle mathématique destiné à calculer le paramètre d'intérêt qui, dans ce travail, est le module d'élasticité de la cellule. Le modèle utilisé dans notre étude est le modèle de Hertz, qui est devenu le modèle d'ajustement le plus couramment utilisé dans les études portant sur la mécanique des cellules (Guz, Dokukin, Kalaparthy, & Sokolov, 2014) (Mierke, 2014) (Kirmizis & Logothetidis, 2010) (Dy, Kanaya, & Sugiura, 2013).

Dans sa forme élémentaire, le modèle de Hertz décrit le contact entre deux sphères solides, lisses et élastiques (Hertz, 1881) (Johnson, Kendall, & Roberts, 1971) et démontre que la taille et la forme de la zone de contact varient avec la déformation des corps en contact

(Johnson, Kendall, & Roberts, 1971) (Johnson, 1985) (Popov, 2010). Ce modèle a été conçu essentiellement pour être utilisé sur des matériaux ayant un comportement élastique (Mahaffy, Park, Gerde, Käs, & Shih, 2004). Néanmoins, des modifications de ce modèle ont été incorporées pour tenir compte de différentes géométries de l'élément d'indentation (Sneddon, 1965) (Bilodeau, 1992) (Rico, et al., 2005).

Étant essentiellement un modèle élastique conçu pour être utilisé sur les matériaux souples, ce modèle a été modifié pour incorporer les matériaux viscoélastiques (Engler, Richert, Wong, Picart, & Discher, 2004). Les approximations suivantes accompagnent l'utilisation du modèle Hertz afin d'étudier les propriétés des cellules viscoélastiques dans une expérience d'indentation:

- la cellule est supposée être un matériau élastique lorsque la profondeur d'indentation est faible (<10% de l'épaisseur totale de la cellule) ;
- le pénétrateur doit être non déformable, sans interaction supplémentaire avec la cellule (par exemple l'adhérence) ;
- pour un pénétrateur sphérique de rayon R, le rayon R doit être supérieur à la profondeur des indentations Id ($Id \ll 0.3 R$) ;
- la taille de la cellule doit être épaisse par rapport à la profondeur de pénétration ($h \gg Id$ h étant l'épaisseur de la cellule).

A noter que pour des cellules minces (cest-à-dire que la profondeur d'indentation est supérieure à l'épaisseur de la cellule), d'autres corrections du modèle de Hertz doivent être considérées (Dimitriadis, Horkay, Maresca, Kachar, & Chadwick, 2002).

Le modèle de Hertz utilisé dans l'étude des propriétés mécaniques des cellules afin d'extraire le module d'élasticité des cellules est traduit dans l'équation suivante:

$$F = E \times \frac{4R^{1/2}}{3(1-\nu^2)} \times Id^{3/2} \quad (4.2)$$

Dans cette équation, F est la force appliquée à la surface de la cellule par l'élément d'indentation, R le rayon de ce dernier, Id la profondeur de pénétration cellulaire, ν le coefficient de Poisson et E le module d'élasticité de la cellule (exprimé en Pascal). Le module d'élasticité de la cellule peut alors être évalué à partir des données mesurées de la force en fonction de la profondeur de l'indentation.

Pour extraire le module d'élasticité à partir des données de mesure adaptées au modèle de Hertz, nous avons défini deux intervalles d'ajustement afin d'obtenir des résultats optimaux et reproductibles. Tout d'abord, nous avons défini un domaine de forces fixe, avec une force

minimale correspondant à 10% de la valeur de la force d'indentation maximale mesurée et une force maximale fixée à 90% de la même force. Cette plage de la force est importante pour l'analyse, pour deux raisons: en prenant ce choix de forces limites, il est possible d'éviter les intervalles d'indentation où la force d'indentation fluctue autour d'une valeur constante. Ces intervalles coïncident essentiellement avec de très faibles indentations, mais aussi avec de hautes valeurs de profondeur d'indentation. Par conséquent, aux faibles valeurs d'indentation, le point de contact qui coïncide avec le point de début de l'interaction cellule-bille, n'a pas besoin d'être défini. La seconde plage d'approximation consiste à considérer une région fixe dans la profondeur indentation, définie pour être d'environ 200 nm, afin de répondre à l'exigence du comportement élastique de la cellule lors de l'interaction avec la bille ainsi qu'à mesurer le module d'élasticité sans endommager la membrane cellulaire. Une description complète des deux approximations est proposée dans les deux paragraphes suivants. Dans les deux cas, un code Matlab personnalisé a été développé pour analyser les données, en utilisant le modèle de Hertz.

4.2.1 Module d'élasticité dérivée dans le cas d'un intervalle de forces fixe

Dans l'approximation proposée ici pour extraire le module d'élasticité depuis la courbe force-indentation, les valeurs basse et haute de la force ($0.1 F_{\max}$ - $0.9 F_{\max}$, comme indiqué auparavant), coïncident avec les régions dans lesquelles les forces d'interaction entre la cellule et la bille fluctuent autour d'une valeur constante. Cette condition permet d'éliminer l'effet de saturation de la force que l'on peut observer au début de l'interaction cellule-bille et à la fin de cette interaction. Cela évite la nécessité de définir le point de contact lors de l'interaction cellule-bille, et exclut la dernière partie du mouvement du support (cellule). Dans ce cas, un modèle simple de détermination du module d'élasticité E , à partir de l'équation 4.2, consiste à rendre linéaire la dépendance de la force par rapport à la profondeur de pénétration Id . Nous avons procédé à une linéarisation de la force F en fonction de l'indentation Id et l'équation 4.2 peut être ré-exprimée comme suit:

$$F^{2/3} = E^{2/3} \times C \times Id \quad (4.3)$$

Le paramètre C est une constante qui contient tous les autres paramètres de l'équation 4.2. Pour trouver le module d'élasticité E , la fonction $F^{2/3}(Id)$ est adaptée à une fonction linéaire et la pente correspondante permet de mesurer précisément l'élasticité E . La figure 4.4 représente

un ajustement du modèle linéarisé de Hertz, avec des données expérimentales O.T., en respectant les limites de force de 0.1% et 0.9% de la force maximale.

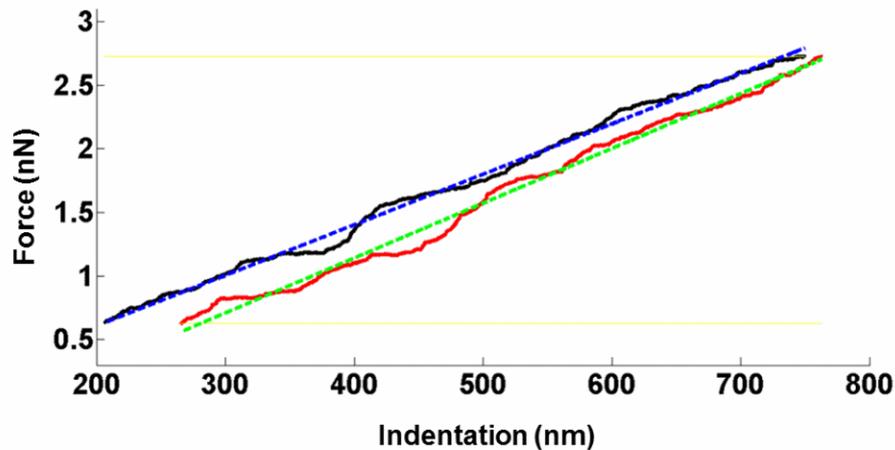


Figure 4.4 - Modèle de Hertz linéarisé: à des intervalles d'indentation (rouge) et de rétraction (noir). La courbe est déterminée en mesurant la force exercée sur la bille et en prenant $F^{2/3}$ dans la plage de forces choisie. Les lignes pointillées représentent l'intervalle linéaire d'ajustement pendant l'indentation (verte) et pendant la rétraction (bleue). Les lignes jaunes représentent les valeurs limites de la force, où la linéarisation du modèle Hertz a été choisie pour calculer le module d'élasticité E.

4.2.2 Module d'élasticité dérivée dans le cas d'un intervalle de profondeur d'indentation fixe

Pour calculer le module d'élasticité des cellules isolées à partir des mesures force-indentation, une seconde approximation du modèle de Hertz est proposée. Il a été démontré que, sous des stimuli mécaniques à faible force, le comportement d'une cellule est presque élastique; la réponse cellulaire est linéaire dans ce régime (Yousafzai, et al., 2016). Dans ce cas, une dépendance linéaire entre F , la force d'indentation appliquée à la surface de la cellule, et I_d , la profondeur de pénétration, peut être supposée. Par conséquent, en réarrangeant l'équation 4.2, le module d'élasticité locale de la cellule peut alors être exprimé comme suit:

$$E = \left[\frac{3(1-\nu^2)}{4\sqrt{R \times I_d}} \right] \times S \quad (4.4)$$

Dans cette expression, R est le rayon de l'élément d'indentation, I_d la profondeur de l'indentation, ν le coefficient de Poisson et S la pente de l'ajustement linéaire de la courbe force-indentation $F(I_d)$. La Figure 4.5 montre une courbe force-indentation lors de l'interaction cellule-bille, avec un intervalle fixe choisi pour mesurer le module d'élasticité E.

Dans l'équation 4.4, pour une taille connue de la sonde R , seules I_d et S doivent être déterminées afin d'évaluer le module d'élasticité E de la cellule. La profondeur d'indentation I_d est déterminée à partir des déplacements mesurés de la sonde et de la cellule, comme déjà expliqué dans la section 4.1. Par ailleurs, l'intervalle d'indentation choisi doit coïncider avec une région linéaire des déplacements de la bille et de la cellule; donc cette région doit être correctement définie. Cet intervalle est fixé selon les règles suivantes:

- pour les événements de l'indentation et de la rétraction, les intervalles sont choisis de sorte qu'ils correspondent également à des intervalles de déplacement linéaire de la bille et de la cellule, au cours de l'expérience. Pour cette raison, les intervalles pour les événements d'indentation (lorsque la cellule interagit avec la bille du piège) et de rétraction (lorsque la cellule se rétracte de la bille) sont fixés à 200 nm pour l'analyse ;
- le point de contact lors de l'interaction cellule-bille, qui définit l'instant initial au cours duquel la bille commence à indenter la cellule, correspond à t_1 sur la figure 4.5.

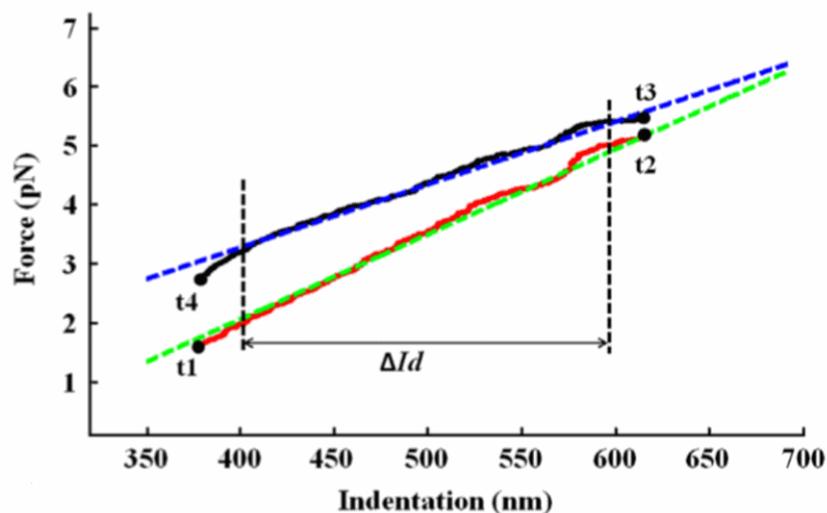


Figure 4.5 - Courbe de force par rapport à l'indentation. En rouge : quand une bille indente la cellule ; en noir : lorsque la cellule se rétracte. Les lignes pointillées, en vert et en bleu, représentent les ajustements linéaires de la force, respectivement pendant les intervalles d'indentation et de rétraction.

4.3 Préparation des échantillons de cellules

Les cellules MDA-MB-231 et MCF-7 (numéros ATCC HTB-26, HTB-22, respectivement) ont été cultivées dans l'adhérence en utilisant un faible taux de glucose du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) avec de la L-glutamine. La cellule HBL-100 quant à elle a été cultivée dans l'adhésion à l'aide du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 avec de la L-glutamine. Les deux milieux de culture seront finalement complétés par 10% (v / v) de sérum de veau fœtal (FCS), 50 U / ml de pénicilline-streptomycine et 1 mM

de gentamycine. Les cultures cellulaires ont été effectuées dans des flacons de 25 cm², à la température de 37 °C dans 5% de CO₂.

Quand la culture de cellules a atteint la confluence, tous les 2-3 jours, le fractionnement cellulaire a été réalisé en utilisant 1000 ml de milieu par 10 ml de solution 0,05% de trypsine-EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) dilué. Un jour avant l'expérience, les cellules sont détachées de la fiole et ensemencées sur un couvercle en verre de taille 30 mm (pour les expériences OT) et sur une boîte de pétri de polystyrène de dimensions 60 mm (pour les expériences de l'AFM), à une densité de 2×10^5 cellules pour les expériences avec OT et 5×10^5 pour les expériences avec AFM. Les cellules sont maintenues pendant une nuit dans des conditions physiologiques pour les laisser adhérer au substrat.

De plus, afin d'étudier l'influence de la rigidité du substrat sur le module d'élasticité, les cellules ont été ensemencées dans des boîtes de Pétri soit nues soit revêtues de collagène. Dans cette étude, les cellules HBL-100 ont choisies comme modèle ; le collagène de type I à une concentration de 60µg/ml dans de l'acide acétique 0,02 N a été utilisé pour le revêtement. Pour le revêtement de la boîte de Pétri avec un collagène de type I, 60µg/ml de collagène ont été dilués et répartis dans une boîte de Pétri stérile (30 mm de taille) pour couvrir la surface entière de la lamelle, pendant 2 heures, sous un laminaire. Le Pétri est ensuite séché à l'air et mis sous lumière UV jusqu'au lendemain.

Dans toutes les expériences, avant chaque session de mesure, les cellules ont été lavées trois fois avec du tampon phosphate salin (PBS) et ont été rincées avec le milieu.

4.4 Quantification et analyse de l'élasticité des cellules

Des expériences d'indentation verticales avec les techniques OT et AFM ont été réalisées pour mesurer et comparer les propriétés viscoélastiques des cellules du cancer du sein à partir des trois lignes MDA-MB-231, MCF-7 et HBL-100.

Le premier résultat de cette étude comparative (Coceano, et al., 2016) suggère que pour des mesures plus fiables et comparables entre les différentes cellules, la région près du noyau doit être examinée, car la différence mesurée entre les modules d'élasticité des cellules est plus élevée dans cette région.

Pour étudier la réponse cellulaire sur les changements de son environnement, la structure du milieu contenant les cellules a été modifiée. Les cellules ont été cultivées en adhérence sur deux substrats différents : un substrat nu (en verre) et un substrat revêtu de collagène. Cette étude permettra d'évaluer l'influence de l'environnement cellulaire sur son module d'élasticité.

En utilisant la cellule HBL-100 en tant que modèle, le module d'élasticité de ces cellules a été étudié par la technique d'indentation verticale OT, dans la région proche du noyau pour chaque type de substrat.

Dans ces études, seule la force verticale appliquée à la cellule lors de son interaction avec une sonde est considérée. En effet, les composantes latérales de la force sont la plupart du temps ignorées dans de nombreuses expériences d'indentation en biophysique. Pour cette raison, la contribution des forces latérales sur le module d'élasticité des cellules, est étudiée avec une indentation verticale O.T. Prenant en compte les forces latérales appliquées à la cellule lors de l'interaction cellule-sonde, les modules d'élasticité obtenus pour les cellules HBL-100 et MDA-MB-231 sont mesurés et comparés.

4.4.1 Etude des modules d'élasticité pour les trois cellules par AFM et OT

Cette partie présente l'étude des propriétés viscoélastiques des cellules en combinant AFM et OT, qui sont complémentaires. En utilisant les techniques d'indentation verticale avec AFM et OTM, nous avons mesuré localement et comparé les modules d'élasticité des trois cellules du cancer du sein HBL-100, MCF-7 et MDA-MB-231 (Coceano, et al., 2016).

a) Mesure des forces par AFM et OT

En AFM, les forces appliquées à la cellule peuvent être évaluées en faisant le suivi des déflexions du levier. Pendant l'expérience d'indentation, un moteur piézoélectrique permet de commander les déplacements du levier.

Une cellule d'intérêt, isolée est localisée et placée légèrement au-dessous du cantilever dans la région cellulaire d'intérêt. Lors d'un événement d'indentation verticale, le cantilever est déplacé à une fréquence de 0.25 - 0.5 kHz et une amplitude de balayage de 750 nm, tandis que la cellule à l'étude est balayée à une vitesse correspondant à 0.1 - 0.2 Hz et une taille de balayage d'environ 60 μm ; 128 \times 128 ou 256 \times 256 points images sont acquis.

Par le suivi des déplacements z du cantilever pendant l'expérience, plusieurs paramètres peuvent être mesurés automatiquement par le biais du logiciel d'analyse (NanoScope): la force d'indentation appliquée à la sonde (calculée sur la base de la loi de Hooke), la déformation de la membrane cellulaire, la dissipation d'énergie, etc... La **Figure 4.6** représente la variation de la force par rapport à la séparation pointe-cellule, mesurée au cours d'une expérience.

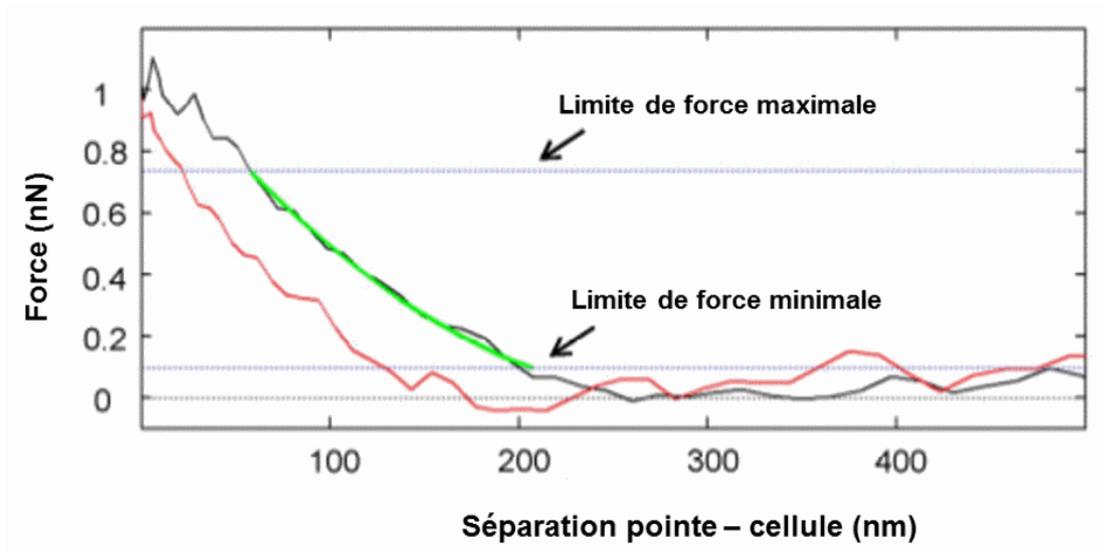


Figure 4.6 - Courbe force-séparation d'une expérience d'indentation sur une cellule MDA-MB-231, par AFM. Les courbes montrent l'événement indentation (noir) et l'événement rétraction (rouge). La courbe ajustée (vert) est utilisée pour calculer le module d'élasticité, en utilisant le modèle mathématique de Sneddon.

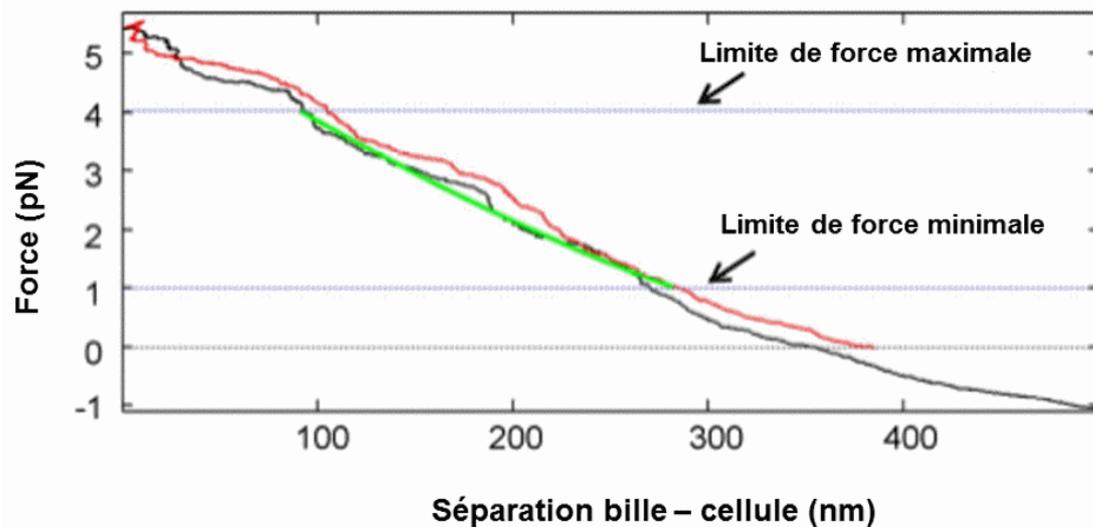


Figure 4.7 - Courbe de force-séparation d'une expérience d'indentation sur une cellule MDA-MB-231 en OT. Les courbes montrent l'événement indentation (noir) et l'événement rétraction (rouge). La courbe ajustée (vert) est utilisée pour calculer le module d'élasticité, en utilisant le modèle mathématique d'ajustement de Hertz.

Par une procédure d'indentation semblable à celle en AFM, la force d'indentation peut être mesurée par OT en suivant les déplacements de la sonde dans le centre de piège. Pour de petits déplacements de la bille du centre du piège, la force exercée par la cellule sur la bille au cours de l'indentation peut être calculée à partir de **l'équation 4.1**. Pour des raisons de comparaison avec la technique AFM, nous avons ensuite mesuré la force résultante par rapport à la séparation bille-cellule et la **figure 4.7** est une illustration de ce résultat expérimental.

b) Mesure du module d'élasticité par AFM et OT

En AFM, au cours d'une expérience d'indentation verticale, la courbe force-indentation est calculée lorsque le cantilever est en interaction avec la cellule. Le module d'élasticité est cartographié et calculé à partir des données force-indentation acquises au cours de l'expérience. Ceci est calculé en utilisant le modèle mathématique de Sneddon pour une sonde conique, qui est défini par l'équation suivante (Sneddon, 1951)

$$E = \frac{\pi}{2} \frac{(1-\nu^2)}{Id^2 \times \tan \theta} \times F \quad (4.5)$$

Avec la technique OT, en analysant la courbe force-indentation lors de l'indentation de la cellule avec une bille de taille 3 µm, le module d'élasticité de la cellule peut être calculée en utilisant le modèle de Hertz pour un élément d'indentation de géométrie sphérique. Le module d'élasticité E peut ainsi être calculé à partir de l'équation 4.2.

c) Résultats comparatifs

En utilisant la méthode AFM, les modules élastiques de 30 cellules HBL-100, de 30 cellules MCF-7 et de 22 cellules MDA-MB-231 ont été calculés. Avec la méthode OT, nous avons mesuré les modules d'élasticité respectivement de 32, 32 et 22 cellules pour HBL-100, MCF-7 et MDA-MB-231.

Tableau 4.1 - Valeur moyenne du module d'élasticité mesuré et écart type (SD) sur n cellules en utilisant les techniques AFM et OT sur la partie supérieure du noyau de la cellule.

	AFM		OT	
	Module d'Élasticité E(kPa) +/- SD	n	Module d'Élasticité E(Pa) +/- SD	n
HBL-100	95.4 ± 43.6	30	23.5 ± 10.6	32
MCF-7	87.3 ± 47.8	30	30.2 ± 15.0	32
MDA-MB-231	55.6 ± 20.1	22	12.6 ± 6.1	22

Pour chaque expérience, les cellules ont été sélectionnées dans différentes boîtes de Pétri et dans des cultures différentes. Pour toutes les cellules, les mesures ont été réalisées dans leur région centrale, cette région étant indiquée comme la plus fiable pour faire une comparaison

entre des cellules différentes en termes d'élasticité (Coceano, et al., 2016). Les données mesurées en AFM et OT sont résumées dans le **tableau 4.1**.

Les valeurs moyennes des modules élastiques mesurées en OT apparaissent toujours beaucoup plus faibles que celles obtenues par AFM. Toutefois, la comparaison entre les cellules montre le même résultat important: la cellule basale du cancer du sein, MDA-MB- 231, a un module d'élasticité inférieur à celui des deux autres cellules, quelle que soit la technique et la vitesse de charge. Afin de tester si ces valeurs mesurées sont différentes d'une manière significative, un test bilatéral de Mann-Whitney (Rakotomalala, 2008) a été réalisé. C'est un test non paramétrique qui permet de comparer les moyennes entre deux échantillons indépendants. Il génère deux paramètres importants qui permettent de conclure à cet effet: le seuil de validité, appelé alpha ($0 < \alpha < 1$) et la probabilité, appelée p-value et notée P ($0 < P < 1$). Alpha prend très souvent les valeurs suivantes: 0.05, 0.01 ou 0.001. Pour des valeurs moyennes significativement différentes, la condition $P < \alpha$ doit être satisfaite. Les résultats de ce test sont représentés sur la **figure 4.8**.

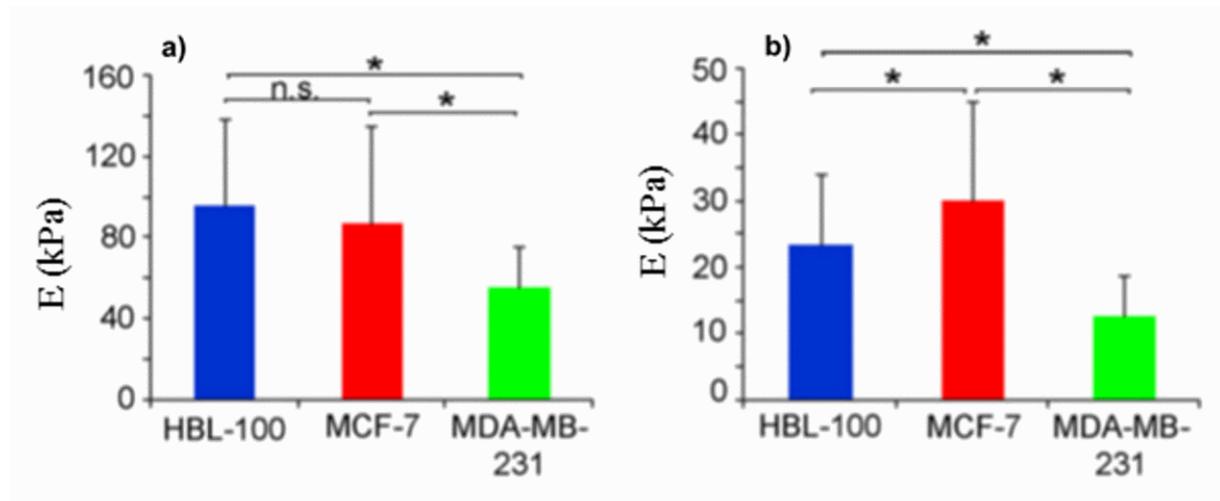


Figure 4.8 - Représentation graphique et analyse statistique des données du tableau 4.1. Le module d'élasticité mesuré pour MDA-MB-231 est significativement plus faible ($* P < 0.05$) que celle des deux autres cellules, aussi bien dans AFM a) que dans OTM b). La différence entre HBL-100 et MCF-7 n'est pas significative (n.s.) dans l'ensemble des données AFM, alors qu'elle est significative en OT ($* P < 0.05$).

Les deux techniques, AFM et OT, ont donné des résultats différents lorsque l'on compare les cellules HBL-100 et MCF-7. La différence entre les modules d'élasticité est jugée non statistiquement significative ($P = 0.5$) en AFM mais le module d'élasticité de la cellule MCF-7 devient significativement plus élevé que celui de la cellule HBL-100 ($P < 0.05$) lorsqu'il est

mesuré en OT. D'autre part, en comparant les réponses cellulaires en régimes de faible et grande force, comme illustré respectivement dans les figures 4.6 et 4.7 pour les mesures AFM et OT, nous observons également que les composants visqueux dans les mesures OT sont négligeables. Ceci est illustré par le fait que les courbes d'indentation et de rétraction se chevauchent (**Figure 4.7**), montrant ainsi un régime élastique pendant l'indentation à faibles forces. Par contre, la courbe de force dans AFM (**Figure 4.6**) indique une dissipation d'énergie à des forces élevées, en raison du comportement viscoélastique de la cellule.

4.4.2 Influence de l'adhérence cellulaire sur l'élasticité

Les résultats expérimentaux présentés ici ont été obtenus avec une combinaison de la configuration de pince optique avec le module de mesure de force présenté au chapitre 2, en utilisant la procédure expérimentale OT discutée en 4.1.1. L'influence de la rigidité du substrat sur la dynamique des cellules a été étudiée en comparant le module d'élasticité des cellules HBL lorsqu'elles sont cultivées sur un substrat nu et lorsqu'elles sont cultivées sur un substrat revêtu de collagène (Yousafzai, et al., 2016). En effet, le verre nu a une rigidité supérieure à celle d'un verre revêtu de collagène (Wen & Janmey, 2013) (Khademhosseini, Borenstein, Toner, & Takayama, 2008). Afin d'étudier le module d'élasticité, les déplacements de la sonde dans l'équilibre du piège ont été suivis durant l'expérience d'indentation et les forces appliquées à la cellule mesurées, résultant en une courbe force-indentation. L'analyse de telles courbes a permis de calculer les modules d'élasticité de la cellule HBL-100, en utilisant le modèle d'ajustement de Hertz (équation 4.2).

a) Mesure des forces

En utilisant la procédure expérimentale décrite en 4.1.1, le substrat sur lequel la cellule est fixée est déplacé avec une onde sinusoïdale d'amplitude $A = 1.14 \mu\text{m}$ et de période $T = 5 \text{ s}$. L'élément d'indentation consistait en une bille de silice de $3 \mu\text{m}$ de taille, maintenue dans le piège optique. Lorsque la cellule subit un déplacement axial, le déplacement vertical de la bille est acquis en même temps, à une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz (Gittes & Schmidt, 1998). Les déplacements de la cellule et de la bille, en données temporelles, sont illustrés sur la figure 4.9.

Pour de petits déplacements z de la bille par rapport à l'équilibre du piège, la force agissant sur la bille est donnée par l'équation 4.1. Nous avons utilisé les méthodes décrites en 2.4 (chapitre 2) afin de convertir les fluctuations mesurées à partir du QPD en position de la bille. La constante de raideur du piège est mesurée en analysant les déplacements libres de la

bille dans le piège, loin de la position de la cellule, dans la première moitié de la période. Pour la particule se déplaçant librement dans le piège, la force visqueuse a été évaluée négligeable

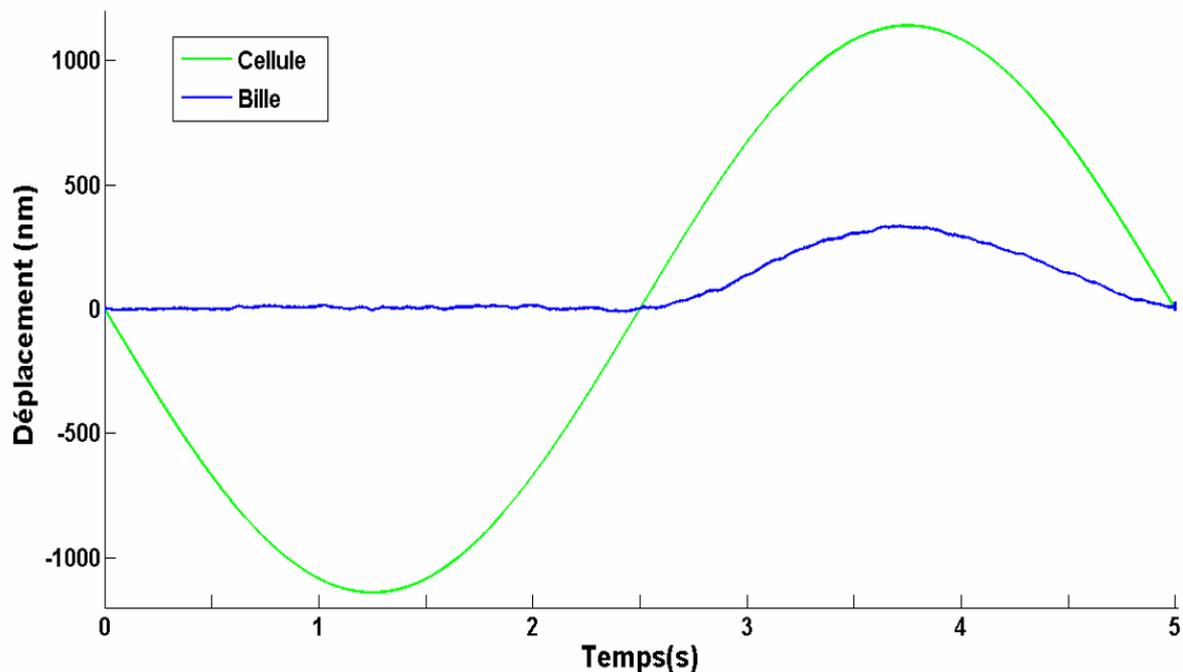


Figure 4.9 - Tracé de données des séries temporelles des déplacements du support de la cellule et de la bille: la première moitié de l'onde sinusoïdale correspond à une phase déplaçant vers le bas d'abord et puis vers le haut; dans cette région, la bille se déplace librement dans un mouvement brownien dans le piège. La cellule commence à intercepter la bille piégée dans la seconde moitié de la période, ce qui provoque son déplacement de l'équilibre du piège.

(< 0.05 pN). Par conséquent, la rigidité du piège a été calculée en utilisant la méthode d'équipartition (Neuman & Block, 2004) compte tenu du mouvement brownien de la bille dans le piège, lorsque le support est déplacé loin du centre du piège pendant un intervalle d'une seconde. En utilisant des puissances laser variant de 24 à 26 mW pour piéger, la rigidité de piège a été mesurée et maintenue à une valeur constante de $\kappa = 0.015 \text{ pN} / \text{nm}$.

Durant l'interaction cellule-bille dans la seconde moitié de l'onde sinusoïdale (**Figure 4.9**), les déplacements de la cellule et de la bille ainsi que l'indentation et les forces appliquées sont mesurés. La **figure 4.10** montre les résultats obtenus.

La valeur initiale t_1 dans l'intervalle d'indentation correspond au moment où la bille commence à indenter la cellule.

b) Module d'élasticité

L'exploitation des mesures de profondeur de pénétration et de force permet d'évaluer le module d'élasticité à partir du modèle de Hertz, linéarisé dans un intervalle d'indentation fixe,

comme décrit en 4.2.2. Avec une bille de 1.5 μm de rayon et une profondeur d'indentation de 200 nm, le module d'élasticité E est donnée par:

$$E = 1150 \times S \quad (4.8)$$

où S est la pente de la courbe force-indentation linéaire et E est le module d'élasticité.

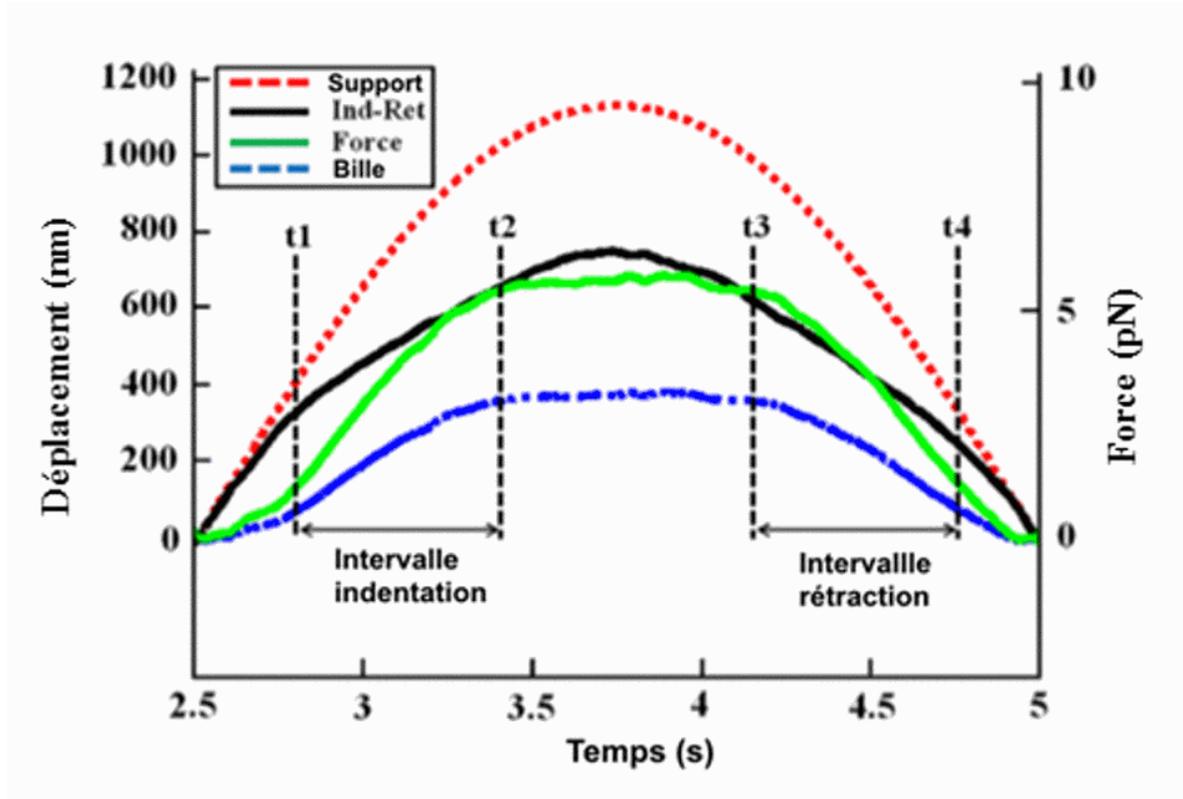


Figure 4.10 - Paramètres mesurés lors de l'interaction cellule-bille dans la seconde moitié de la sinusoïde, lorsque la cellule interagit avec la bille: déplacement de la cellule (rouge), déplacement de la bille mesuré (bleu), force calculée (vert), indentation calculée (noir). Les intervalles d'indentation et de rétraction sont choisis dans les régions linéaires de la sinusoïde. L'intervalle d'indentation correspond à l'intervalle pendant lequel la cellule se déplace vers la bille et l'intervalle de rétraction lorsque la cellule retourne vers sa position initiale.

c) Résultats

Nous avons mesuré et comparé le module d'élasticité de 26 cellules cultivées sur des substrats nus et de 26 cellules cultivées sur des substrats revêtus de collagène. Pour chaque substrat, les cellules ont été sélectionnées à partir de 10 boîtes de Pétri différentes, à partir de deux cultures différentes (i.e., faites dans deux jours différents). Les mesures ont été effectuées, pour toutes les cellules, dans leur région centrale au-dessus du noyau. Les résultats expérimentaux issus de cette étude sont résumés dans le tableau 4.2.

Les valeurs moyennes obtenues des mesures montrent que les cellules HBL-100 cultivées sur un substrat de verre ont un module d'élasticité supérieur à celui mesuré pour les cellules cultivées sur un substrat revêtu de collagène, à la fois pour l'indentation et pour la rétraction. Les erreurs représentent les écarts-types. Un t-test effectué sur l'ensemble des mesures montre que ces valeurs sont significativement différentes. Le t-test est l'équivalent paramétrique du test de Mann-Whitney précédemment cité. La **figure 4.11** présente une distribution en valeur moyenne de ces résultats.

Tableau 4.2 - Module d'élasticité mesuré durant les intervalles d'indentation et de rétraction des cellules HBL-100 lorsqu'elles sont cultivées en adhérence sur deux substrats différents. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart type (SD); le nombre de cellules mesurées pour chaque substrat est n = 26.

Module d'Élasticité E(Pa)+/-SD			
Indentation		Rétraction	
Substrat nu	Substrat revêtu de collagène	Substrat nu	Substrat revêtu de collagène
26 \pm 9	19 \pm 7	23 \pm 10	13 \pm 7
Variation entre substrats	27%	43%	

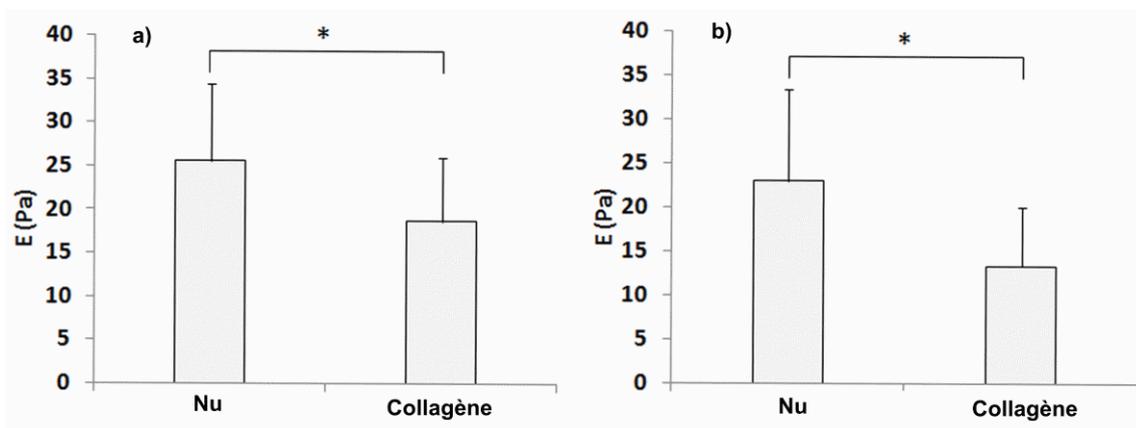


Figure 4.11 - Les valeurs moyennes du module d'élasticité pour a) l'indentation et b) la rétraction (n= 26 cellules; p < 0,01, * t-test).

Pour les deux substrats, les modules d'élasticité mesurés pour l'indentation étaient supérieurs à ceux mesurés pour le retrait (de 11.5% pour les substrats en verre et 31.6% pour les substrats revêtus de collagène).

La répartition des valeurs des modules d'élasticité peut être mieux observée à partir d'une représentation en boîte, comme le montre la **figure 4.12**. Nous remarquons que les données de module d'élasticité pour le substrat nu sont plus répandues dans le domaine des valeurs plus élevées que celles pour le substrat revêtu de collagène. L'application du test-t montre que les séries de données sont significativement différentes ($p < 0.01$).

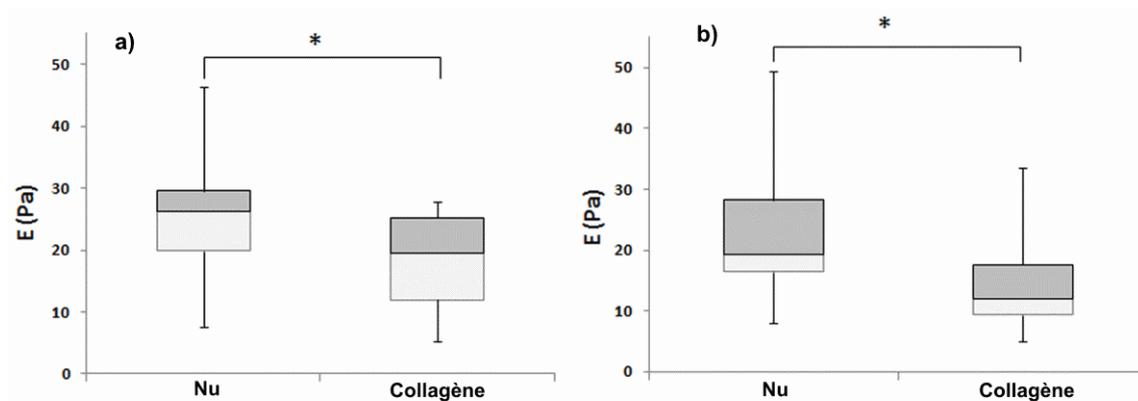


Figure 4.12 - Représentation en boîte de la distribution du module d'élasticité mesuré pour: a) l'indentation et b) la rétraction (n = 26; $p < 0,01$, test t *).

Ces résultats montrent que l'élasticité de la cellule est en corrélation avec la rigidité du substrat: le module d'élasticité de la cellule HBL-100 augmente lorsque les cellules sont cultivées sur un substrat plus rigide. Ainsi, la conclusion à tirer de cette analyse est que les cellules adaptent leur élasticité à la conformité du substrat; les cellules sont moins rigides avec un substrat plus conforme.

4.4.3 Influence des forces latérales sur le module d'élasticité des cellules

Nous avons utilisé la même configuration OT que pour les mesures précédentes pour étudier les effets des composantes latérales de la force sur le module d'élasticité mesuré des cellules HBL-100 et MDA-MB-231 (Ndoye, et al., 2016). Ces composantes de force latérales sont la plupart du temps ignorées dans de nombreuses expériences d'indentations en biophysique. Ces forces se produisent au cours d'une indentation verticale de la membrane cellulaire par une particule piégée et leurs composantes dans toutes les directions sont

déterminées en surveillant les déplacements de la particule dans toutes les directions. Nous avons calculé et comparé les modules d'élasticité des cellules, en considérant la composante de force axiale et la force totale, qui comprend à la fois la direction axiale et les composantes de la force latérale, en utilisant le modèle de Hertz linéarisé.

a) Mesure des forces

L'approche expérimentale présentée en 4.1.1 a été utilisée. Une bille de silice de $3\ \mu\text{m}$ est placée dans le piège et le support est déplacé avec une onde sinusoïdale d'amplitude $1\ \mu\text{m}$ et de période $T = 5\ \text{s}$. Lors d'un déplacement axial du support, les déplacements de la bille de silice dans les trois dimensions sont contrôlés et les données acquises avec une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz. Etant donné que le déplacement du support est vertical, on s'attend a priori à avoir un déplacement axial de la bille. Cependant, les expériences ont montré que la bille subit également un déplacement latéral. Ceci est dû à l'interaction spécifique de la bille avec la cellule, qui est un corps souple et a une forme non uniforme. La **figure 4.13** représente les données temporelles du déplacement du support en même temps que celles de la bille $BD(BD_x, BD_y, BD_z)$ dans le piège, pendant l'expérience d'indentation verticale. Dans la première moitié de la période, la cellule se déplace hors de la position de piège et donc la bille se déplace librement dans le piège avec un mouvement brownien.

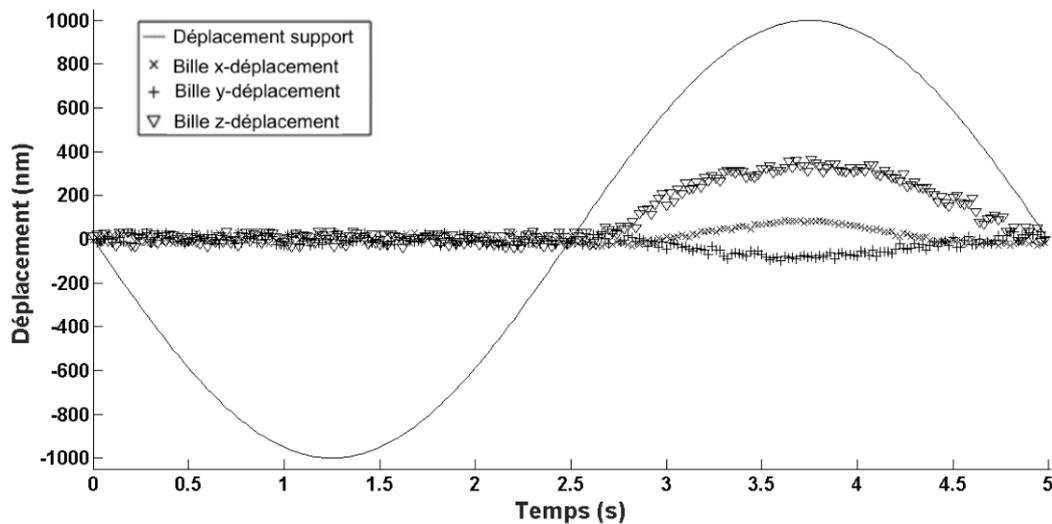


Figure 4.13 - Déplacements du support (cellule) et de la bille dans le piège pendant l'expérience. Le mouvement sinusoïdal de la scène rend les déplacements de la bille dans les directions x, y et z. Dans la première moitié de la période, la cellule se déplace vers le bas et par conséquent, la bille se déplace librement dans le piège. Au début de la seconde moitié de la période, lorsque la cellule intercepte la bille et la pousse vers le haut, le déplacement de la bille en z commence à être important et il est accompagné par de petits déplacements latéraux en x et y.

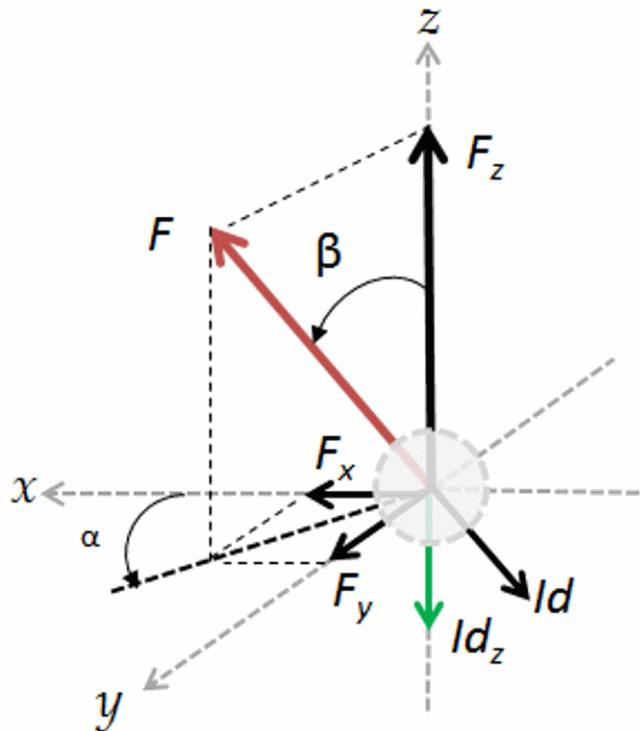


Figure 4.14: Représentation des composantes de forces: axiale, F_z , et latérales, F_x et F_y montrant que la force totale F n'est pas verticale - angle α et angle β définissant l'orientation de la force totale F .

Si le déplacement de la bille est vertical, la force n'a qu'une seule composante F_z et l'indentation Id_z est uniquement verticale (voir **Figure 4.2**). Cependant, en raison de l'interaction bille-cellule, la bille est également déplacée latéralement, ce qui correspond à des composantes de force latérales. De ce fait, les directions de la force totale F et de l'indentation totale Id sont déviées de la direction verticale, comme en atteste la **Figure 4.14** qui représente l'indentation totale (Id) ainsi que la force totale appliquée durant l'interaction cellule-bille et leurs différentes composantes.

Etant donné que la bille dans le piège se comporte comme dans un puits de potentiel harmonique, la force $F(F_x, F_y, F_z)$ exercée sur la bille est proportionnelle à son déplacement $BD(BD_x, BD_y, BD_z)$, telle qu'elle est exprimée dans l'équation 4.1, en considérant les trois composantes de forces:

$$F_x = \kappa_x \times BD_x \quad F_y = \kappa_y \times BD_y \quad F_z = \kappa_z \times BD_z$$

Tout au long du suivi du mouvement de la bille dans le piège (**Figure 4.13**), libre de toute autre perturbation dans la première moitié de la période, nous avons déterminé la rigidité

du piège κ avec ses trois composantes $\kappa(\kappa_x, \kappa_y, \kappa_z)$. κ est calculée dans ses trois composantes en tenant compte des conditions expérimentales réelles, en utilisant une puissance de laser de 30 mW (au niveau du plan de l'échantillon) avec une bille de silice de 3 μm de diamètre. Les valeurs $\kappa_x = \kappa_y = 0.02 \text{ pN/nm}$ et $\kappa_z = 0.015 \text{ pN/nm}$ obtenues confirment que le piège optique est plus sensible verticalement (Neuman & Block, 2004).

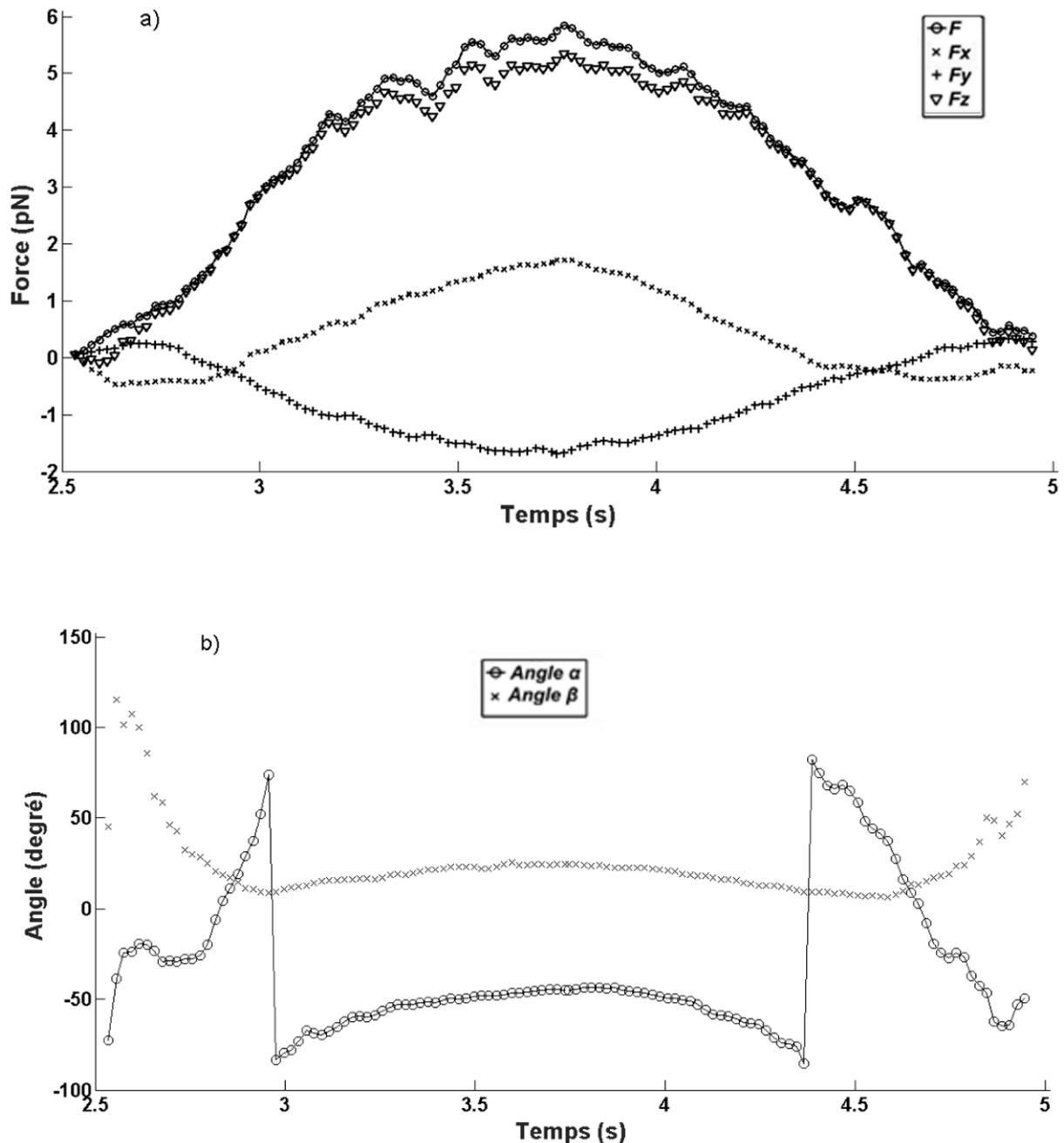


Figure 4.15 - Excursion en fonction du temps, pendant l'indentation verticale: a) force totale F et composantes de la force: F_x , F_y et F_z ; b) orientation de la force totale F : angle α et angle β .

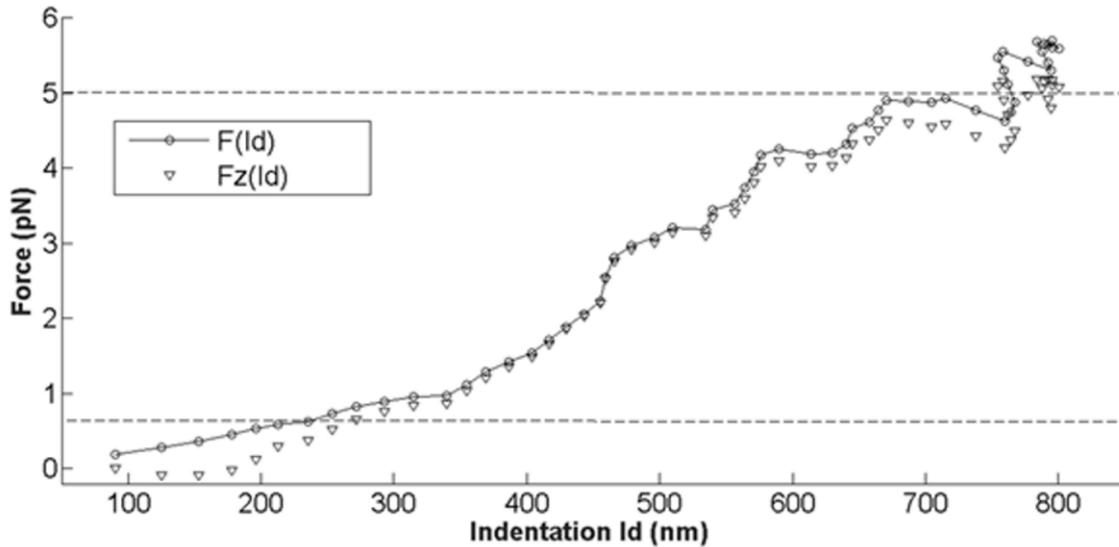


Figure 4.16 - Courbe force-indentation pour la force totale F et pour la force verticale F_z . Les lignes en pointillés définissent l'intervalle de la force lorsque l'ajustement est appliqué.

Pour la deuxième moitié de la période, la cellule intercepte la bille et la pousse vers le haut (**Figure 4.13**, direction z , symbole ∇) jusqu'à ce que la cellule commence à revenir à la position initiale. Cependant, même si le mouvement de la cellule est uniquement dans la direction verticale, la figure montre qu'il y a également des déplacements latéraux de la bille dans les directions x et y (symboles respectifs x et $+$).

Les amplitudes des forces et l'orientation de la force totale sont représentées dans la **figure 4.15**. Toutes les composantes de force augmentent au cours de l'indentation et diminuent pendant la phase de rétraction, en raison de l'interaction cellule-bille (**figure 4.15a**). La force totale F (symbole \circ) est cependant plus grande que la force verticale F_z (∇), en raison des composantes latérales F_x (symbole x) et F_y (symbole $+$). L'orientation de la force totale n'est pas verticale, et change considérablement, comme indiquée par les angles α et β (**figure 4.15b**). Les fluctuations de l'amplitude et de la direction de la force indiquent que la force totale est un paramètre plus approprié que la composante verticale.

La courbe force-indentation a été analysée en supposant que l'indentation est la même pour la force totale et pour la force axiale. La **figure 4.16** montre la variation des amplitudes de force par rapport à l'indentation.

b) Module d'élasticité

En supposant que les indentations dans le sens vertical et dans la direction de la force totale sont égales et en utilisant le modèle de Hertz ainsi que la procédure d'ajustement

linéarisée, nous pouvons calculer les modules élastiques correspondant à la force totale F et à la force verticale F_z . Les modules d'élasticité ont été extraits de façon linéaire à partir de la courbe $F^{2/3}(Id)$ aux intervalles d'indentation et de rétraction, pour la force totale et pour la force verticale, selon l'équation 4.3.

c) Résultats

Nous avons mesuré les modules élastiques de 10 cellules de MDA-MB 231 et 10 cellules de HBL-100. Les cellules de chaque ligne ont été sélectionnées à partir de deux cultures différentes préparées à des jours différents. Les mesures ont été effectuées sur la partie supérieure des cellules, i.e. dans une zone au-dessus du noyau. Les valeurs moyennes obtenues à partir de cette étude sont présentées dans le **tableau 4.3**.

Comme prévu, les modules élastiques correspondant à la force totale sont plus élevés que ceux correspondant à la seule force verticale, pour les deux types de cellules, pour l'indentation comme pour la rétraction. La différence maximale entre les valeurs moyennes du module d'élasticité correspondant à la force totale et ceux correspondant à la force verticale est observée pour les cellules HBL-100. Néanmoins, les valeurs du **tableau 4.3** indiquent déjà que les cellules HBL-100 sont plus rigides que les cellules MDA-MB-231. Ceci confirme les résultats d'autres études rapportées dans la littérature (Wirtz, Konstantopoulos, & Searson, 2011), qui démontrent que les cellules cancéreuses agressives basales (MDA-MB-231) sont plus souples que les cellules non néoplasiques (HBL-100).

Tableau 4.3 - Les modules élastiques des cellules HBL-100 et MDA-MD-231 mesurés pour l'indentation et la rétraction, résultant de la force totale (E_i , E_r) et de la force verticale (E_i^z , E_r^z). Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart type (SD); le nombre de cellules mesurées pour chaque lignée cellulaire est $n = 10$.

	Module d'Élasticité E(Pa)+/-SD			
	Indentation		Rétraction	
	E_i	E_i^z	E_r	E_r^z
HBL-100	27.75 \pm 12.71	21.66 \pm 8.88	23 \pm 8.21	21.2 \pm 6.38
	22%		7.8%	
MDA-MB-231	8.22 \pm 4.69	6.62 \pm 5.37	8.41 \pm 6.12	7 \pm 6.49
	19%		16%	

La figure 4.17 résume les résultats dans une représentation des valeurs moyennes. Pour la cellule HBL-100, le module d'élasticité est plus élevé pour l'indentation que la rétraction (17%), lorsqu'il est calculé à partir de la force totale. Cependant, aucune différence significative n'est observée lorsqu'il est calculé à partir de la force axiale (seulement 2%). Pour l'indentation, les cellules HBL-100 sont plus rigides lorsque la force totale est considérée plutôt que seulement la composante de force axiale. Pour la rétraction, la différence est plus faible. Dans le cas des cellules MDA-MB-231, les valeurs du module d'élasticité à la fois pour la force totale et pour la force axiale sont presque les mêmes durant l'indentation et la rétraction, ce qui indique un régime élastique clair. Néanmoins, pour l'indentation, le module d'élasticité calculé avec la force totale est plus élevé que celui obtenu à partir de la force axiale. De même, pendant la rétraction, cette valeur est plus élevée pour la force totale que pour la force axiale.

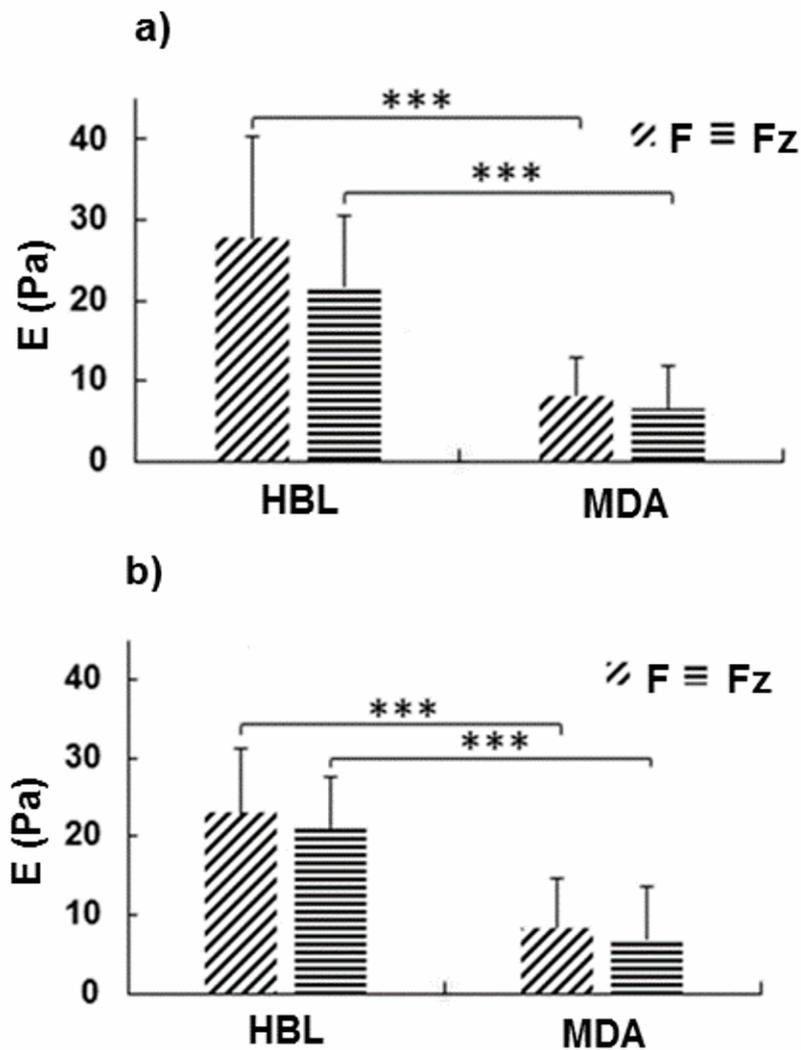


Figure 4.17 - Valeurs moyennes du module d'élasticité calculées pour les cellules HBL-100 et pour les cellules MDA-MB-231 durant (a) l'indentation et (b) la rétraction, en considérant la force totale (F) et la force verticale (F_z). (t-test: *** $p < 0,001$)

Le module d'élasticité calculé pour les cellules HBL-100 est supérieur à celui pour les MDA-MB 231 cellules, tant pour l'indentation que la rétraction, lorsque estimé aussi bien avec la force totale qu'avec la force axiale. Ces mesures confirment que les cellules métastatiques MDA-MB-231 sont plus souples comparées aux cellules HBL-100. D'autre part, les deux types de cellules semblent être plus rigides lorsque sondées avec la force totale. Cela donne des preuves de la contribution des forces latérales dans l'interaction cellule-bille. Ces résultats suggèrent que la prise en compte des forces latérales fournirait une mesure plus précise du module d'élasticité effectif, ce qui permet une meilleure analyse des propriétés mécaniques des cellules.

4.5 Discussion

Pour étudier les propriétés mécaniques de cellules biologiques avec la technique OT, une expérience d'indentation verticale a été mise en œuvre pour réaliser l'indentation des cellules à des forces de l'ordre du pico Newton (pN). Au cours de cette expérience, la cellule fixée sur la surface d'un substrat est déplacée axialement contre une bille optiquement piégée. Un même faisceau laser à infrarouge a été utilisé à la fois pour le piégeage et le sondage de la force. Dans ce contexte, d'autres implémentations d'indentation verticale des cellules à l'aide d'une configuration de la pince optique ont été récemment rapportées pour la mesure de l'élasticité locale des cellules de fibroblastes 3T3 et des cellules Balb3T3 (Nawaz, et al., 2012) (Dy, Kanaya, & Sugiura, 2013). Dans le mode opératoire de ces travaux, une bille piégée est poussée axialement contre la cellule fixe en déplaçant la position du piège et l'indentation de la cellule est déterminée en mesurant le déplacement axial de la bille. Dans notre méthode, une approche alternative pour l'indentation de la cellule est proposée; la cellule est déplacée axialement contre la bille piégée et les déplacements de la bille sont mesurés simultanément. Etant donné que la position du piège est fixe dans notre approche, les déplacements de la bille reflètent directement son interaction avec la cellule, ce qui évite toute interférence avec des dérives au cours du déplacement axial du piège. Par conséquent, notre approche est conceptuellement plus précise que la solution de déplacer la position du piège, qui est utilisée dans les travaux mentionnés précédemment. En outre, notre implémentation permet de suivre en trois dimensions les déplacements de la bille dans le piège, tandis que dans les travaux antérieurs cités, seul le déplacement le long de l'axe vertical a été suivi.

En utilisant cette technique d'indentation verticale, nous avons étudié et mesuré les propriétés viscoélastiques des cellules du cancer du sein provenant de trois lignes: HBL-100, MCF-7 et MDA-MB-231 (Lacroix & Leclercq, 2004). Les résultats obtenus montrent que la

cellule basale (MDA-MB-231) est plus molle que la cellule luminale (MCF-7) et la cellule myoepithelial (HBL-100). Ils sont conformes aux études précédentes. En effet, le fait que les cellules tumorales soient plus souples que les cellules non tumorales a été confirmé dans la littérature (Lekka, et al., 2012) (Li, Lee, Ong, & Lim, 2008) (Sugawara, et al., 2008). Les résultats reflètent le niveau d'agressivité des cellules et donc leur nature à propager qui pourrait conduire à des métastases.

Par ailleurs, le caractère viscoélastique, inhomogène et anisotrope des cellules vivantes les rend sensibles aux forces appliquées et à la vitesse de chargement. Par conséquent, il était important de compléter les mesures avec la pince optique par des mesures d'indentation verticale en utilisant la microscopie à force atomique (AFM), en suivant la même procédure expérimentale, afin de caractériser les propriétés viscoélastiques des mêmes cellules. En utilisant la technique d'indentation verticale avec l'AFM, le module d'élasticité pour chaque cellule a été mesuré. Les résultats obtenus de l'AFM présentent la même tendance que ceux avec la pince optique. Le module d'élasticité mesuré pour la cellule MDA-MB-231 est plus petit que pour les deux autres cellules. En outre, les différences de régime d'indentation entre les deux techniques rendent les mesures de la pince optique beaucoup plus faibles que celles trouvées avec l'AFM (Pa vs kPa par OT et AFM, respectivement) pour les trois types de cellule. En effet, des paramètres tels que le taux de charge, la force d'indentation, et la rigidité du piège sont connus pour affecter le module d'élasticité (Chiou, Lin, Tang, Lin, & Yeh, 2013) (Alcaraz, et al., 2003). L'AFM fonctionne à des forces et taux de chargement élevés alors que les pinces optiques fonctionnent à des forces faibles et des taux de chargement relativement bas (respectivement 2 nN et $<10^5$ pN/s en AFM; <10 pN et < 5 pN/s, en OT). La vitesse de chargement basse employée en OT est une conséquence des faibles forces exercées mais aussi de la faible fréquence à laquelle l'oscillation se produit au cours de l'expérience d'indentation. Un autre paramètre qui est affecté par les régimes d'indentation est le comportement visqueux de la cellule. En effet, l'AFM a tendance à avoir une plus grande dissipation dans la région de la zone nucléaire en raison du comportement visqueux de la cellule à des forces élevées. L'OT par contre montre une réponse quasi élastique de la cellule, comme on peut le voir par les mesures des courbes de forces dans ce régime.

Cependant, les techniques AFM et OT ont donné des résultats différents lorsque l'on compare les cellules HBL-100 et MCF-7. En effet, dans la technique d'indentation OT, la cellule HBL-100 est plus souple que la cellule MCF-7, alors qu'aucune différence n'a été observée dans la technique AFM. Ce comportement a été attribué à la double nature de la cellule HBL-100.

Cette cellule est désignée comme une cellule du sein mais dans une situation particulière. En effet, la cellule HBL-100 est développée à partir du lait d'une femme en bonne santé; par conséquent, la cellule est liée à la production de lait (Caron de Fromentel, et al., 1985) (Gaffney, 1982) (Laherty, et al., 1990). Il est bien connu que le cycle de la gestation induit une prolifération massive mais aussi à la différenciation des cellules épithéliales qui sont sensibles à la transformation néoplasique (Wagner & Smith, 2005). Cette double nature des cellules HBL-100 les amène à afficher une augmentation de la capacité à induire l'angiogenèse. Par conséquent, la cellule HBL-100 peut être considérée comme l'équivalente normale de la cellule de grande agressivité MDA-MB-231, mais il ne peut pas être comparée à la cellule luminaire MCF-7, parce que présentant un phénotype différent.

Pour étudier les réponses cellulaires face aux modifications de l'environnement extracellulaire, des cellules vivantes cultivées sur un substrat nu (plus rigide) et sur un substrat revêtu de collagène ont été étudiées et les propriétés élastiques de ces cellules cultivées sur ces deux types de substrats ont été mesurées. Comme modèle dans cette étude, nous avons utilisé la cellule HBL-100. Elle a déjà été utilisée comme modèle de cellule non néoplasique lors de l'étude des propriétés mécaniques des cellules du cancer du sein telles que les cellules MDA-MB-231 (comme indiqué dans les résultats précédents). Toutefois, HBL-100 n'a pas été caractérisée du point de vue mécanique. En utilisant la technique d'indentation verticale avec la pince optique, nous avons mesuré des valeurs différentes pour le module d'élasticité qui sont influencées par le comportement d'adhérence et la croissance de la cellule sur des surfaces de substrat spécifiques. En effet, la cellule HBL-100 est observée comme étant moins rigide avec le substrat le plus souple (revêtu de collagène), montrant ainsi que les propriétés mécaniques du substrat influencent non seulement la diffusion et la mobilité, mais aussi l'élasticité des cellules.

En plus du contrôle du déplacement axial lors de l'expérience d'indentation verticale, la configuration de la pince optique mise au point a permis de contrôler les interactions latérales entre la cellule et la particule microscopique. Même si le déplacement de la cellule vers la particule est axial, l'interaction cellule-particule peut induire aussi des déplacements latéraux de la particule. Ceci est dû à la forme non plane de la membrane cellulaire en contact avec la particule.

Les composants latéraux du déplacement de la particule sont la plupart du temps ignorés dans de nombreuses expériences d'indentation en biophysique. Par conséquent, nous avons

étudié les forces latérales qui apparaissent pendant l'indentation verticale de la membrane cellulaire avec une bille optiquement piégée. En utilisant la technique d'indentation verticale avec OT et un mécanisme de surveillance de la force dans les trois dimensions, nous avons étudié les effets des composantes latérales des forces sur le module d'élasticité des cellules HBL-100 et MDA-MB-231. Nous avons observé que le module d'élasticité trouvé en considérant la force totale est supérieur à celui de sa composante verticale, pour les deux types de cellules. Ce qui suggère que pour une analyse plus rigoureuse, la force totale devrait être considérée plutôt que seule la force verticale.

Les résultats obtenus dans ce travail démontrent le potentiel de la configuration de la pince optique utilisée pour sonder, à faible force, les modifications dans les propriétés mécaniques des cellules induites par le milieu environnant.

CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail était de construire et calibrer un appareil de pince optique (OT), afin d'étudier les propriétés mécaniques de cellules cancéreuses issues du sein.

La configuration de pince optique construite a démontré sa capacité et sa polyvalence à piéger et manipuler des particules de diamètres et de compositions variées, des microsphères de silice aux cellules biologiques.

L'OT offre une technique de détection de force bien établie capable de mesurer les forces d'interaction entre les cellules biologiques et leur microenvironnement. Les chapitres 2 et 3 ont détaillé le développement et la réalisation expérimentale d'un piège optique pour l'emploi comme technique de détection de force, avec une applicabilité générale dans l'étude des propriétés mécaniques de cellules.

L'application de l'OT comme technique dynamique de détection de force a fourni un aperçu dans la caractérisation des propriétés mécaniques des cellules biologiques. Ce travail fournit une plate-forme prouvant le principe de mesure avec l'appareil OT construit pour l'étude des propriétés mécaniques de cellules issues du cancer du sein, avec des données complémentaires obtenues à partir de mesures effectuées par AFM.

Les propriétés viscoélastiques des cellules du cancer du sein provenant de trois lignes avec des niveaux d'agressivités différentes ont été étudiées et mesurées. Les techniques complémentaires de l'OT et de l'AFM ont démontré qu'une cellule basale se trouve être plus souple qu'une cellule luminale ou une cellule normale, confirmant leur nature à propager pour conduire à des états métastatiques.

En oncologie, l'aspect moléculaire de ces cellules a été intensivement étudié, mais les résultats obtenus dans notre travail démontrent la capacité de la technique OT à détecter et mesurer les modifications dans les propriétés mécaniques des cellules induites par le milieu environnant.

L'OT a permis de contrôler directement les réponses cellulaires engendrées par les modifications de l'environnement extracellulaire, révélant ainsi que les propriétés mécaniques du substrat influencent aussi l'élasticité des cellules. En effet, en utilisant la technique de la pince optique, la cellule normale est observée comme étant plus souple sur le substrat le moins rigide, celui revêtu de collagène.

En partant de cela, l'étude par OT de l'influence des composantes latérales des forces sur le module d'élasticité des trois types de cellules montre que les cellules sont plus rigides lorsque la force totale est considérée, plutôt que sa composante verticale. Par conséquent, pour une analyse plus rigoureuse, la force totale devrait être considérée plutôt que la force verticale seule. Dans de futures études, il sera nécessaire d'effectuer également des mesures d'élasticité dans les régions proche du noyau des cellules jusqu'à la région qui délimite la bordure des cellules, pour une analyse plus complète.

Les techniques OT et AFM ont indépendamment fourni des données qualitatives complémentaires pour la compréhension des changements mécaniques, qui accompagnent la déformation des structures des cellules cancéreuses en interaction avec leur microenvironnement. En effet, ce travail a permis de caractériser et de discriminer les propriétés viscoélastiques de trois cellules du cancer du sein de stade d'agressivités différentes. L'étude globale a également montré l'importance de l'environnement cellulaire dans la propagation de la tumeur.

Dans ce travail, la technique de pince optique a été utilisée pour contrôler et quantifier les interactions des cellules avec son environnement, du point de vue mécanique. Le choix de la conception signifie que la configuration peut être facilement adaptée pour loger des systèmes plus sophistiqués. Les résultats expérimentaux décrits ici et les conclusions tirées contribuent à l'élargissement des études biomécaniques du cancer dans le but ultime d'évaluer le potentiel des cellules à conduire à des métastases sur la base des mesures mécaniques plutôt que sur des marqueurs moléculaires uniquement. Ceci pourrait à terme conduire à de nouvelles approches dépourvu le développement de techniques de diagnostic et thérapie.

BIBLIOGRAPHIE

- Albelda, S. M., & Buck, C. A. (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*, *4*, 2868–2880.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, (éd. 4th edn.). N. Y.: Garland Science.
- Alcaraz, J., Buscemi, L., Grabulosa, M., Trepas, X., Fabry, B., Farré, R., & Navajas, D. (2003). Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.*, *84*(3), 2071–2079.
- Allersma, M. W., Gittes, F., deCastro, M. J., Stewart, R. J., & Schmidt, C. F. (1998). Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophys. J.*, *74*(2 Pt 1), 1074–1085.
- Andre, F., & Pusztai, L. (2006). Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy. *Nature Clinical Practice Oncology*, *3*(11), 621–632.
- Ashkin, A. (1970). Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys Rev Lett*, *24*(4), 156–159.
- Ashkin, A. (1971). Optical levitation by radiation pressure. *Applied physics letters*, *19*, 283–285.
- Ashkin, A. (1978). Trapping of atoms by resonance radiation pressure. *Physics Review Letters*, *40*(12), 729–732.
- Ashkin, A. (1992). Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophys. J.*, *61*, 569–582.
- Ashkin, A. (2006). *Optical Trapping and Manipulation of Neutral Particles using lasers*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Ashkin, A., & Dziedzic, J. M. (1985). Observation of radiation-pressure trapping of particles by alternating light beams. *Physical Review Letters*, *54*(12), 1245–1248.
- Ashkin, A., & Dziedzic, J. M. (1987). Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, *235*(4795), 1517–1520.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., & Yamane, T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, *330*(6150), 769–771.
- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., & Chu, S. (1986). Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles. *Opt Lett*, *11*(5), 288–290.
- Bauer, K., Mierke, C., & Behrens, J. (2007). *Int. J. Cancer*, *121*, 1910–1918.

- Bechhoefer, J., & Wilson, S. (2002). Faster, cheaper, safer optical tweezers for the undergraduate laboratory. *American Journal of Physics*, 70(4), 393-400.
- Ben-Ze'ev, A. (1985). Cell-cell interaction and cell configuration related control of cytokeratins and vimentin expression in epithelial cell and in fibroblasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 455, 597-613.
- Berg-Sørensen, K., & Flyvbjerg, H. (2004). Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.*, 75, pp. 594-612.
- Berg-Sørensen, K., Peterman, E. J., Weber, T., Schmidt, C. F., & Flyvbjerg, H. (2006). Power spectrum analysis for optical tweezers. II: Laser wavelength dependence of parasitic filtering, and how to achieve high bandwidth. *Review of Scientific Instruments*, 77. doi:10.1063/1.2204589
- Bertucci, F., & Birnbaum, D. (2008). Reasons for breast cancer heterogeneity. *J. Biol.*, 7(2). doi:10.1186/jbiol67.
- Bilodeau, G. G. (1992). Regular pyramid punch problem. *J Appl Mech*, 59(3), 519–523.
- Block, S. M. (1990). Optical tweezers: A new tool for biophysics. (J. K. Foskett, & S. Grinstein, Éds.) *Noninvasive Techniques in Cell Biology, Modern Cell Biology*, 9, 375–402.
- Block, S. M. (1998). Constructing Optical Tweezers. (D. Spector, R. Goldman, & L. Leinward, Éds.) *Cell Biology: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
- Bodensiek, K., Li, W., Sánchez, P., Nawaz, S., & Schaap, I. A. (2013). A high-speed vertical optical trap for the mechanical testing of living cells at piconewton forces. *Rev Sci Instrum.*, 84(11). doi:10.1063/1.4832036
- Bustamante, C., Smith, S. B., Liphardt, J., & Smith, D. (2000). Single-molecule studies of DNA mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 279–285.
- Canetta, E., Duperray, A., Leyrat, A., & Verdier, C. (2005). *Biorheology*, 42, 321-333.
- Caron de Fromentel, C., Nardeux, P. C., Soussi, T., Laviaille, C., Estrade, S., Carloni, G., . . . Cassingena, R. (1985). Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Experimental cell research*, 160(1), 83-94.
- Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 4, 118-132.
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331, 1559–1564.

- Chiou, Y. W., Lin, H. K., Tang, M. J., Lin, H. H., & Yeh, M. L. (2013). The influence of physical and physiological cues on atomic force microscopy-based cell stiffness assessment. *PLoS One*, 8(10).
- Christofori, G. (2006). New signals from the invasive front. *Nature*, 441, 444-450.
- Chu, S., Bjorkholm, J. E., Ashkin, A., & Cable, A. (1986). Experimental Observation of Optically Trapped Atoms. *Physical Review Letters*, 57(3).
- Cizmar, T., Davila Romero, L. C., Dholakia, K., & Andrews, D. L. (2010). Multiple optical trapping and binding: new routes to self-assembly. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.*, 43 . doi:10.1088/0953-4075/43/10/102001
- Coceano, G., Yousafzai, M. S., Ma, W., Ndoye, F., Venturelli, L., Hussain, I., . . . Cojoc, D. (2016). Investigation into local cell mechanics by atomic force microscopy mapping and optical tweezers vertical indentation. *Nanotechnology*, 27(6).
- Cojoc, D., Cabrini, S., Ferrari, E., Malureanu, R., Danailov, M. B., & Di Fabrizio, E. (2004). Dynamic multiple optical trapping by means of diffractive optical elements. *Microelectron. Eng.*, 73, 927–32.
- Costa, K. D. (2004). Single-cell elastography: probing for disease with the atomic force microscope. *Dis. Markers*, 19, 139–154.
- Crocker, J. C., & Grier, D. G. (1996). Methods of digital video microscopy for colloidal studies, *Journal of Colloid and Interface Science*. 179, 298–310.
- Cross, S. E., Jin, Y. S., Rao, J., & Gimzewski, J. K. (2007). Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat. Nanotechnology*, 2(12), 780–3.
- Dahl, K. N., Ribeiro, A. J., & Lammerding, J. (2008). Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. *Circ. Res.*, 102, 1307–1318.
- Dai, J., & Sheetz, M. P. (1995). Mechanical properties of neuronal growth cone membranes studied by tether formation with laser optical tweezers. *Biophys J.*, 68(3), 988-996.
- Dai, J., & Sheetz, M. P. (1999). Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophys J.*, 77(6), 3363–3370.
- Denk, W., & Webb, W. W. (1990). Optical measurement of pico-meter displacements of transparent microscopic objects . *Applied Optics*, 29, 2382–91.
- Difato, F., Pinato, G., & Cojoc, D. (2013). Cell Signaling Experiments Driven by Optical Manipulation. *Int. J. Mol. Sci.* , 14, 8963-8984. doi:10.3390/ijms14058963
- Dimitriadis, E. K., Horkay, F., Maresca, J., Kachar, B., & Chadwick, R. S. (2002). Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J.* , 82(5), 2798-2810.

- Discher, D. E. (2005). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science*, *310*, 1139–1143.
- Dy, M. C., Kanaya, S., & Sugiura, T. (2013). Localized cell stiffness measurement using axial movement of an optically trapped microparticle. *J Biomed Opt*, *18*(11). doi:10.1117/1.JBO.18.11.111411
- Engler, A. J., Richert, L., Wong, J. Y., Picart, C., & Discher, D. E. (2004). Surface probe measurements of the elasticity of sectioned tissue, thin gels and polyelectrolyte multilayer films: correlations between substrate stiffness and cell adhesion. *Surf. Sci.*, *570*, 142-154.
- Ericsson, M., Hanstorp, D., Hagberg, P., Enger, J., & Nystrom, T. (2000). Sorting Out Bacterial Viability with Optical Tweezers. *J. Bacteriol.*, *182*, 5551–5555.
- Fällman, E., & Axner, O. (2003). Influence of a glass-water interface on the on-axis trapping of micrometer-sized spherical objects by optical tweezers. *Appl Opt.*, *42*(19), 3915-26.
- Fischer, R. S., Myers, K. A., Gardel, M. L., & Waterman, C. M. (2012). Stiffness-controlled three- dimensional extracellular matrices for high-resolution imaging of cell behavior. *Nat. Protoc.*, *7*, 2056–66.
- Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.*, *123*, 4195–4200.
- Gaffney, E. V. (1982). A cell line (HBL-100) established from human breast milk. *Cell Tissue Res*, *227*(3), 563–568.
- Geiger, T. R., & Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* *1796*, pp. 293-308.
- Gimbrone, M. A., Leapman, S. B., Cotran, R. S., & Folkman, J. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* , *136*, 261–76.
- Gimbrone, M. A., Leapman, S., Cotran, R. S., & Folkman, J. (1973). Tumor angiogenesis: iris neovascularization at a distance from experimental intraocular tumors. *J. Natl Cancer Inst.*, *50* (1), 219–28.
- Gittes, F., & Schmidt, C. F. (1998). Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Optics Letters*, *23*(1).
- Grier, D. G. (2003). A revolution in optical manipulation. *Nature*, *424*, 810–816.
- Guck, J., S, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., . . . Bilby, C. (2005). Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophysical Journal*, *88*(5), 3689-3698.

- Guilak, F., Tedrow, J. R., & Burgkart, R. (2000). Viscoelastic Properties of the Cell Nucleus . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *269*, 781–786.
- Guz, N., Dokukin, M., Kalaparthy, V., & Sokolov, I. (2014). If cell mechanics can be described by elastic modulus: study of different models and probes used in indentation experiments. *Biophys J.*, *107*, 564–75.
- Hamamatsu. (s.d.). Récupéré sur <http://www.hamamatsu.com/us/en/community/lcos/applications/optical.html>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.*, *100*, 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*, 646–674.
- Hazan, R. B., Phillips, G. R., Qiao, R. F., Norton, L., & Aaronson, S. A. (2000). Exogenous Expression of N-Cadherin in Breast Cancer Cells Induces Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *J. Cell Biol.* , *148*, 779–790.
- Hertz, H. (1881). Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *J Reine Angew Math*, *92*, 156–171.
- Huang, C. C., Wang, C. F., Mehta, D. S., & Chiou, A. (2001). Optical tweezers as sub-piconewton force transducers. . *Opt. Commun* *2001*, *195*(1–4), 41–48.
- Huang, H., S, J., Jonas, M., Barresi, R., So, P. T., Campbell, K. P., & Lee, R. T. (2005). Cell stiffness and receptors: evidence for cytoskeletal subnetworks. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, *288*(1), C72-C80.
- Ingber, D. E., Prusty, D., Sun, Z., Betensky, H., & Wang, N. (1995). Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J. Biomech.*, *28*, 1471–1484.
- Janmey, P. A. (1998). The Cytoskeleton and Cell Signaling: Component Localization and Mechanical Coupling. *Physiol. Rev.*, *78*, pp. 763–781.
- Jechlinger, M., Grunert, S., Tamir, I. H., Janda, E., Ludemann, S., Waerner, T., . . . Kraut, N. (2003). Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene*, *22*, 7155-7169.
- Johnson, K. L. (1985). *Contact mechanics*. Cambridge University Press.
- Johnson, K. L., Kendall, K., & Roberts, A. D. (1971). Surface energy and the contact of elastic solids. *Proc. R. Soc. Lond. A.*, *324*(1558), 301-313.
- Kaputa, D. S., Kuzmin, A. N., Kachynski, A. V., Cartwright, A. N., & Prasad, P. N. (2005). Dynamics of multiple trapping by a single-beam laser tweezer. *Applied Optics*, *44*(19), 3963-3968.

- Ketene, A. N., Schmelz, E. M., Roberts, P. C., & Agah, M. (2012). The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures . *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 8 , 93–102.
- Khademhosseini, A., Borenstein, J., Toner, M., & Takayama, S. (2008). *Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment: Technologies and Applications*. Artech House Publishers;
- Kirmizis, D., & Logothetidis, S. (2010). Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomedicine*, 5, 137–145.
- Kollmannsberger, P., & Fabry, B. (2011). Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells. *Annu. Rev. Mater. Res.*, 41, pp. 75–97.
- Kumar, S., & Weaver, V. M. (2009). Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev.*, 28, pp. 113-127.
- Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, 83(3), 249-289.
- Laherty, R. F., Balcavage, W. X., Goff, C., Alvager, T., Ghosh, S., Geib, R. W., . . . Personett, D. (1990). HBL-100 cells do not secrete casein and lack prolactin and estradiol receptors. *In Vitro Cell Dev Biol.*, 26(10), 933–935.
- Lekka, M., Pogoda, K., Gostek, J., Klymenko, O., Prauzner-Bechcicki, S., Wiltowska-Zuber, J., . . . Stachura, Z. (2012). Cancer cell recognition--mechanical phenotype. *Micron.*, 43 (12), 1259–1266.
- Li, Q. S., Lee, G. Y., Ong, C. N., & Lim, C. T. (2008). AFM indentation study of breast cancer cells. *Biomechanical and Biophysical Research Communications*, 374, 609-613.
- Li, Z., Anvari, B., Takashima, M., Brecht, P., Torres, J. H., & Brownell, W. E. (2002). Membrane tether formation from outer hair cells with optical tweezers. *Biophys J.*, 82(3), 1386–1395.
- Lincoln, B., Erickson, H. M., Schinkinger, S., Wottawah, F., Mitchell, D., Ulvick, S., . . . Guck, J. (2004). Deformability-based flow cytometry. *Cytometry A.*, 59A(2), 203-209.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., & al. (2000). *Molecular cell biology* (New York: W. H. Freeman).
- Mahaffy, R. E., Park, S., Gerde, E., Käs, J., & Shih, C. K. (2004). Quantitative Analysis of the Visco-elastic Properties of Thin Regions of Fibroblasts Using Atomic Force Microscopy. *Biophys J.*, 86(3), 1777–1793.
- Makale, M. (2007). Cellular mechanobiology and cancer metastasis. Birth Defects Res Part C: . *Embryo Today: Rev*, 81, pp. 329–43.

- Matthews, J. N. (2009). Commercial optical traps emerge from biophysics labs. *Physics Today*, 62, 26–8.
- Mierke, C. T. (2013). Physical break-down of the classical view on cancer cell invasion and metastasis. *Eur. J. Cell Biol.*, 92, 89–104.
- Mierke, C. T. (2014). The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation. *Reports on Progress in Physics*, 77(076602). doi:10.1088/0034-4885/77/7/076602
- Mierke, C. T. (2015). Initiation of a neoplasm or tumor. Dans *Physics of Cancer*. IOP Publishing Ltd. doi:10.1088/978-0-7503-1134-2ch1
- Moffitt, J. R., Chemla, Y. R., Smith, S. B., & Bustamante, C. (2008). Recent Advances in Optical Tweezers. *Annu. Rev. Biochem.*, 77, pp. 205-228.
- Nawaz, S., Sánchez, P., Bodensiek, K., Li, S., Simons, M., & Schaap, I. A. (2012). Cell visco-elasticity measured with AFM and optical trapping at sub-micrometer deformations. *PloS one*, 7(9).
- Ndoye, F., Yousafzai, M. S., Coceano, G., Bonin, S., Scoles, G., Ka, O., . . . Cojoc, D. (2016). The influence of lateral forces on the cell stiffness measurement by optical tweezers vertical indentation. *International Journal of Optomechatronics*, 10(1), 53-62.
- Neuman, K. C., & Block, S. M. (2004). Optical trapping. *Rev Sci Instrum.*, 75(9), 2787–2809.
- Neuman, K. C., & Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 5(6), 491–505. doi:10.1038/nmeth.1218
- Neuman, K. C., Chadd, E. H., Liou, G. F., Bergman, K., & Block, S. M. (1999). Characterization of Photodamage to Escherichia coli in Optical Traps. *Biophysical Journal*, 77, 2856–2863.
- Nikon. (s.d.). Récupéré sur <http://www.nikon.com/products/microscope-solutions/index.htm>
- Ott, D., Nader, S., Reihani, S., & Oddershede, L. B. (2014). Simultaneous three-dimensional tracking of individual signals from multi-trap optical tweezers using fast and accurate photodiode detection. *Opt. Exp.*, 22(19), 23661-72. doi:10.1364/oe.22.023661
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Inte. J. Cancer*, 94, 153-156.
- Pereira, H., Pinder, S. E., Sibbering, M. D., Galea, M. H., Elston, C. W., . . . Ellis, I. O. (1995). Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology*, 27, 219-226.

- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., De Rijn, M. V., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Ross, D. T. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*(406), 747-752.
- Peterman, E. J., van Dijk, M. A., Kapitein, L. C., & Schmidt, C. F. (2003). Extending the bandwidth of optical- tweezers interferometry. *Rev Sci Instrum.* , 74(7), 3246–3249.
- Piggee, C. (2008). Optical tweezers: not just for physicists anymore . *Analytical Chemistry*, 81 , 16–9.
- Pittenger, B., Erina, N., & Su, C. (2010). Quantitative mechanical property mapping at the nanoscale with PeakForce QNM. *Veeco Instrum. Inc.*
- Plodinec, M., Loparic, M., Monnier, C. A., Obermann, E. C., Zanetti-Dallenbach, R., Oertle, P., . . . Schoenenberger, C. A. (2012). The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat. Nanotechnology*, 7, 757–65.
- Popov, V. L. (2010). *Contact Mechanics and Friction: Physical Principles and Applications*, ISBN 978-3-642-10802-0. Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-10803-7
- Pralle, A., Prummer, M., Florin, E. L., Stelzer, E. H., & Horber, J. K. (1999). *Microsc. Res. Tech* , 44, 378–386.
- Rakotomalala, R. (2008). *Comparaison de populations- Tests non paramétriques*. Université Lumière Lyon 2.
- Ramage, L. (2011). Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cell Health Cytoskeleton*, 1.
- Rami-Conde, I., Drasdo, D., Anderson, A. R., & Chaplain, M. A. (2008). *Biophysics J.*, 95, 155-165.
- Ranaweera, A., & Bamieh, B. (2004). Modeling, Identification, and Control of a Spherical Particle Trapped in an Optical Tweezer. *Int. J. Robust Nonlinear Control*, 00, 1-19.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3(1). doi:10.1101/cshperspect.a004978
- Rico, F., Roca-Cusachs, P., Gavara, N., Farré, R., Rotger, M., & Navajas, D. (2005). Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 72(2 Pt 1).
- Rodriguez, M. L., McGarry, P. J., & Sniadecki, N. J. (2013). Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Applied Mechanics Reviews*, 65. doi:10.1115/1.4025355
- Rohrbach, A., & Stelzer, E. H. (2002). Three-dimensional position detection of optically trapped dielectric particles. *J Appl Phys*, 91, 5474–5488.

- Roosen, G. (1979). Optical levitation of spheres. *Can. J. Phys.*, *57*, 1260-1279.
- Roosen, G., & Imbert, C. (1976). Optical levitation by means of 2 horizontal laser beams-theoretical and experimental study. *Physics Lett.*, *59A*, 6-8.
- Sawada, K., Mitra, A. K., Radjabi, A. R., Bhaskar, V., Kistner, E. O., Tretiakova, M., . . . Lengyel, E. (2008). *Cancer Res.*, *68*, 2329–2339.
- Schoen, I., Pruitt, B. L., & Vogel, V. (2013). The Yin-yang of rigidity sensing: how forces and mechanical properties regulate the cellular response to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.*, *43*, pp. 589–618.
- Simmons, R. M., Finer, J. T., Chu, S., & Spudich, J. A. (1996). Quantitative Measurements of Force and Displacement Using an Optical Trap. *Biophysical Journal*, *70*, 1813-1822.
- Sleep, J., Wilson, D., Simmons, R., & Gratzner, W. (1999). Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: An optical tweezers study. *Biophysical Journal*, *77*, 3085–95.
- Sneddon, I. N. (1951). *Fourier Transforms*. McGraw-Hill.
- Sneddon, I. N. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int J Engng Sci*, *3*, 47–57.
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., . . . Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad sci USA*, *100*(14), 8418-8423.
- Sotiriou, C., Neo, S., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., . . . Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad sci USA*, *100* (18), 10393-10398.
- Stossel, T. (1993). On the crawling of animal cells. *Science*, *260*, 1086–1094.
- Sugawara, Y., Ando, R., Kamioka, H., Ishihara, Y., Murshid, S. A., Hashimoto, K., . . . Takano-Yamamoto, T. (2008). The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts. *Bone*, *43*(1), 19–24.
- Suresh, S. (2007). Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia*, *55*, pp. 3989–4014.
- Svoboda, K., & Block, S. M. (1994). Biological application of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, *23*, pp. 247-285.
- Svoboda, K., & Block, S. M. (1994). Optical trapping of metallic Rayleigh particles. *Optics Letters*, *19*, 930–932.

- Tavano, F., Bonin, S., Pinato, G., Stanta, G., & Cojoc, D. (2011). Custom-built optical tweezers for locally probing the viscoelastic properties of cancer cells. *Int J Optomechatronics*, 5, 234–48.
- Tavassoli, F. A., & Devilee, P. (2000). WHO Classification of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press Lyon*.
- Thorlabs. (s.d.). Récupéré sur https://www.thorlabs.com/NewGroupPage9.cfm?ObjectGroup_ID=3959
- Valentine, M. T., Gwydosh, N. R., Gutiérrez-Medina, B., Fehr, A. N., Andreasson, J. O., & Block, S. M. (2008). Precision steering of an optical trap by electro-optic deflection. *Opt. Lett.*, 33, 599–601.
- VanLandingham, M. R. (2003). Review of the instrumented indentation. *J Res Natl Inst Stand Technol*, 108(4), 249-265.
- Venugopalan, G., Camarillo, D. B., Webster, K. D., Reber, C. D., Sethian, J. A., Weaver, V. M., . . . Rycroft, C. H. (2014). Multicellular architecture of malignant breast epithelia influences mechanics. *PLoS One*, 9(8). doi:10.1371/journal.pone.0101955.
- Veronesi, U., Viale, G., Rotmensz, N., & Goldhirsch, A. (2006). Rethinking TNM: Breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research. *The Breast*, 15(1), 3-8.
- Visscher, K., Brakenhoff, G. J., & Krol, J. J. (1993). Micromanipulation by multiple optical traps created by a single fast scanning trap integrated with the bilateral confocal scanning laser microscope. *Cytometry*, 14, 105–114.
- Visscher, K., Gross, S. P., & Block, S. M. (1996). Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2(4), 1066–76.
- Wagner, K. U., & Smith, G. H. (2005). Pregnancy and Stem Cell Behavior. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 10(1), 25–36.
- Wang, N., Butler, J. P., & Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260, 1124–1127.
- Weinberg, R. A. (1996). How Cancer Arises: An explosion of research is uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer—and suggesting new therapies. *Scientific American* September 1996, Copyright 1996, . *Scientific American, Inc.*
- Weinstein, I. B., & Joe, A. K. (2006). Mechanisms of disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 3, 448–57.
- Wen, Q., & Janmey, P. A. (2013). Effects of non-linearity on cell–ECM interactions. *Exp. Cell Res.*, 319(16), 2481–2489.

- WHO. (2011). *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010*. Geneva.
- Wirtz, D., Konstantopoulos, K., & Searson, P. C. (2011). The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. . *Nat. Rev. Cancer* , 11, 512–522.
- Woerdemann, M., Holtmann, F., & Denz, C. (2009). Holographic phase contrast for dynamic multiple-beam optical tweezers. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.*, 11 .
- Yousafzai, M. S., Ndoye, F., Coceano, G., Niemela, J., Bonin, S., Scoles, G., & Cojoc, D. (2016). Substrate dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation. *Optics and Lasers in Engineering*, 76, 27–33.
- Zhang, H., & Liu, K. (2008). Optical tweezers for single cells . *J. R. Soc. Interface*, 5, 671–690. doi:10.1098/rsif.2008.0052

ANNEXES

A - INSTRUMENTS VIRTUELS DE LABVIEW

Les paragraphes suivants présentent les instruments virtuels (IV) utilisés pour l'acquisition et l'analyse des données, en utilisant le logiciel LabView.

A-1 Acquisition de données du mouvement brownien

La Figure A.1 montre les instruments virtuels (VI) utilisés lors des expériences pour acquérir les positions des particules en mouvement brownien en utilisant la carte d'acquisition de données (DAQ); pour les calculs basés sur les méthodes d'équipartition et de densité spectrale de puissance. Les trois canaux de sortie de tension analogique provenant de la photodiode à quatre quadrants sont échantillonnés, ce qui correspond aux positions x, y, z du piège. Les données brutes de sortie seront ensuite enregistrées dans des fichiers tex.

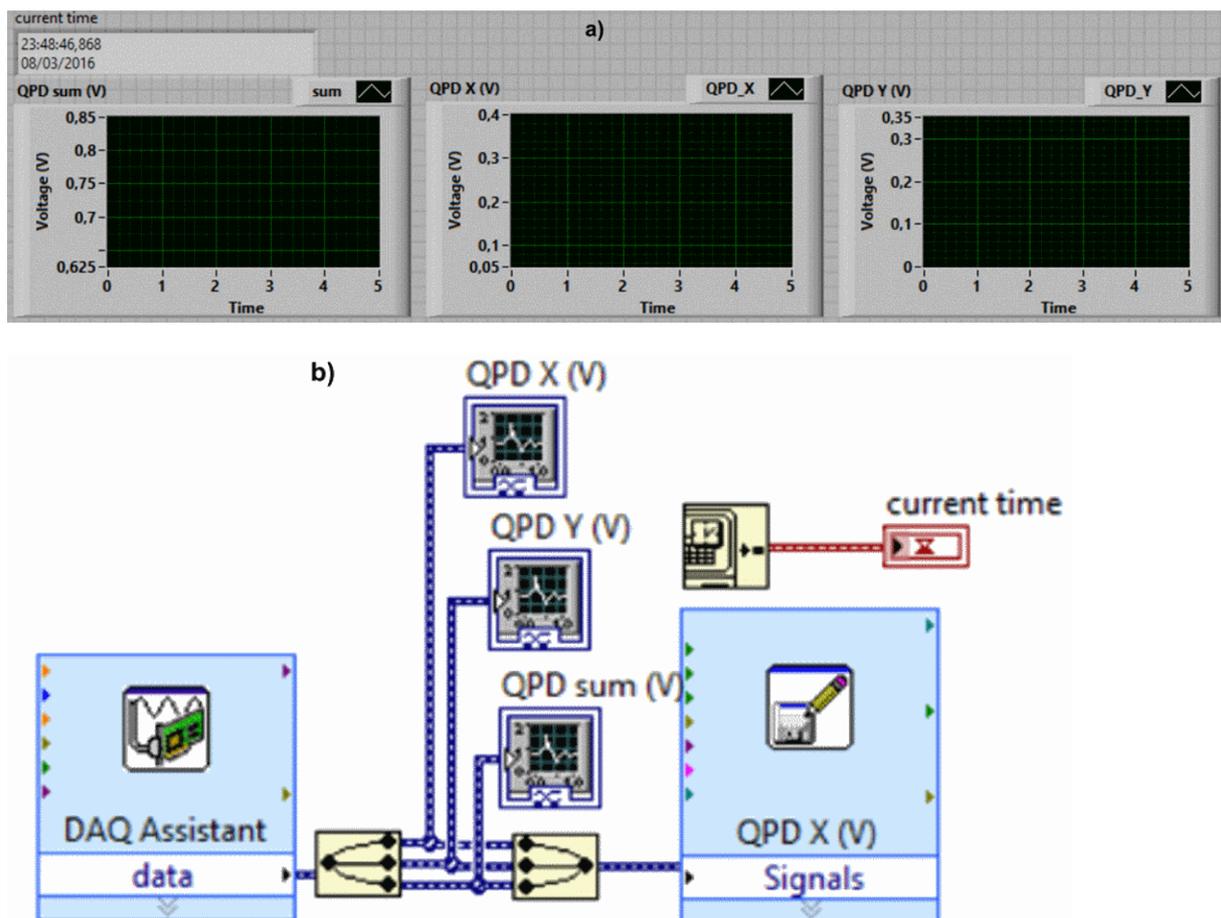


Figure A.1 - Programme Labview pour l'acquisition des fluctuations de la position des particules piégées, suivant x, y et z durant l'expérience. a) Panneau avant ; b) diagramme.

A-2 Mesure de la rigidité du piège en utilisant la méthode d'équipartition

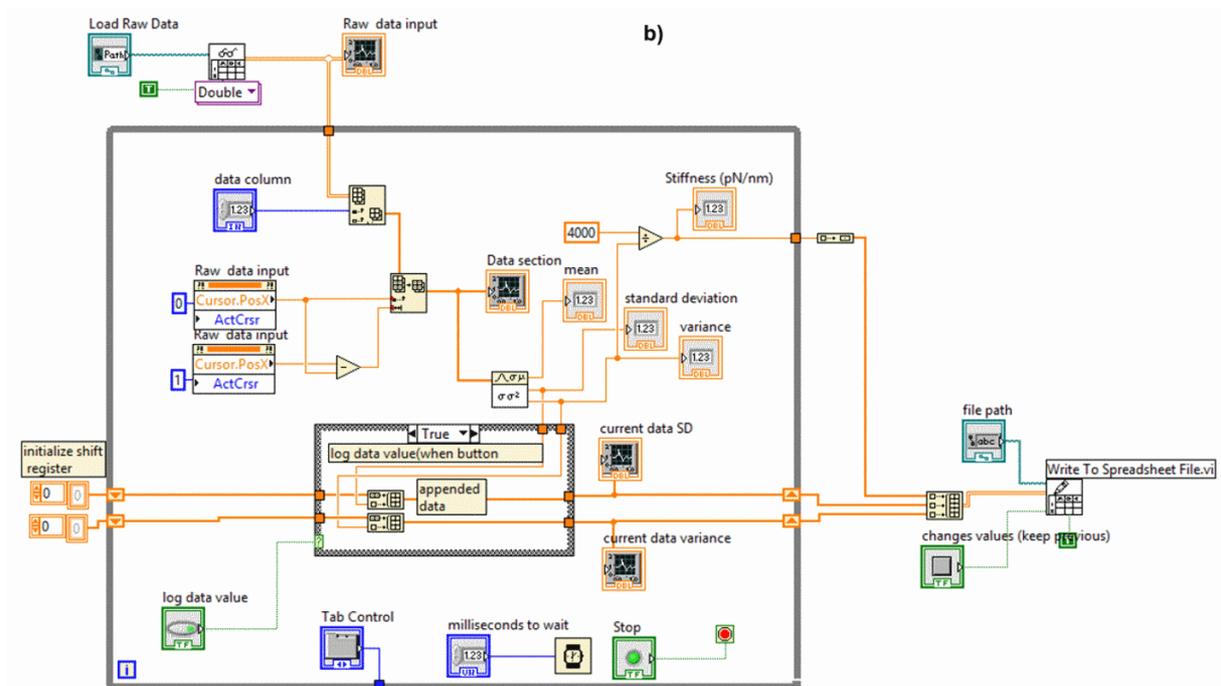
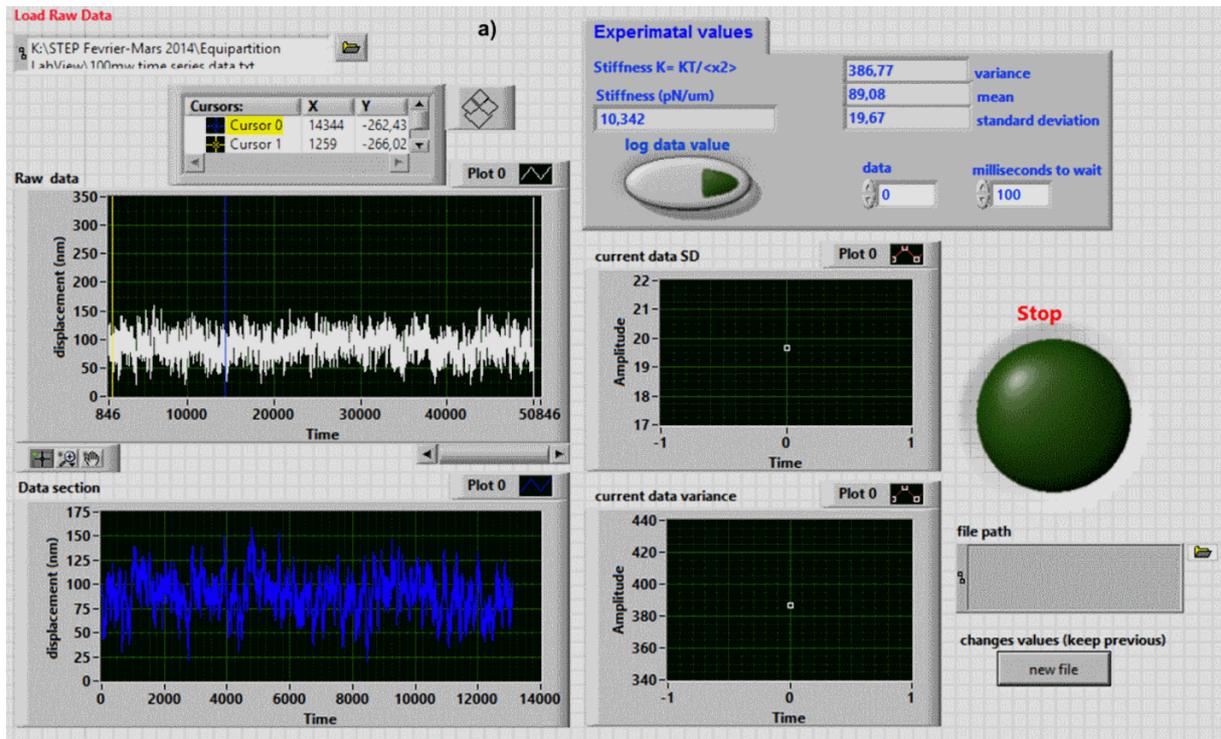


Figure A.2 - Programme LabView utilisé dans l'analyse hors-ligne pour le calcul de la rigidité du piège. a) Panneau avant ; b) diagramme.

La Figure A.2 montre le VI utilisé pour calculer la rigidité du piège par la méthode d'équipartition. Dans cet exemple, les données ont été échantillonnées avec une fréquence de 10 kHz et recueillies pendant 5 secondes au cours de l'expérience. En chargeant, à partir d'un fichier texte, les données brutes acquises (Annexe A.1) pour les positions de la particule piégée en mouvement brownien, les trois composantes de la rigidité du piège peuvent être calculées.

A-3 Acquisition de données pour un signal sinusoïdal généré

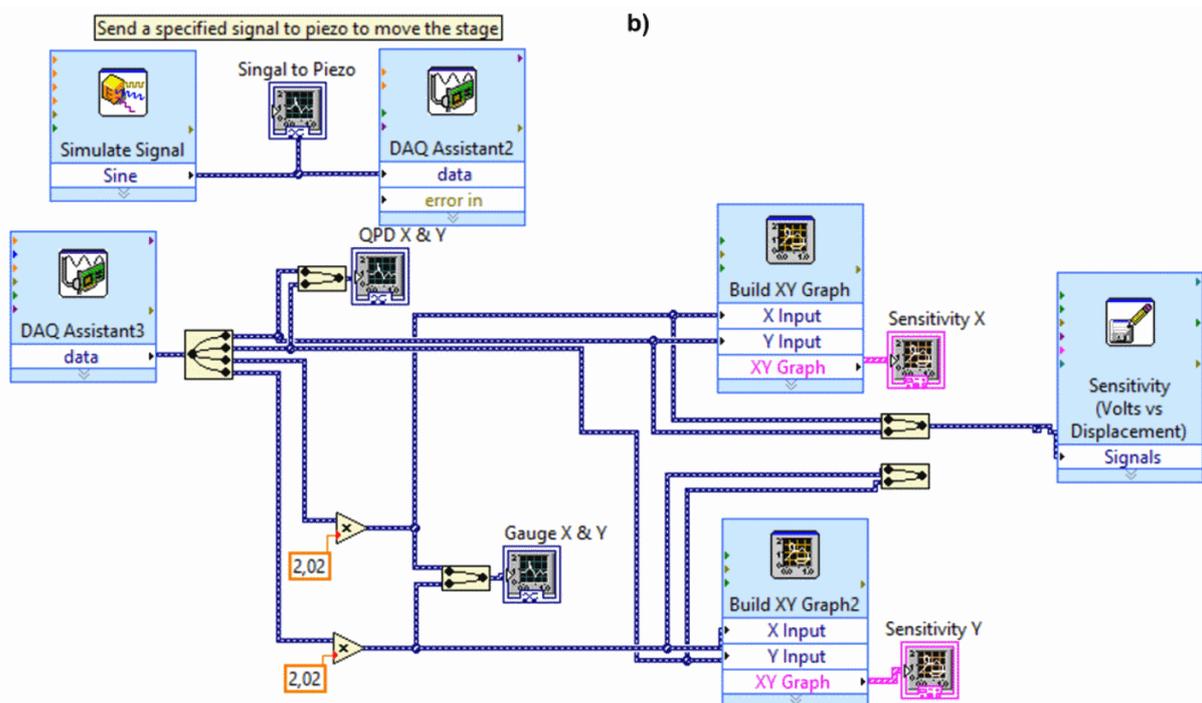
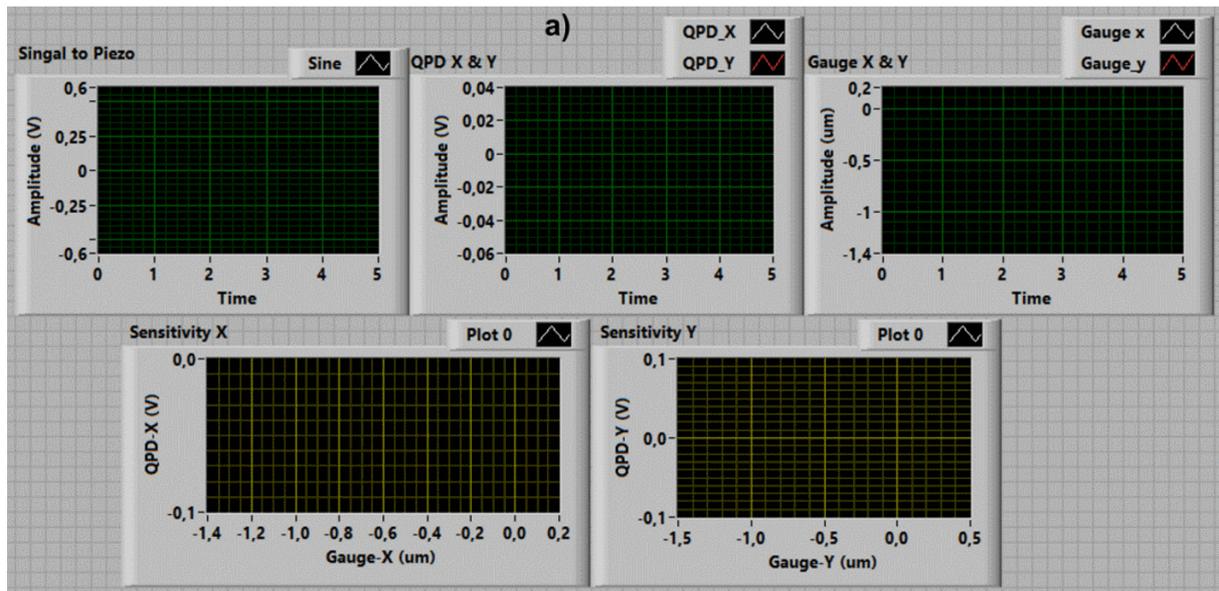


Figure A.3 - Programme LabView d'acquisition de données pour le calcul de la sensibilité. a) Panneau avant ; b) diagramme.

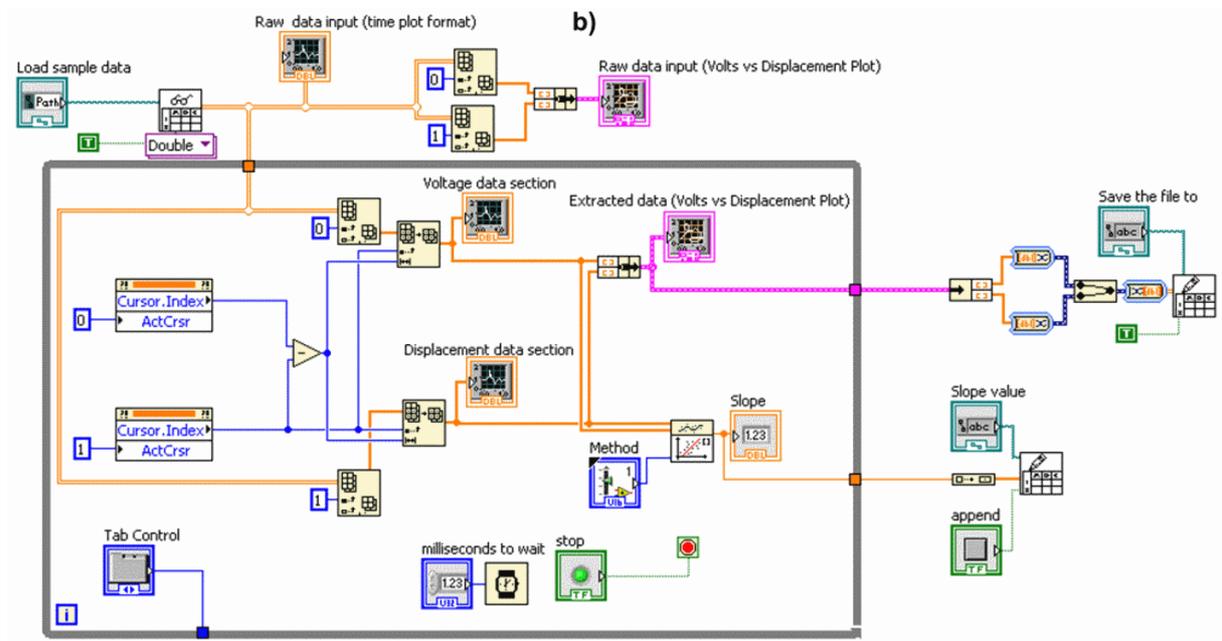
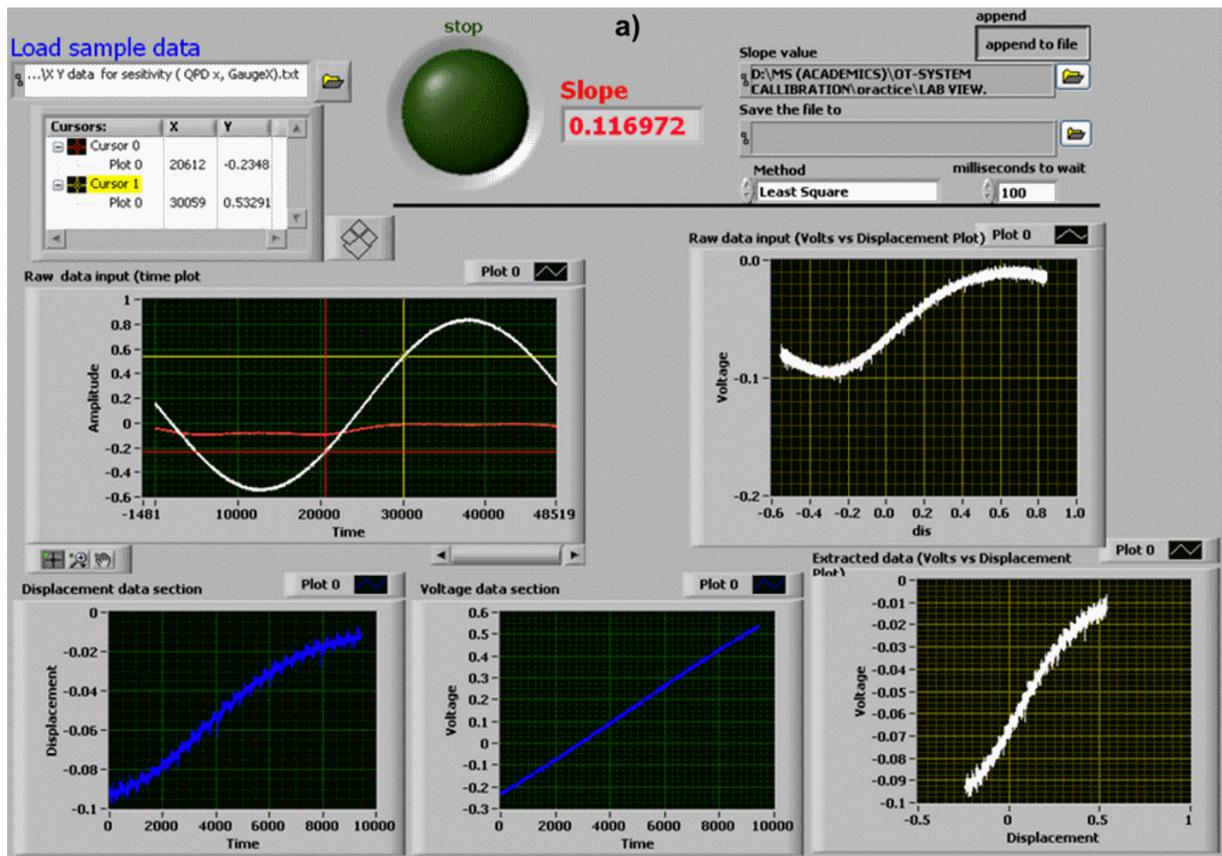


Figure A.4 - Programme LabView utilisé hors ligne pour le calcul de la sensibilité par extraction d'une région linéaire dans la réponse du détecteur. a) Panneau avant ; b) schéma de principe.

La Figure A.3 montre le VI utilisé pour générer un signal sinusoïdal afin de déplacer le moteur piézoélectrique. Il permet de mesurer à la fois son signal de position calibrée depuis la jauge et les déplacements relatifs de la particule, en utilisant la DAQ.

La DAQ a été définie pour déplacer le moteur piézoélectrique avec un signal de sortie sinusoïdal d'amplitude $A = 0,5 \mu\text{m}$ et de fréquence $f = 0,2 \text{ Hz}$ pendant l'expérience. Le signal de la jauge et les trois voies de tension analogiques provenant de la photodiode à quadrants (ce qui correspond aux positions x, y, z) ont ensuite été échantillonnés. Les données brutes de sortie sont ensuite enregistrées dans des fichiers tex.

A-4 Mesure de la sensibilité

La Figure A.4 montre le VI utilisé pour calculer la sensibilité. Dans cet exemple, les données ont été échantillonnées avec une fréquence de 10 kHz. Ainsi, en chargeant, à partir d'un fichier texte, les données brutes acquises (Annexe A.3), la sensibilité peut être dérivée simultanément.

**B - CODE MATLAB POUR MESURER LA
RIGIDITE DU PIEGE EN UTILISANT LA
METHODE DE LA DENSITE SPECTRALE DE
PUISSANCE**

La densité spectrale de puissance est mesurée à partir des données brutes recueillies des positions de la particule dans le piège. Un ajustement lorentzien de la densité spectrale de puissance peut ensuite être choisi avec précision. La rigidité du piège est alors déduite, automatiquement, en mesurant la fréquence de coupure du piège depuis cet ajustement. Le paragraphe suivant montre le programme Matlab développé ainsi que les étapes à suivre pour mesurer la rigidité du piège par l'analyse de la densité spectrale de puissance.

→Charger, à partir d'un fichier texte, les données brutes et définir la fréquence d'échantillonnage

```
[FILENAME,  PATHNAME] = uigetfile('*.txt', 'Load File
.txt');
if (FILENAME == 0)
    disp('File not selected. Please select a valid file. ');
    return; end
filename = fullfile(PATHNAME,
FILENAME); trace=load(filename); numberOfTraces=size (trace,2)
sf= input ('Input the sampling frequency in KHz ');
samplingFreq=sf*1000
```

→Allouer la variable de déplacement (x) et calculer la densité spectrale de puissance

```
x=trace(1:end,1); [psdXvals,f]=pwelch
(x,[],[],2^20,samplingFreq);
```

→ Tracer la courbe de la densité spectrale de puissance

```
figure
hold on; plot (f,psdXvals,'k'); set(gca, 'xscale',
'log','yscale', 'log')
xlabel ('Hz'), ylabel ('V^2/Hz')
```

→ Définir les constantes

```
T= input ('Input Temperature in K ambient is 297 (23.5 C)
physiologic 310 (36.5 C): ');
if isempty(T); T=310; end; d= input ('bead diameter in
microns ');
```

```

    if isempty(T); d=1;end; r=(d/2)*10^-6; hi= input('height of
the trap in um: ');
    if isempty(T); hi=10;end; h=hi*10^-6; rh=r/h;
Kb=1.3806505*10^-23;

```

→Corrections hydrodynamiques

```

numaratoreta=1.3272*(292.15-T)-0.001053*(T-292.15)^2;
numitoreta=T-167.15; lg=log10(1.003*10^-3);
ex=numaratoreta/numitoreta + lg; eta=10^(ex);
numaratorbeta=6*pi*eta*r;
numitorbeta=1 - 9/16*rh + 1/8*rh^3 - 45/256*rh^4 -
1/16*rh^5;
beta= numaratorbeta/numitorbeta;

```

→Ajustement par une Lorentzienne de la densité spectrale de puissance et calcul de la rigidité κ du piège

```

hold on,
axisTOfit=f; Loren=[]; n=0;
while n < 99; display('choose plateau and corner value
graphically '); b=ginput(2); plat=b(1,2); Fc=b(2,1); n=n+1;
Loren(n,:)=(plat*Fc^2)/(Fc.^2+axisTOfit.^2);
colore =
'bgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgkbgk';
plot (f,Loren(n,:),colore(n)); k =2*pi*beta*Fc*10^3;
reply = input('Is the fit OK ? (y/n): ', 's'); if
strcmp(reply,'y'); disp(reply); n=100; k
end; end;
hold off

```


C - PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Investigation into local cell mechanics by atomic force microscopy mapping and optical tweezer vertical indentation

G Coceano^{1,2}, M S Yousafzai^{1,2,3}, W Ma⁴, F Ndoye^{5,6}, L Venturelli^{1,2,3},
I Hussain⁴, S Bonin⁷, J Niemela⁵, G Scoles³, D Cojoc¹ and E Ferrari⁴

¹ CNR-IOM National Research Council—Institute of Materials, Area Science Park, Basovizza, S.S. 14, Km 163.5, 34149 Trieste, Italy

² Università degli studi di Trieste, Piazzale Europa 1, 34128 Trieste, Italy

³ Dipartimento di Scienze Mediche e Biologiche, Università degli Studi di Udine, Piazzale Kolbe 4, 33100 Udine, Italy

⁴ University of Lincoln, Joseph Banks Laboratories, Green Lane, LN6 7DL Lincoln, UK

⁵ Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics (ICTP), Strada Costiera 11, 34149 Trieste, Italy

⁶ Université Cheikh Anta Diop Dakar 5005, Senegal

⁷ Dipartimento di Scienze Mediche Chirurgiche e della Salute, Università degli Studi di Trieste, Strada di Fiume 447, Ospedale di Cattinara, 34149 Trieste, Italy

E-mail: cojoc@iom.cnr.it and eferrari@lincoln.ac.uk

Received 20 June 2015, revised 12 November 2015

Accepted for publication 26 November 2015

Published 18 December 2015



CrossMark

Abstract

Investigating the mechanical properties of cells could reveal a potential source of label-free markers of cancer progression, based on measurable viscoelastic parameters. The Young's modulus has proved to be the most thoroughly studied so far, however, even for the same cell type, the elastic modulus reported in different studies spans a wide range of values, mainly due to the application of different experimental conditions. This complicates the reliable use of elasticity for the mechanical phenotyping of cells. Here we combine two complementary techniques, atomic force microscopy (AFM) and optical tweezer microscopy (OTM), providing a comprehensive mechanical comparison of three human breast cell lines: normal myoepithelial (HBL-100), luminal breast cancer (MCF-7) and basal breast cancer (MDA-MB-231) cells. The elastic modulus was measured locally by AFM and OTM on single cells, using similar indentation approaches but different measurement parameters. Peak force tapping AFM was employed at nanonewton forces and high loading rates to draw a viscoelastic map of each cell and the results indicated that the region on top of the nucleus provided the most meaningful results. OTM was employed at those locations at piconewton forces and low loading rates, to measure the elastic modulus in a real elastic regime and rule out the contribution of viscous forces typical of AFM. When measured by either AFM or OTM, the cell lines' elasticity trend was similar for the aggressive MDA-MB-231 cells, which were found to be significantly softer than the other two cell types in both measurements. However, when comparing HBL-100 and MCF-7 cells, we found significant differences only when using OTM.

 Online supplementary data available from stacks.iop.org/NANO/27/065102/mmedia

Keywords: cell bio-mechanics, breast cancer, atomic force microscopy, optical tweezers

(Some figures may appear in colour only in the online journal)

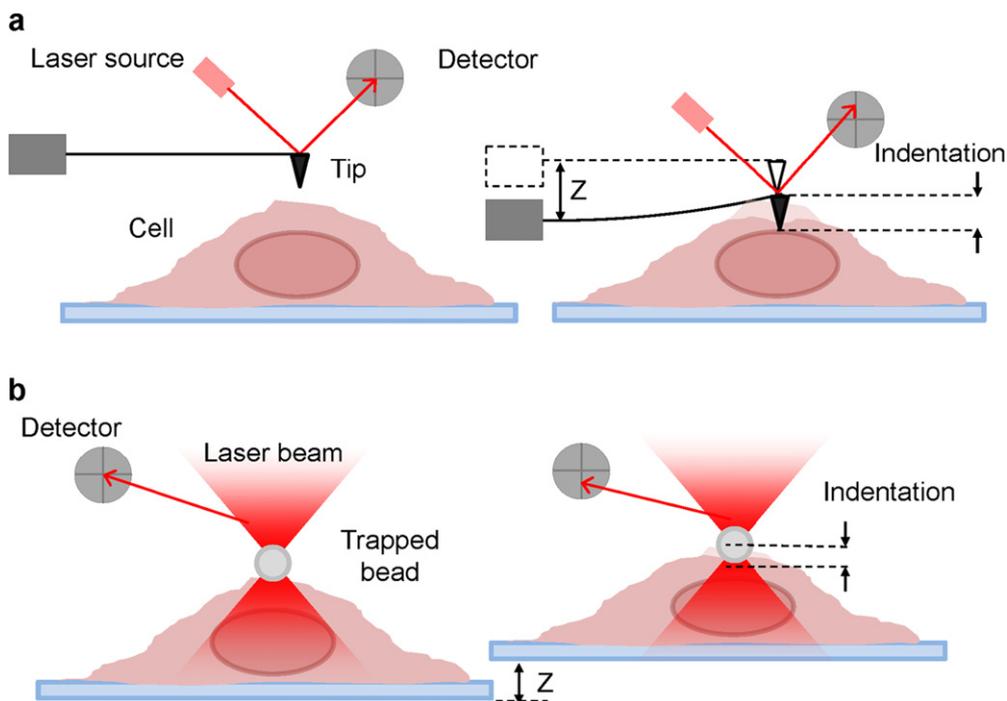


Figure 1. Vertical indentation of living cells. (a) In AFM, a cantilever driven by a piezoelectric actuator moves vertically along the Z -axis. As the tip contacts the cell, the cantilever is deflected and the change in the laser reflection angle is recorded by a quadrant photo detector (QPD). The indentation region corresponds to the part of the vertical displacement for which a deflection of the cantilever can be observed. (b) In OTM, a laser-trapped bead is kept in a fixed position just above the cell while the piezoelectric stage holding the sample moves vertically. As the cell approaches and contacts the bead, this is displaced from the centre of the trap and the change in the interference pattern produced by the laser scattered by the bead is recorded by a QPD. The indentation region is defined as the portion of vertical displacement of the stage for which a displacement of the bead from the trap can be observed.

Introduction

Cancer is a multifactorial disease and there is a general consensus in identifying the hallmarks that better describe the onset and progression of the disease [1, 2]. However, recently, attention has been focussed on extra factors that characterise cancer; the mechanical changes that the tumour cells acquire and induce in the surrounding microenvironment [3–6]. While this aspect is especially evident at the tissue invasion and metastasis stage, the overall change in the mechanical properties of a tissue starts much earlier, involving several physiological processes that, by altering the membrane and cytoskeleton structure, convert a malignant cell into a metastatic one [5, 7]. It is known that cancer cells are softer and hence more deformable than nontumour cells [8–10] and this eventually leads to their increased ability to infiltrate the tissues, spread from the primary tumour site and establish secondary sites [11].

Metastasis is the most common cause of death in breast cancer patients. In females, breast cancer is the most frequent tumour [12]. Therefore a thorough characterization of the mechanical properties of breast cancer cells would be beneficial in the understanding of the underlying molecular events that lead to metastasis [13] and could provide potential label-free markers based on mechanical measurements rather than molecular diagnostics [14].

Automated instruments capable of screening the elasticity of patients' tissues in a high-throughput fashion are still

not available [15], however the community studying bio-mechanics at the single-cell level would typically benefit, among others, from two robust biophysical techniques that have been developed and improved for a few decades: atomic force microscopy (AFM) and optical tweezers microscopy (OTM).

AFM allows the imaging of living cells at high resolution in a liquid environment. An oscillating cantilever, driven by a piezoelectric actuator, indents the specimen along the Z vertical axis through a conical or spherical-shaped tip, mounted at the end of the cantilever (figure 1(a)). While oscillating along Z , the piezoelectric XY actuators perform a raster scan of the sample, typically covering all the area occupied by a single cell. During the raster scan, the feedback loop system of the instrument collects the laser light reflected by the deflected cantilever on a four quadrant photodetector and uses the voltage readouts to feed the Z piezoelectric actuator, correct the vertical position and generate a topographic image of the sample. Simultaneously, the instrument can convert the voltage signal acquired during each indentation event into displacement/force curves, from which several mechanical properties, including elasticity, can be calculated, upon calibration of the detection system and the stiffness of the probe [16, 17].

Although AFM is not a high-throughput imaging technique, due to the mechanical nature of the interaction with the sample, it offers the unique opportunity to measure and map the local elasticity of a sample at high spatial resolution. For

this reason, the technique has been extensively applied to the study of cancer cell biomechanics [18, 19]. The acquisition of robust datasets and the interpretation of the elasticity maps are often complicated by the fact that the mechanical interaction with soft samples, such as living cells, can lead to membrane damage during the indentation, due to the sharpness of the tip (required for a high resolution image) and to the intensity of the force applied (typically in the nN range). Besides this, the loading rate (the rate at which the force is vertically applied to the sample during the indentation) has to be relatively high to allow the acquisition of a representative area of the sample within a realistic time and before the living cell under investigation changes position or starts showing signs of distress beyond the control of the operator. To overcome these limitations and avoid cell damage, we opted to operate the AFM *Z* piezoelectric actuator with a sinusoidal waveform in peak force tapping mode (see Methods) [20].

At high loading rates, cells tend to also respond to indentation with a viscous component, which instead would be the only contribution when indenting at low loading rates [21–23]. Using OTM rather than AFM limits the loading rate and the indentation force, thus reducing the likelihood of rupture of the membranes and viscous responses to indentation. OTM relies on a spherical microprobe trapped by a highly focused laser beam. The displacement of the probe from the focus of the beam is linearly related to the external force by a constant, the trap stiffness. Since the probe confinement is nonmechanical and the stiffness of the trap is typically very low and easy to fine tune, OTM probing is much more ‘gentle’ than AFM. Indentation using an OTM trapped microbead (figure 1(b)) is achieved either by moving the trapping objective vertically [21] or by keeping the position of the laser focus fixed while the stage, where the cell-containing dish is clamped, approaches the bead by using a piezoelectric actuator along the *Z* vertical axis [23]. As soon as the cell membrane touches the microbead, this is displaced vertically, undergoing a force proportional to its displacement. The displacement of the probe is measured from the change of the interference pattern produced by the scattered laser beam by the microbead on a photodiode [21] or a quadrant photodetector [23]. Similarly to the case of the AFM, this signal can be converted into a displacement/force curve.

In contrast to AFM, OTM acquires curves only from single points rather than mapping the curves on a topographic image. This limitation is due to the large size of the probe, which wouldn’t allow high resolution mapping, and especially to the low frequency at which the probe oscillates (in this study it was 0.2 Hz, compared to 0.25–0.5 kHz for the AFM), making the technique extremely time consuming. Nevertheless, because of the high accuracy that OTM-obtained mechanical data can offer at low forces and the virtually ideal elastic conditions in which they can be acquired, OTM has been used extensively to characterise local mechanical properties of cells [24–27].

Using AFM and OTM vertical indentation we investigated locally the cell stiffness for three breast cancer cell lines: the basal breast cancer cell line (MDA-MB-231),

luminal breast cancer cells (MCF-7) and normal myoepithelial cells (HBL-100). Peak force tapping AFM allowed us to extract the viscoelastic map of the cell and define the region on the top of the nucleus as the most appropriate for reliable measurement. The cell indentation scheme used by AFM and OTM was similar, but the indentation forces and the loading rates were very different between AFM and OTM. This allowed us to observe the cell response under different mechanical regimes. The results in terms of cell stiffness were similar for the MDA-MB-231 cell line, showing that these cells have the lowest stiffness. However, HBL-100 and MCF-7 showed different behaviors when analyzed by AFM and OTM.

Methods

Cell cultures

MDA-MB-231, MCF-7 and HBL-100 cell lines (ATCC numbers HTB-26, HTB-22, and HTB-124, respectively) were cultured in adhesion using low glucose Dulbecco’s modified Eagle medium (DMEM) with L-glutamine (MDA-MB-231 and MCF-7) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with L-glutamine (HBL-100), all supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 50 IU ml⁻¹ of penicillin-streptomycin and 1 mM gentamycin. Cell cultures were maintained in 25 cm² flasks at 37 °C in 5% CO₂. Cell splitting was performed every 2–3 days, as soon as the cultures reached the confluence, using 1:10 diluted 0.05% trypsin-EDTA. Cells were seeded overnight on 60 mm polystyrene (AFM) or 30 mm glass-bottomed (OTM) Petri dishes at a density of 5 × 10⁵ (AFM) or 2.5 × 10⁵ (OTM) cells/ml in 6 ml (AFM) or 2 ml (OTM) of medium, washed three times in PBS and rinsed with medium prior to each measurement session. All the reagents for cell culture were purchased from Gibco Life Technology, and the cell culture flasks and petri dishes were purchased from Sigma-Aldrich.

Atomic force microscopy

AFM imaging and indentation were performed on a BioScope Catalyst controlled by a NanoScope V controller (Bruker), combined with an Eclipse TE2000-S inverted optical microscope (Nikon) and equipped with a digital temperature controller unit (Lakeshore) to keep the cultured cells at 37 °C during the acquisition of data. Images were acquired in peak force quantitative nanomechanical mapping (PFQNM) mode [20] using DNP-10-A or ScanAsyst fluid probes (Bruker), whose deflection sensitivity was determined by forcing their deflection on a glass surface, and the spring constant (*k*) was estimated by the thermal tuning method (DNP-10-A nominal *k* = 0.35 N m⁻¹, ScanAsyst fluid nominal *k* = 0.7 N m⁻¹). The nominal radius for tip and angles (the same for both probe types), respectively 20 nm and 15° (front)/25° (back)/17.5° (side), were used by the Nanoscope 9.0 software (Bruker) to compute the elastic modulus while scanning the images, using the Sneddon model for a conical indenter [28].

128 × 128 or 256 × 256 point PFQNM images were acquired with a scan rate of 0.1–0.2 Hz, a scan size of about 60 μm (or the closest size that could accommodate the entire cell body), a tapping amplitude of 750 nm, a frequency of 0.25–0.5 kHz and a peak force set point of 1–2 nN to avoid damaging the cell membranes while scanning. For each cell imaged, along with force/indentation curves for individual points, we recorded and analysed, using NanoScope Analysis 1.5 (Bruker), the following PFQNM channels: height, peak force, peak force error, adhesion, deformation, dissipation and Young's modulus.

Optical tweezer microscopy

A modular OTM (Thorlabs—OKBT) was adapted for axial cell indentation and force measurement [29]. Briefly, a collimated laser beam (YLM-5-IPG Photonics—Yb fiber laser 1064 nm) was focused through a 100x objective (Nikon, NA = 1.25, oil immersion), to produce a stable optical trap for 3 μm diameter silica microbeads (Bangs Laboratories) dispersed in the medium. During data acquisition, the cells were kept at 37 °C by a temperature controller unit (RS Components) integrated into the setup. The sample was imaged through the trapping objective and a tube lens by a CMOS camera (Thorlabs—DCC1240C). A microbead probe was individually trapped and positioned above the cell nucleus area of a selected cell using a piezoelectric NanoMax three-axis flexure stage (Thorlabs). The position of the microbead in the trap was tracked by the back focal plane interferometry method [30] using the laser light scattered by the trapped bead. The trap height was in the range of 3–6 μm from the cover slip. The trap stiffness was calculated using the equipartition theorem and the power spectrum density methods considering the stiffness variations due to spherical aberrations and the neighbourhood of the cover slip [23]. Adjusting the laser power, trap stiffness was set to 0.015 pN nm⁻¹. To indent the cell, the stage on which the sample was clamped was moved vertically following a sinusoidal wave of 1 μm amplitude and 0.2 Hz frequency, while the laser focus was kept at a fixed position. The cell intercepted and interacted with the microbead in the second half of the sine period, thus causing a vertical displacement of the microbead with a proportional force (see figure S1).

Results and discussion

First, we used AFM to image representative cells from the three cultured lines, for the purpose of optimizing the parameters of the PFQNM while preserving the integrity and morphology of the cells. Figure 2 shows that the cells are not damaged during the measurements. Besides the morphological information given by the peak force error channel, the PFQNM technique simultaneously provided the peak force, Young's modulus, deformation, adhesion and dissipation maps (see figures S2 and S3).

The Young's modulus (E) was mapped and calculated from the force (F)/indentation (δ) data acquired by AFM and

automatically computed by the PFQNM package (Bruker) using the Sneddon model for a conical indenter (the tip) described by equation (1) [28].

$$E = \frac{\pi}{2} \frac{(1 - \nu^2)}{\delta^2 \tan \alpha} F \quad (1)$$

where ν is the Poisson ratio (0.4) and α the tip half angle (18°).

The OTM force (F)/indentation (δ) curves were analysed using a custom made Matlab (Mathworks) code and the computed Young's modulus was obtained, according to the Hertz model for a spherical indenter (the microbead), from equation (2) [21].

$$E = \frac{3}{4} \frac{(1 - \nu^2)}{\delta \sqrt{r} \cdot \delta} F \quad (2)$$

where r is the microbead radius (1.5 μm).

Figure 3 shows representative experimental curves of force versus probe-sample separation, obtained during the interaction of the cell with the tip in AFM and the bead in OTM. Cell-probe interaction includes two phases: indentation (black trace in figure 3) and retraction (red trace). The difference between the indentation and retraction curves in figure 3(a) indicates dissipation due to viscoelastic behaviour of the cell at forces and loading rates specific to AFM. The indentation and retraction curves for OTM are instead almost identical (figure 3(b)), indicating that the cell response to lower forces is entirely elastic. While the elasticity data from the OTM analysis were the result of a Hertz fit (equation (2)) on an individual indentation event, the elastic modulus from AFM measurements was computed automatically by the acquisition software using a Sneddon fit (equation (1)) like the one shown in figure 3(a), for each point of the image, and then averaged within a 2.5 × 2.5 μm square.

Besides the Young's modulus, in AFM-PFQNM we also analysed other mechanical properties. The deformation channel was monitored to set indentations at about 200 nm, sufficient for acquiring good elasticity data without damaging the cell membrane. The adhesion channel was also considered and used to rule out unusual adhesion values, that could have been the result of the formation of membrane tethers. The dissipation was considered to evaluate whether some areas of a cell were presenting a viscous behaviour that accounted for the loss of energy while indenting. To match all the conditions above, we established the optimal peak force set point in the range of 1–2 nN and we consistently used this range for all the experiments on all three cell lines.

We then analysed the distribution of the Young's modulus (Sneddon fit) on different areas of a representative AFM-imaged HBL-100 cell (figure 4). Data from the Young's modulus channel were averaged over small squares (2.5 × 2.5 μm). The first square (labelled '1' in figure 4(a)) was located above the nuclear area and another five squares were located at increasing distances, between the nuclear area and the leading edge of the cell. As evidenced by the data plotted in figure 4(b) and the corresponding values reported in

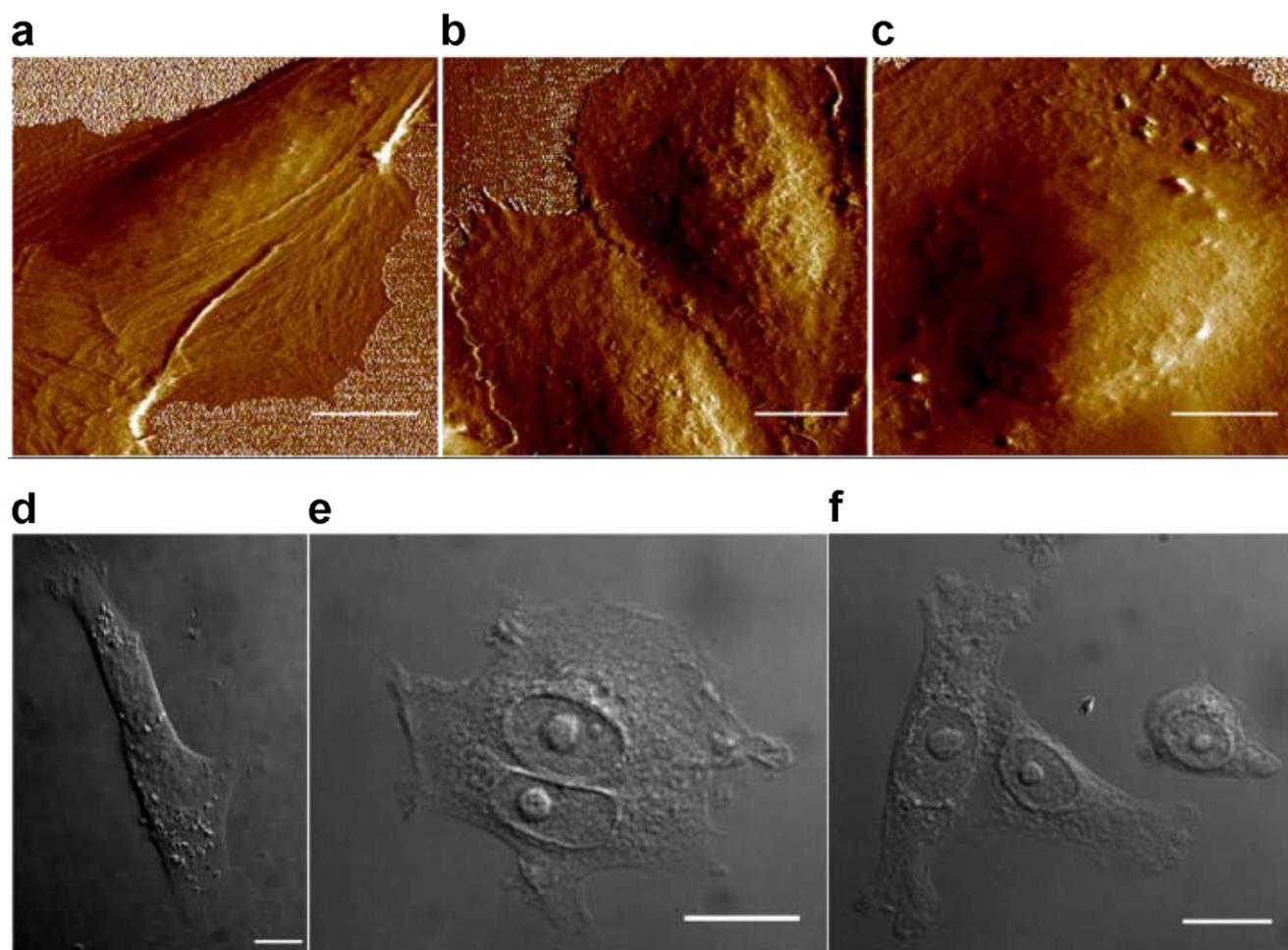


Figure 2. Morphology of the cells. The upper panels show AFM peak force error images of representative cells from the three cell lines analysed and the lower panels show DIC 90 \times optical images of cells from the same cultures: HBL-100 (a), (d), MCF-7 (b), (e) and MDA-MB-231 (c), (f). All scalebars are 10 μm . The peak force error channel output was chosen here to highlight the fine features in the images.

table 1, the Young's modulus decreases with the distance from the nuclear area.

It is known that, due to the conical shape of the tip, the actual values of the Young's modulus at the periphery of the cells are overestimated [31]. Using the bottom effect cone correction, we found an overestimation of up to 30% at the periphery, where the cell height is less than 1 μm (see table S1). Note that the square labelled '6' in figure 4(a) was deliberately chosen to be on the very edge of the cell to emphasise that the proximity of the substrate on which the cell adheres makes the elasticity measurement impractical. In fact, when the cell height is extremely low, the tip interacts with the substrate rather than the cell, making its deformation irrelevant in this area (see deformation maps in figure S3).

The trend of the elasticity modulus over the cell was examined for 22–30 individual cells of all three cell lines, by measuring the Young's modulus in three locations corresponding to the regions labeled '1' (nucleus), '3' (intermediate) and '5' (leading edge) on the representative HBL-100 cell shown in figure 4. As one can see from table 2 and the barchart of figure 5, the Young's modulus decreases with the distance from the nucleus for all three cell lines. These results

confirm previous microrheology studies which have demonstrated a higher viscoelastic modulus for the nucleoplasm relative to cytoplasm, arising primarily due to the heterogeneous chromatin organization [32–34]. Altogether these findings suggest that the area on the top of the nucleus, where the Young's modulus is maximum, is the most meaningful for cell mechanics characterization.

Elasticity measurements on the top of the nucleus were also systematically carried out by OTM, on 22–32 single cells of each of the three cell lines. Nevertheless, we also verified that the Young's modulus was lower outside of the nuclear region, measuring it at two–three points, arbitrarily chosen between the nuclear area and the leading edge, for ten cells of each cell line (data not shown). A typical image of a trapped bead positioned on the nucleus area of the cell for subsequent indentation is shown in figure 6.

The Young's modulus values obtained by OTM (table 3 and figure 7(b)) were several orders of magnitude lower than the AFM measurements on the same type of cells. This is due to differences in the indentation regimes used by OTM and AFM. Parameters such as the loading rate, indentation force, and probe stiffness, are all known to affect the measured

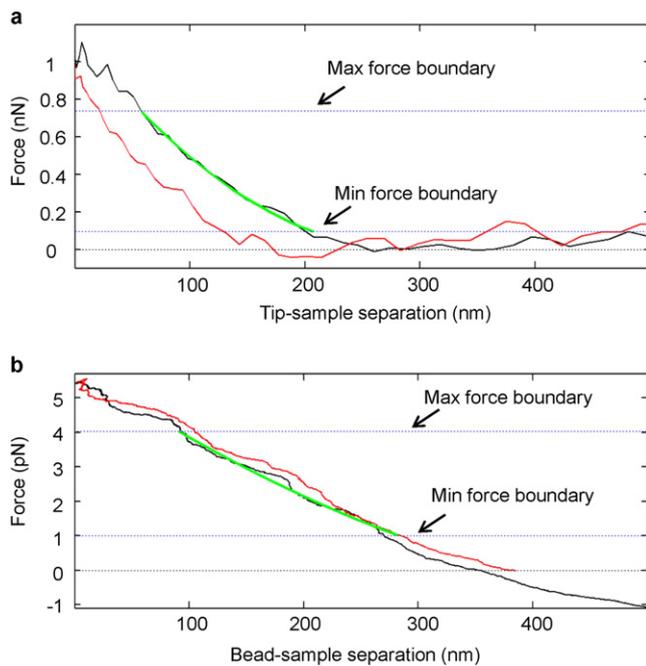


Figure 3. Force-separation curves of a representative indentation event on an MDA-MB-231 cell using AFM (a) and OTM (b). The plots show the indentation (black), retraction (red) experimental traces and the fitted curves (green) used to calculate the Young's modulus. A Sneddon fit was used for AFM indentation (a) and a Hertz fit for OTM (b). The fit is applied in a range of forces within min and max force boundaries.

value of Young's modulus [35, 36]. The low loading rate employed by OTM is a consequence of the lower forces exerted, but also of the low frequency at which the indenting oscillation happens (0.2 Hz compared to the 0.25–0.5 kHz of the AFM tapping).

To compare the Young's modulus of the three different cell lines on the area of the nucleus by using both AFM and OTM, we summarised the data collected in table 3 and graphically represented them in figure 7. The differences between the cell lines were calculated using the two tailed Mann–Whitney test (Minitab Statistical Software version 17). Although the mean values of the elastic modulus measured by OTM were always much lower than the ones obtained by AFM indentation, the cell lines comparison showed the same important result: the basal breast cancer cell line MDA-MB-231 had a significantly lower Young's modulus than the other two, regardless of the technique and loading rate applied for the measurement. However, AFM and OTM gave different results when comparing the HBL-100 and MCF-7 cell lines. The difference between the elastic modulus of the HBL-100 and MCF-7 cell lines is not statistically significant ($p = 0.5$) when measured by AFM but the elasticity of MCF-7 becomes significantly higher than HBL-100 ($p < 0.05$) when measured by OTM. The discrepancy in the estimation of the cell type-specific elasticity when measured by AFM and OTM might be due to the fact that AFM force regimes are prone to originating inelastic responses. Therefore the measurements and the resulting statistics reported in table 3 and figure 7 for OTM, might be more accurate than AFM, where viscous

Table 1. Young's modulus measured at different distances from the cell nucleus of an HBL-100 cell. The Young's modulus is expressed as the mean \pm the standard deviation (SD) of the values included in the relevant squares of figure 4(a) (10×10 measuring points). As explained in the text, the value for position 6, 25 μm away from the nucleus, is not measurable.

Position in figure 4	Distance from nuclear area (μm)	Young's modulus (kPa) (mean \pm SD)
1	0	96.1 ± 1.3
2	5	65.3 ± 0.7
3	10	51.0 ± 0.5
4	15	24.9 ± 1.2
5	20	15.4 ± 1.0
6	25	N.A.

effects result in dissipation and compromise the measurement of the Young's modulus.

To verify whether the undesirable viscous contribution in AFM is homogeneously distributed across the cell, we used the dissipation channel measurements. By calculating the mean dissipation over small square areas, similarly to the Young's modulus calculation for the HBL-100 cell in figure 4, we observed larger dissipation values (more negative) for the nuclear area compared to the periphery (figure 8 and table 4).

These results suggest that the thickness of the cell body contribute to the stronger viscous effects in the nuclear region, while near the periphery, where the cell is thinner, the effect tends to be negligible. This suggests that measuring the Young's modulus away from the nuclear area could be beneficial [37]. However, we pointed out earlier that the relative differences between cell lines' elasticity are more evident when this is measured near the nucleus (figure 5) and the overestimation of the modulus due to the tip conical shape is less dramatic (table S1). Moreover, depending on the morphology of the specific cell line under analysis, the periphery of the adherent cells can potentially be very different and difficult to standardise across cell types, while the nuclear area tends to be morphologically more consistent, even in the case of highly polarised cells, thus facilitating a direct comparison between cell types. Overall, this study shows that AFM elasticity measurements on the nuclear area represent the best option to mechanically compare different cell lines, however, due to the uneven dissipation within a single cell body, elasticity maps could provide useful extra information that is dependent on the unique morphology of the sample. We envisage that this would be of particular importance in the case of other highly polarised cells, like, for example, neurons.

Moreover, our approach compensates for the potential inaccuracy of AFM in the estimation of the Young's modulus in the nuclear area by acquiring a second set of data by OTM under near-ideal elastic conditions. In fact, we observed that the viscous components in OTM measurements were negligible, as evidenced by the fact that the indentation and retraction curves of figure 3(b) almost overlap, showing that there is virtually no dissipation during the slow and 'gentle' indentation process.

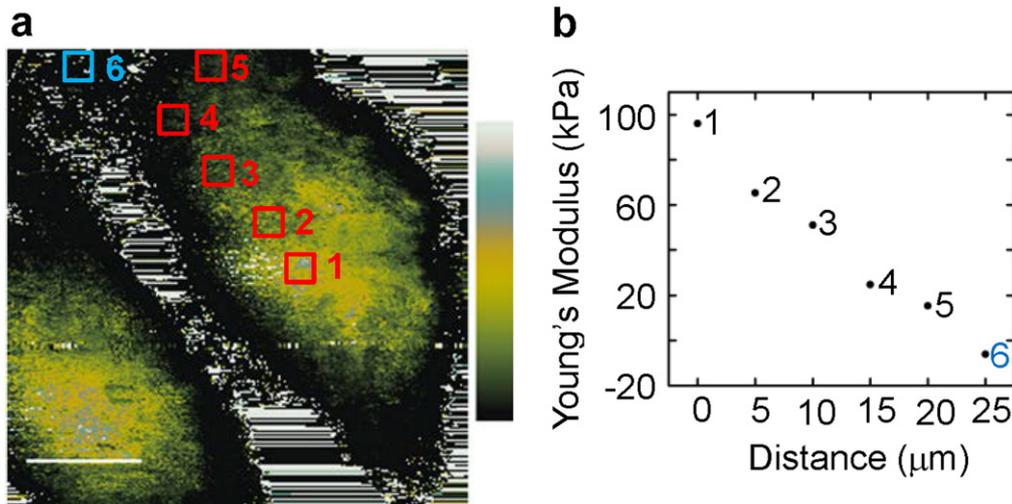


Figure 4. Distribution of the measured areas on a representative HBL-100 cell. (a) Location of the $6 \times 2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ squares from which the Young's modulus has been calculated (AFM Sneddon channel, colorbar 0–300 kPa). The blue square identifies a position very close to the polystyrene substrate, which is too rigid to be indented and therefore does not show a realistic elastic module. The position of the nuclear area (square 1) has been estimated from the topography of the cell and corresponds to the position of the highest feature in the height channel. The scalebar is $10 \mu\text{m}$. (b) The mean values calculated from the squares in panel (a) plotted against the distance from the nuclear area.

Table 2. Young's modulus values (mean \pm standard deviation SD for n cells) measured in three different regions of the cell, chosen in the same way as the squared regions 1, 3 and 5 shown in figure 4.

	HBL-100		MCF-7		MDA-MB-231	
	Young's modulus (kPa)	n	Young's modulus (kPa)	n	Young's modulus (kPa)	n
Nuclear area	95.4 ± 43.6	30	87.3 ± 47.8	30	55.6 ± 20.1	22
Intermediate	63 ± 29.5	30	79.4 ± 51.8	30	37.4 ± 21.7	22
Leading edge	36.1 ± 18.4	30	50.2 ± 38.5	30	28.7 ± 26.1	22

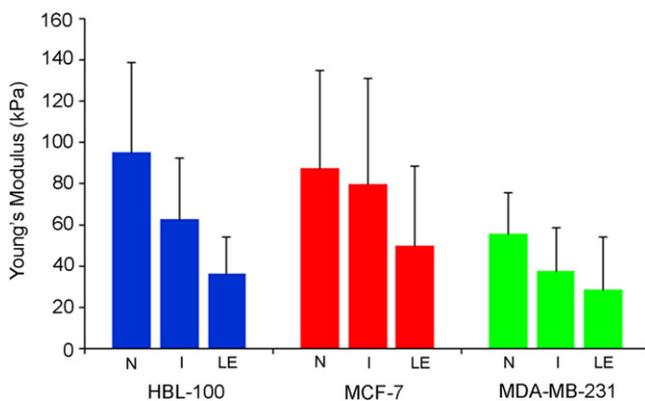


Figure 5. Young's modulus decreases with the distance from the nucleus. The bar chart is a graphical representation of the data in table 2. N: nuclear area, I: intermediate, and LE: leading edge.

Conclusions

We have described an integrated approach for the quantitative analysis of elasticity data from single cells, using two complementary techniques; AFM and OTM indentation. The study on three breast cell lines reported here conclusively

Table 3. Young's modulus measured by AFM and OTM indentation on top of the nucleus. The values represent the mean \pm the standard deviation (SD) over n cells.

	AFM indentation		OTM indentation	
	Young's modulus (kPa)	n	Young's modulus (Pa)	n
HBL-100	95.4 ± 43.6	30	23.5 ± 10.6	32
MCF-7	87.3 ± 47.8	30	30.2 ± 15.0	32
MDA-MB-231	55.6 ± 20.1	22	12.6 ± 6.1	22

shows that basal breast cancer cells (MDA-MB-231) are softer than their normal counterpart (myoepithelial HBL-100) and the less aggressive luminal breast cancer cell line (MCF-7), reflecting their aggressiveness and thus their potential infiltrating nature that could lead to metastasis. These findings, obtained both with AFM and OTM, are in line with previous studies [22, 35, 38]. We proved that it is possible to nondestructively image and map the Young's modulus using a recently introduced AFM imaging mode, peak force quantitative nanomechanical mapping (PFQNM), and we optimized the parameters to obtain consistent data

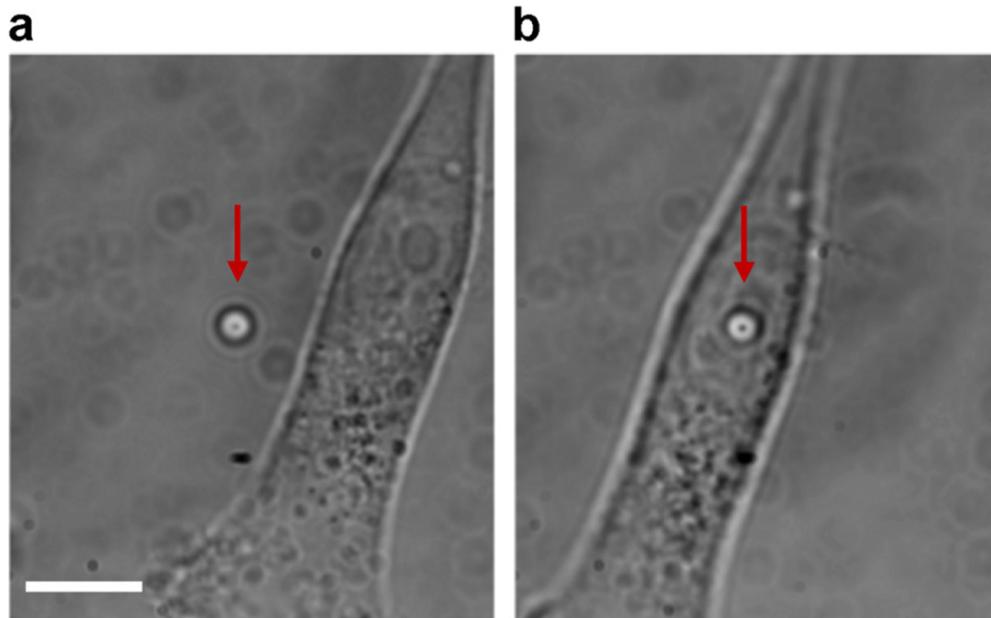


Figure 6. Optical images acquired by the OTM setup of a representative MDA-MB-231 cell, while a $3\ \mu\text{m}$ bead, highlighted by the red arrow, is trapped by the laser in the centre of the field of view (a) and positioned on the measuring area just above the nucleus by moving the stage (b). The scalebar is $10\ \mu\text{m}$.

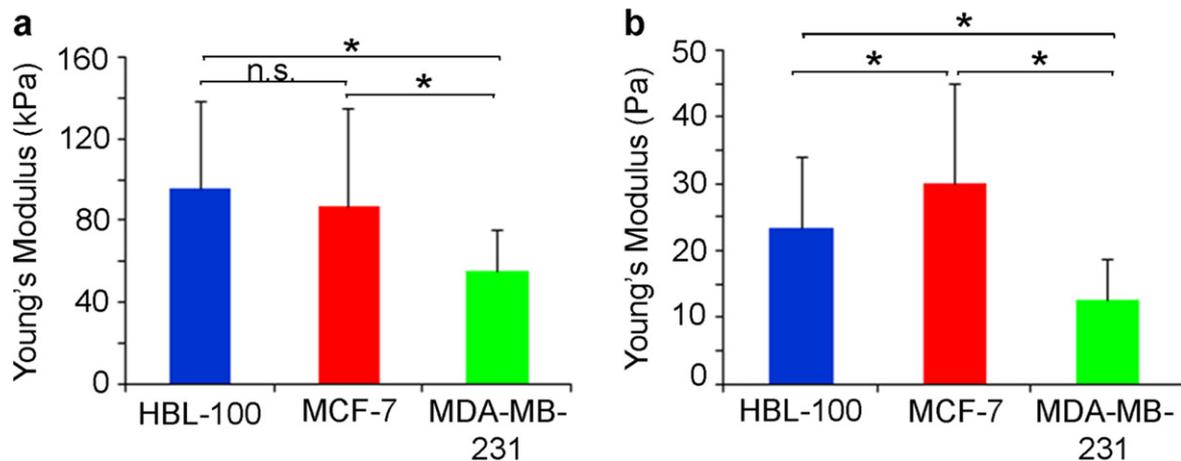


Figure 7. Graphical representation and statistical analysis of the data in table 3. The Young's modulus of MDA-MB-231 is significantly lower ($*P: <0.05$) than the other two cell lines, both in AFM (a) and OTM (b) measurements. The difference between HBL-100 and MCF-7 is not significant (n.s.) in the AFM dataset, whereas for OTM it is ($*P: <0.05$).

within a realistic time for live imaging. We observed that the elasticity is not homogeneously distributed across cells, and we identified the area just above the nucleus as the most accessible for determining elasticity differences between cell lines. We also identified and mapped the contribution of viscous forces on the cell body and we found that AFM tends to have larger dissipation in the region of the nuclear area. We correlated this with the loading rate of the technique used, concluding that, although mapping would be unrealistic, OTM is a preferable technique as it allows us to measure the mechanical properties of cells in a nearly ideal elastic manner. We have shown that for some cell lines, as was the case in the comparison between MCF-7 and HBL-100, the elasticity

measurements can give different results when using AFM or OTM, highlighting the importance of an integrated approach and a careful interpretation of the findings.

The set of techniques described here and the conclusions drawn contribute to the broader and systematic understanding of cancer biomechanics and to the ultimate goal of assessing the potential of cells to lead to metastasis by considering mechanical clues rather than molecular markers only. The biological insight that can be obtained from here is that the visco-elastic parameters determined at subcellular resolution using the approach described could be used as an indicator of metastasis, based on the significant differences observed on the metastatic model MDA-MB-231 in comparison to less

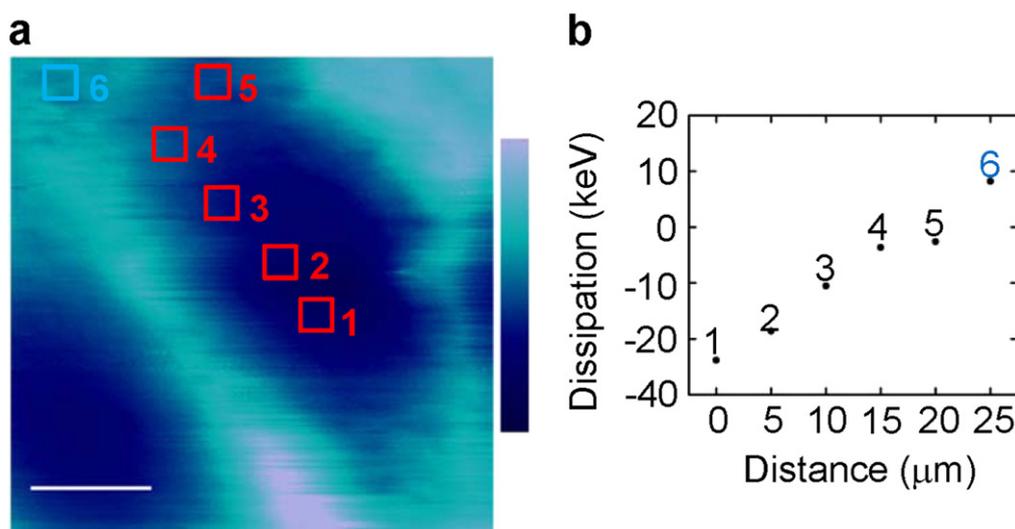


Figure 8. Dissipation measurements on different areas of a cell. (a) Dissipation map of the HBL-100 cell of figure 4. Colorbar -35 – 35 keV, scalebar $10 \mu\text{m}$. (b) Mean values of dissipation for each of the $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ squares plotted against the distance from the nuclear area, calculated as explained in figure 4. This map shows that the dissipation, due to viscosity, is primarily localised in the central area rather than the periphery. The viscous components of the cell evidenced here by AFM were not visible at OTM loading rate and stiffness regimes (see the overlapping indentation and retraction curves of figure 3(b)).

Table 4. Dissipation measured at different distances from the cell nucleus of the representative HBL-100 cell of figure 8. The dissipation is expressed as mean values for each square (10×10 pixels) \pm the standard deviation (SD). The value for position 6, $25 \mu\text{m}$ away from the nuclear area, is not measurable because it is too close to the nondeformable substrate.

Position in figure 8	Distance from nuclear area (μm)	Dissipation (keV) \pm SD
1	0	-23.8 ± 0.1
2	5	-18.6 ± 0.2
3	10	-10.5 ± 0.2
4	15	-3.6 ± 0.1
5	20	-2.6 ± 0.1
6	25	N.A.

aggressive cells. We also envisage that this approach could be suitable for high resolution mapping of visco-elastic parameters of soft materials other than living cells, for example PFQNM could be used to characterise and map nanostructured scaffolds for tissue engineering and OTM applied to probe the material at selected locations.

Authors' contributions

GC and WM performed atomic force microscopy; MSY and FN performed optical tweezers; GC, LV, IH and SB carried out the cell culture; MSY, FN, JN and DC contributed to the development of the optical tweezers custom setup; GC, MSY, FN, DC and EF analysed the experimental data; LV performed optical microscopy; GC, SB, JN, DC and EF contributed to the conception and design of the study; GC, DC and EF wrote the manuscript; GS and SB critically supported

the drafting of the manuscript with substantial intellectual content and interpretation of the data.

Acknowledgments

We would like to gratefully acknowledge the Applied Physics section of the Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics (ICTP), Trieste for partial financial support in building the optical tweezers setup and for the doctoral grant to FN through the ICTP-STEP program. We acknowledge partial financial support by the ERC Ideas Program through a senior grant to GS, entitled MOlecular NANotechnology for Life Science Applications: QUAntitative Interactomics for Diagnostics, PROteomics and QUAntitative Oncology (MONALISA QUIDPROQUO) grant # 269051.

References

- [1] Hanahan D and Weinberg R A 2000 The hallmarks of cancer *Cell* **100** 57–70
- [2] Hanahan D and Weinberg Robert A 2011 Hallmarks of cancer: the next generation *Cell* **144** 646–74
- [3] Mierke C T 2014 The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation *Rep. Prog. Phys.* **77** 076602
- [4] Ketene A N, Schmelz E M, Roberts P C and Agah M 2012 The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **8** 93–102

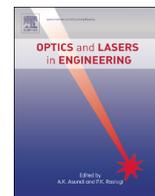
- [5] Plodinec M *et al* 2012 The nanomechanical signature of breast cancer *Nat. Nanotechnology* **7** 757–65
- [6] Venugopalan G, Camarillo D B, Webster K D, Reber C D, Sethian J A, Weaver V M, Fletcher D A, El-Samad H and Rycroft C H 2014 Multicellular architecture of malignant breast epithelia influences mechanics *PLoS One* **9** e101955
- [7] Costa K D 2004 Single-cell elastography: probing for disease with the atomic force microscope *Dis. Markers* **19** 139–54
- [8] Sugawara Y *et al* 2008 The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes *Bone* **43** 19–24
- [9] Guck J *et al* 2005 Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence *Biophys. J.* **88** 3689–98
- [10] Rother J, Nöding H, Mey I and Janshoff A 2014 Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines *Open Biology* **4** 140046
- [11] Lekka M, Pogoda K, Gostek J, Klymenko O, Prauzner-Bechcicki S, Wiltowska-Zuber J, Jaczewska J, Lekki J and Stachura Z 2012 Cancer cell recognition—mechanical phenotype *Micron* **43** 1259–66
- [12] Parkin D M, Bray F, Ferlay J and Pisani P 2001 Estimating the world cancer burden: Globocan 2000 *Int. J. Cancer* **94** 153–6
- [13] Cross S E, Jin Y-S, Rao J and Gimzewski J K 2007 Nanomechanical analysis of cells from cancer patients *Nat. Nanotechnology* **2** 780–3
- [14] Cross S E, Jin Y-S, Tondre J, Wong R, Rao J and Gimzewski J K 2008 AFM-based analysis of human metastatic cancer cells *Nanotechnology* **19** 384003
- [15] Di Carlo D 2012 A mechanical biomarker of cell state in medicine *J. Lab. Autom.* **17** 32–42
- [16] Müller D J and Dufrene Y F 2008 Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology *Nat. Immunol.* **3** 261–9
- [17] Harris A R 2011 Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements *Nanotechnology* **22** 345102
- [18] Lekka M, Laidler P, Gil D, Lekki J, Stachura Z and Hryniewicz A Z 1999 Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy *Eur. Biophys. J.* **28** 312–6
- [19] Lee G Y H and Lim C T 2007 Biomechanics approaches to studying human diseases *Trends Biotechnol.* **25** 111–8
- [20] Pittenger B, Erina N and Su C 2010 Quantitative mechanical property mapping at the nanoscale with PeakForce QNM *Application Note #84 Veeco Instruments Inc.* (www.bruker.com/products/surface-analysis/atomic-force-microscopy/afm-application-notes/an128-quantitative-mechanical-property-mapping-with-peakforce-qnm.html) (accessed: 15 December 2015)
- [21] Nawaz S, Sánchez P, Bodensiek K, Li S, Simons M and Schaap I A T 2012 Cell visco-elasticity measured with AFM and optical trapping at sub-micrometer deformations *PLoS One* **7** e45297
- [22] Li Q S, Lee G Y H, Ong C N and Lim C T 2008 AFM indentation study of breast cancer cells *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374** 609–13
- [23] Bodensiek K, Li W X, Sanchez P, Nawaz S and Schaap I A T 2013 A high-speed vertical optical trap for the mechanical testing of living cells at piconewton forces *Rev. Sci. Instrum.* **84** 113707
- [24] Hong-Lian G, Chun-Xiang L, Jian-Fa D, Yu-Qiang J, Xue-Hai H, Zhao-Lin L, Bing-Ying C and Dao-Zhong Z 2004 Mechanical properties of breast cancer cell membrane studied with optical tweezers *Chin. Phys. Lett.* **21** 2543
- [25] Tavano F, Bonin S, Pinato G, Stanta G and Cojoc D 2011 Custom-built optical tweezers for locally probing the viscoelastic properties of cancer cells *Int. J. Optomechatronics* **5** 234–48
- [26] Titushkin I and Cho M 2006 Distinct membrane mechanical properties of human mesenchymal stem cells determined using laser optical tweezers *Biophys. J.* **90** 2582–91
- [27] Sheetz M P and Dai J 1996 Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension *Trends Cell Biol.* **6** 85–9
- [28] Sneddon I N 1951 *Fourier Transforms* (New York: McGraw-Hill)
- [29] Yousafzai M S, Ndoye F, Coceano G, Niemela J, Bonin S, Scoles G and Cojoc D 2015 Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation *Opt. Lasers Eng.* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.optlaseng.2015.02.008>)
- [30] Gittes F and Schmidt C F 1998 Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers *Opt. Lett.* **23** 7–9
- [31] Gavara N and Chadwick R S 2012 Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips *Nat. Nanotechnology* **7** 733–6
- [32] Geiger B, Spatz J P and Bershadsky A D 2009 Environmental sensing through focal adhesions *Nat. Rev.* **10** 21–33
- [33] Simon D N and Wilson K L 2011 The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic ‘network of networks’ *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12** 695–708
- [34] Aebi U, Cohn J, Buhle L and Gerace L 1986 The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments *Nature* **323** 560–4
- [35] Chiou Y-W, Lin H-K, Tang M-J, Lin H-H and Yeh M-L 2013 The influence of physical and physiological cues on atomic force microscopy-based cell stiffness assessment *PLoS One* **8** e77384
- [36] Alcaraz J, Buscemi L, Grabulosa M, Trepas X, Fabry B, Farré R and Navajas D 2003 Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy *Biophys. J.* **84** 2071–9
- [37] Berquand A, Holloschi A, Trendelenburg M and Kioschis P 2010 Analysis of cytoskeleton-destabilizing agents by optimized optical navigation and AFM force measurements *Microsc. Today* **18** 34
- [38] Leporatti S, Vergara D, Zacheo A, Vergaro V, Maruccio G, Cingolani R and Rinaldi R 2009 Cytomechanical and topological investigation of MCF-7 cells by scanning force microscopy *Nanotechnology* **20** 055103



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Optics and Lasers in Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/optlaseng

Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation

Muhammad S. Yousafzai^{a,b}, Fatou Ndoye^{c,d}, Giovanna Coccano^{a,b}, Joseph Niemela^c,
Serena Bonin^e, Giacinto Scoles^f, Dan Cojoc^{a,*}

^a Institute of Materials (IOM-CNR), Area Science Park, Basovizza, S.S. 14, Km 163.5, 34149 Trieste, Italy

^b Nanotechnology, University of Trieste, 34149 Trieste, Italy

^c International Centre for Theoretical Physics (ICTP), 34149 Trieste, Italy

^d Department of Physics, Cheikh Anta Diop University, Dakar 5005, Senegal

^e Department of Medical Sciences (DSM), University of Trieste, 34149, Italy

^f Department of Biological and Medical Science, University of Udine, Santa Maria della Misericordia Hospital, 33100 Udine, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2014

Received in revised form

16 February 2015

Accepted 22 February 2015

Available online 12 March 2015

Keywords:

Cell elasticity

Biomechanics

Optical tweezers

Elastic modulus

Substrate stiffness

ABSTRACT

In the last decade, cell elasticity has been widely investigated as a potential label free indicator for cellular alteration in different diseases, cancer included. Cell elasticity can be locally measured by pulling membrane tethers, stretching or indenting the cell using optical tweezers. In this paper, we propose a simple approach to perform cell indentation at pN forces by axially moving the cell against a trapped microbead. The elastic modulus is calculated using the Hertz-model. Besides the axial component, the setup also allows us to examine the lateral cell-bead interaction. This technique has been applied to measure the local elasticity of HBL-100 cells, an immortalized human cell line, originally derived from the milk of a woman with no evidence of breast cancer lesions. In addition, we have studied the influence of substrate stiffness on cell elasticity by performing experiments on cells cultured on two substrates, bare and collagen-coated, having different stiffness. The mean value of the cell elastic modulus measured during indentation was 26 ± 9 Pa for the bare substrate, while for the collagen-coated substrate it diminished to 19 ± 7 Pa. The same trend was obtained for the elastic modulus measured during the retraction of the cell: 23 ± 10 Pa and 13 ± 7 Pa, respectively. These results show the cells adapt their stiffness to that of the substrate and demonstrate the potential of this setup for low-force probing of modifications to cell mechanics induced by the surrounding environment (e.g. extracellular matrix or other cells).

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The pioneering work by Ashkin et al. on the trapping of micro-particles and their manipulation by radiation pressure [1,2] led to the foundation of a new tool called optical tweezers (OT), which has found a multitude of applications in physics, chemistry and biology [3–5]. An important achievement for biology was the first demonstration that living micro-organisms (e.g. viruses, bacteria) could be manipulated by OT without being damaged [6]. This was followed by trapping and manipulation of single cells [7] and cell-organelles [8] using infrared (IR) laser beams.

Although the levels of intensity were high (typically tens of MW/cm², roughly corresponding to focusing 100 mW beams on an area of about 1 μm²), the use of IR laser beams proved to be

non-damaging to cells. Another important achievement was the measurement of the forces generated by organelle transport in vivo [9] and the use of a trapped microbead to probe forces in single-cell and single-molecule experiments [10–12]. OT versatility is highlighted by the wide range of applications which this technique has enabled: OT are now being used in the investigation of an increasing number of biochemical and biophysical processes, from the basic mechanical properties of biological polymers to the multitude of molecular machines that drive the internal dynamics of the cell [13]. Since OT forces are in the range from 1 to 200 pN and trap stiffness is in the range 0.001–1 pN/nm, it represents a complementary tool to other techniques for manipulation and force probing, such as atomic force microscopy (AFM) or magnetic tweezers [14,15].

Cellular processes as motility, adhesion, cell division and proliferation, involve mechanical forces in the range of the above-mentioned techniques, making them ideal tools for investigating the mechanisms of such processes. There is a continuous biomechanical interaction

* Corresponding author.

E-mail address: cojoc@iom.cnr.it (D. Cojoc).

between the cells and their extracellular matrix (ECM), and with other cells, leading to the modification of the cell biomechanics [16–18]. Moreover, the hypothesis that cellular biomechanics may play a significant role in tumorigenesis, cancer invasion and metastasis gains more and more support [19–21], although it is not yet fully understood how the transformation from healthy to malignancy alters the mechanical properties within the tumor microenvironment [22,23]. Among the various properties of cell mechanics, viscoelasticity has been the most widely investigated, e.g., using membrane tether pulling, cell stretching and indentation, all of which can be implemented in AFM and OT setups [24–27]. AFM applies higher forces to the sample than does OT (tens of pN compared to tens of nN) and the probe is stiffer (cantilever stiffness > 10 pN/nm). Since the response of the cell to mechanical stress depends on the applied force and the stiffness of the probe, these parameters need to be taken into account when interpreting measurements. Moreover, since the mechanical properties of biological samples depend on the loading rate (measured in N/s), quantifying the viscoelastic properties of a cell makes little sense without also defining the loading rate at which this property was measured [28,29]. In fact, the combination of both techniques allows the investigation of single cells at small and large forces and/or loading rates, enabling a more complete characterization of cell mechanics. A first comparative study of cell elasticity measurements by vertical indentation using AFM and OT was reported for 3T3 fibroblasts [30]. For comparable loading rates, indeed, the elastic modulus determined by OT is much smaller than that calculated by AFM. So far, AFM has been more frequently applied to cell elasticity measurement, due to the faster development of this technology for cell biology. However, the lowest force that can be reliably controlled in AFM is of the order of tens of pN, and these forces can already lead to a strain large enough to enter the non-elastic deformation regime [18]. Therefore OT, can provide in many cases a more appropriate and useful tool for a detailed understanding of the properties of the cellular composite material. Another implementation of axial cell indentation using an OT setup was recently reported for the measurement of localized cell stiffness of Balb3T3 cells [31]. In both OT implementations [30,31] a trapped microbead is axially pushed against the cell by moving the trap, and cell indentation is determined by measuring the axial displacement of the bead.

In this paper, we propose an alternative OT approach to perform cell indentation at pN forces by axially moving the cell against the trapped microbead and measuring its displacement. Since the position of the trap is fixed, the displacement of the microbead directly reflects its interaction with the cell, avoiding possible interference with drifts during trap axial displacement. Therefore, this solution is conceptually more precise than the trap displacement solution used in previously mentioned works [30,31]. The optical setup and the measurement approach are presented in Section 2. The technique has been applied to measure the elastic modulus of HBL-100 cells. HBL-100 has already been used as a non-neoplastic model when studying the properties of breast cancer cell lines, such as MCF-7 or MDA-MB-231, but it has not been characterized from the mechanical point of view. Cell preparation is described in Section 3. In Section 4 we report measured cell elasticity for cells cultured on two different substrates: bare and collagen coated glass cover slips, and demonstrate the adaptability of cells to the substrate stiffness (knowing that cells sense their mechanical environment and change their response accordingly).

2. Apparatus and protocol for OT cell indentation

2.1. Optical tweezers setup

A modular Thorlabs optical tweezers kit [32] with some modifications has been used in this work. We also performed multiple trapping experiments with this setup (using dynamic arrays of traps

generated by diffractive optical elements [33]) and for that reason we replaced the original laser trapping source (single mode laser diode, 975 nm, max 300 mW) by a more powerful IR laser (single mode Yb fiber laser YLM-5, 1064 nm, max 5 W, IPG Photonics GmbH), as shown in Fig. 1. The laser head has a built-in collimator providing a TEM00 laser beam with a diameter $D=5$ mm. After reflection by mirror M1 (which helps for alignment) the beam passes through a 2X beam expander, increasing its diameter to slightly overfill the entrance pupil of the microscope lens (Nikon 100X, NA 1.25 oil immersion, WD 0.3). The laser beam is focused into the sample chamber by the microscope lens, where a silica microbead is trapped at the point of focus. A home-made temperature controlled holder [24] is connected to the sample chamber (a Petri dish) to keep the cells at the physiological temperature, $T=37$ °C during the experiments. This is mounted on a nano-piezo cube, PS, (Thorlabs, NanoMax 3-axis flexure stage) allowing 5 nm control of the sample displacement. A second microscope lens (Nikon 10X, NA 0.25, WD 7) collects the laser light scattered by the trapped bead. The scattered light interferes in the back focal plane (BFP) of the second lens. The interference pattern (IP) is imaged by lens L3 ($f=40$ mm) onto the quadrant photo detector, QPD, (Thorlabs, PDQ80A, detector size 7.8 mm) which senses the lateral and axial displacement of the trapped bead, as indicated. When the bead is in the equilibrium position, the IP is centered on the QPD. A lateral displacement of the bead is indicated by an IP lateral displacement, while an axial displacement is indicated by the change in size of the IP. The lateral and axial differential signals (ΔX , ΔY , ΔZ) are obtained combining the signals from the quadrants 1–4 as follows:

$$\Delta X = [(1+4) - (2+3)]; \Delta Y = [(1+2) - (3+4)]; \Delta Z = [1+2+3+4] \quad (1)$$

The differential signals are acquired through a digital acquisition card (DAQ – NI USB 2561) and a custom LabView code running on a PC. As the QPD has a large bandwidth (150 kHz), it can measure very well the thermal movement of the bead in the trap, characterized by a maximum bandwidth of 1–2 kHz. The sample is illuminated by the light from a LED through the second microscope lens. The sample is imaged by the first microscope lens and the tube lens (TL) on the sensor of a CMOS camera (Thorlabs, DCC 1240C).

2.2. Experimental procedure.

Cell indentation is observed by moving axially the cell against the trapped bead, as shown in Fig. 2. When contact is made, the bead will try to resist cell advancement, producing an indentation of the cell. As the stage displacement (SD) is known and bead displacement (BD) can be measured by BFP interferometry as previously shown, it is possible to measure the bead movement into the cells, i.e. the indentation, Id :

$$Id = SD - BD \quad (2)$$

Another parameter required to calculate the elasticity is the force, F , exerted by the cell on the bead. This is given by the linear relation:

$$F = k \cdot BD \quad (3)$$

where k is the stiffness of the optical trap. This linear relation for the force is valid for a limited range of BD (± 500 nm) [14].

At the beginning of each single cell experiment, a bead is trapped and a cell is positioned slightly below it, preventing cell-bead contact. The microscope image of a HBL-100 cell under a trapped bead is shown in Fig. 2c. The PS is then vertically displaced with a sinusoid signal (amplitude $A=1.14$ μm , one period $T=5$ s) as shown in Fig. 3, and the vertical displacement of the bead in the trap is acquired at a 10 KHz sampling frequency (dark blue curve).

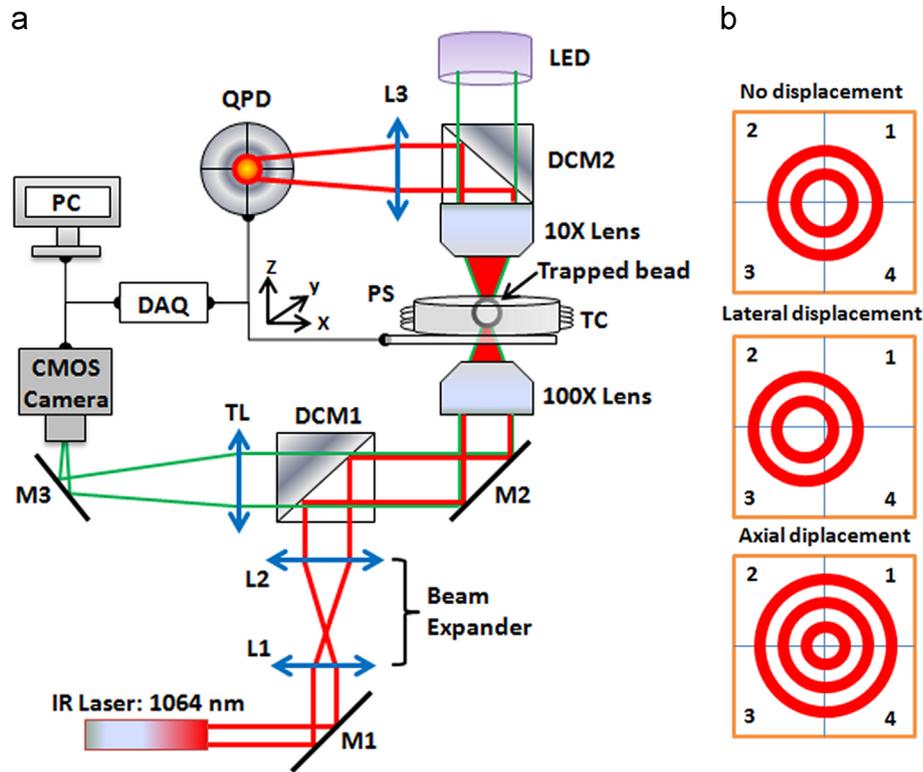


Fig. 1. Optical tweezers setup for cell indentation and force measurement. (a) Laser trapping (1064 nm) beam path (red) and bright-field imaging path (green). PS: 3-axis nano-piezo stage; DAQ: digital analog acquisition card; TL: tube lens; L1–L3 convergent lenses; M1–M3: mirrors; DCM 1–2 dichroic mirrors, TC: temperature controlled holder and (b) interference pattern imaged on the QPD for: equilibrium position, lateral and axial displacements. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

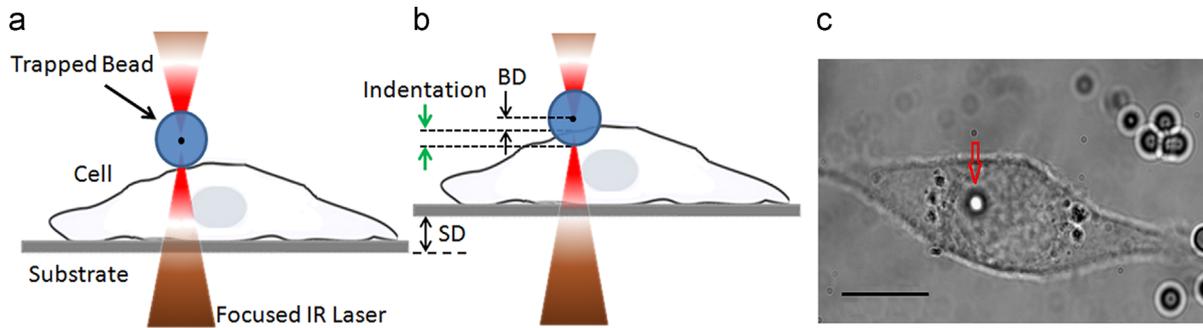


Fig. 2. Schematic of the experimental procedure. (a) The cell is positioned below the trapped bead, (b) the stage is moved up by SD and the cell interacts with the bead displacing it by BD , while the bead indents the cell and (c) optical microscope image of the bead above the cell, bead indicated by arrow, scale bar $10 \mu\text{m}$.

During the first half of the period, the PS moves away from the bead, therefore the bead oscillates freely in the trap. This signal can be used to measure the stiffness of the trap in situ. It also substantiates that there is no contact between the cell and the bead. As shown in Fig. 3, we chop up the signal for an interval, A of about 1 s to calculate the stiffness through the equipartition theorem [14]:

$$k = K_B \cdot T / \text{var}(z) \quad (4)$$

where $\text{var}(z)$ is the variance of the BD (ΔZ in Eq. (1)) signal in interval A , K_B is the Boltzmann constant and T is the temperature of the medium. Since the stage velocity is very low ($\sim 1 \mu\text{m/s}$), the Stokes drag force exerted on the bead during the PS movement is very small ($< 0.05 \text{ pN}$) and hence it can be neglected. In this setup, the trap stiffness can be varied from 5 to $30 \text{ pN}/\mu\text{m}$ using powers of the trapping laser, at the sample, from 8 to 50 mW. Stronger

stiffness can be obtained by increasing the power of the laser, but this is limited by the need to avoid damaging the cell. Note that cell damage is not only restricted to the induced death of the cell but also to alteration of its properties (e.g. mechanical properties). To exert sufficient care in this regards we kept the trap stiffness at a constant value: $k = 15 \text{ pN}/\mu\text{m}$ (or 0.015 pN/nm , in units used by OT community), using a power of 24–26 mW of the trapping laser at the sample.

The interaction between the cell and the bead is observed for the second half of the sinusoid shown in Fig. 3. When the cell comes into contact with the bead and begins to push it, BD increases in the same direction as the PS travel. However, the rate of BD rise is smaller than the rate of PS displacement, PSD. The difference between the two gives the cell indentation, Id . As shown in Fig. 3, there are two characteristic regions for cell–bead interaction: indentation, when the stage/cell moves toward the

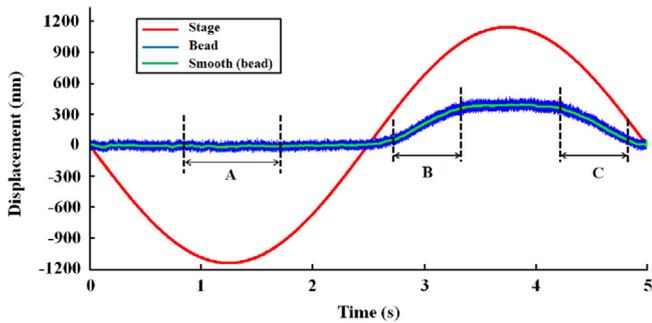


Fig. 3. Stage and bead displacement due to cell–bead interaction. Stage displacement following a period of sinusoidal signal ($T=5$ s) is represented in red. Bead displacement sampled at 10 kHz is represented by the blue curve and the corresponding smoothed signal (over 500 sampling points) by the green one. Trap stiffness is calculated using the signal chopped from interval A, where the bead is freely oscillating in the trap. Indentation, B and retraction, C intervals defined in the linear regions of the second half of the sinusoid are used to calculate the elastic modulus. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

bead and retraction, when the cell moves back. To measure the elastic modulus, we choose shorter intervals B (indentation) and C (retraction), corresponding to the almost linear regions of the stage movement. To avoid ambiguities related to the contact point, the starting point of the indentation interval should correspond to a bead displacement $BD > 30$ nm. The same condition is maintained for the second point of the retraction interval. Stage and bead displacements, indentation, the applied force and the selection of the indentation and retraction intervals are illustrated in Fig. 4. Details about the intervals length are given in next section.

2.3. Elastic modulus calculation

From the measurements of indentation and force the elastic modulus has been obtained by the use of the Hertz-model [28]. This model applies to homogeneous, semi infinite elastic solid objects, but a living cell is clearly different from that type of object, being viscous as well as elastic, and inhomogeneous. In spite of this, the Hertz-model has been used to determine cell elasticity in most reported cell mechanics studies [21,23,26–31] and technical procedures of commercial AFM instruments [34,35]. In fact, since the goal of most experiments is to make comparative studies between different cells or between cells under different environmental conditions, the use of Hertz-model can be justified. In our experiments, we consider the resulting elastic modulus as an *apparent* elastic modulus, to distinguish it from the rigorous formulation given by the Hertz-model. The *apparent* elastic modulus, E is given by [30]:

$$E = \left[3(1 - \nu^2) / (4\sqrt{Id} \cdot R) \right] \cdot (F/Id) \quad (5)$$

where, R is the bead radius, F the force, Id the indentation and ν is the Poisson ratio. For our experiments we choose $\nu=0.4$ [30].

From the temporal sequences of BD and Id for the indentation and retraction intervals shown in Fig. 4, and using the force Eq. (3) we obtain the Force–indentation (F – Id) curves, shown in Fig. 5. As one can see from this figure, the curves are almost linear, indicating that the behavior of the cell at low indentation forces is elastic. By linearly fitting the Force–indentation (F – Id) curve we obtain a linear Force–Indentation (F – Id_i) curve (Fig. 5) of which slope S , is: $S = d(F_i)/d(Id_i)$. Considering this linear fit, the elastic modulus in Eq. (5) can be approximated by:

$$E = \left[3(1 - \nu^2) / (4\sqrt{Id} \cdot R) \right] \cdot S \quad (6)$$

with the indentation Id remaining the only variable. Since the absolute value of the indentation depends on a series of experimental

variables, such as the contact point, it is difficult to determine it properly. To avoid this problem we have adopted a practical criterion, based on the observation of the experimental data. From the temporal sequences of the indentation curves (Fig. 4) we observed an indentation, $Id \geq 200$ nm, for all the cells analyzed in our study. The indentation and retraction intervals were therefore set to 200 nm. The starting point, t_1 , of the indentation interval was always chosen to correspond to a bead displacement, $BD > 30$ nm, which confirms the cell–bead interaction event, while t_2 was chosen such that the interval $[t_1, t_2]$ remained within the linear region of the stage displacement and the indentation amplitude, measured from t_1 , was higher than 200 nm. The same criterion was used to establish the retraction interval. Following the above considerations, we calculated the elastic modulus considering the same indentation value, $Id=200$ nm, for all the cells in our study. Introducing this value and the radius of the bead ($R=1.5 \mu\text{m}$) in Eq. (6) we obtain a simple equation to calculate the apparent elastic modulus:

$$E = 1150 \cdot S \quad (7)$$

where S is the slope of the linear force–indentation curve and the elastic modulus, E is expressed in [Pa].

3. Sample preparation for HBL-100 cells

HBL-100 is an immortalized human cell line, which was developed from the milk of a 27-year-old Caucasian woman with no evidence of breast cancer lesions [36]. Cells were

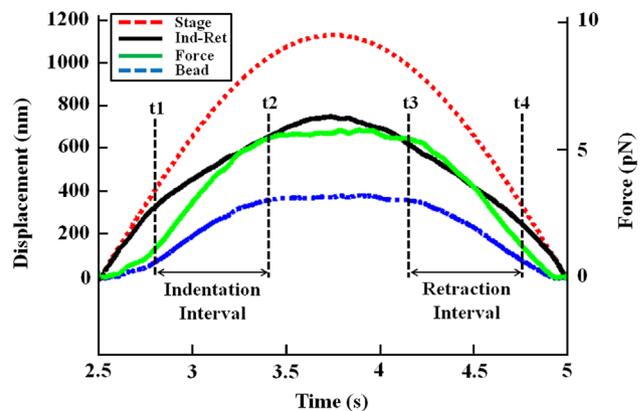


Fig. 4. Indentation and retraction intervals. Stage displacement (red), measured bead displacement (blue), the calculated force (green), calculated indentation (black) for the second half of the sinusoid, when cell interacts with the bead. Indentation and retraction intervals are selected in the linear regions of the sinusoid. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

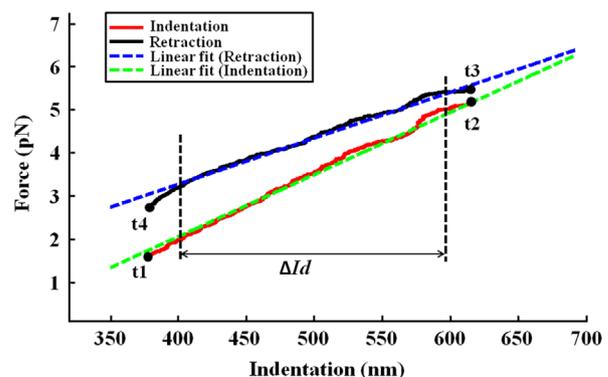


Fig. 5. Example of Force–Indentation plots taken for indentation and retraction intervals.

cultured in adhesion in a RPMI 1640 medium with stable L-glutamine (Euroclone), supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), and 50 IU/ml of Penicillin–streptomycin solution. Cell cultures were grown in 25 cm² flasks at 37 °C with 5% of CO₂. They were passed every 2–3 days, when they reached the confluence. The day before the experiment cells were detached from the flask using trypsin and seeded in 30 mm Petri dishes with a cover slip base at a density of 2×10^5 cells. They were maintained overnight in physiological conditions to let them adhere to the substrate. To test the influence of the substrate stiffness on the elastic modulus of the cell, the samples were seeded on bare and on collagen-coated Petri dishes. Type I Collagen at a concentration of 60 µg/ml in acetic acid 0.02 N was used for coating. The collagen was diluted at 60 µg/ml and distributed on a sterilized Petri dish to overlay the cover slip for 2 h under a laminar hood. The remaining solution was removed, air dried and put under UV light overnight.

4. Results and discussion

We investigated the validity of the experimental approach described in previous sections by measuring the elastic modulus of HBL-100 cells cultured on two different substrates: bare glass cover slip and collagen-coated cover slip. Since bare glass has a higher stiffness than collagen-coated glass [18,37]; we investigated whether this difference was reflected in the observations of the elastic modulus.

Here, an optically-trapped silica bead of 3 µm diameter was used as probe. The stiffness of the optical trap was kept constant

($k=0.015$ pN/nm) for all measurements. The stage was axially moved with a sinusoid signal ($T=5$ s, $A=1.14$ µm), allowing the measurement of the elastic modulus both for indentation and retraction at a loading rate of about 5 pN/s. We measured 26 cells cultured on bare substrates and 26 cells cultured on collagen coated substrates. For each substrate, the cells were selected from 10 different Petri dishes, from two different cultures. Measurements were performed for all cells in their central region, above the nucleus, as shown in Fig. 2c. Results are summarized in Fig. 6. HBL-100 cells cultured on glass had an elastic modulus higher than the one of the cells grown on collagen-I coated substrate, both for indentation ($E_{bi}=26 \pm 9$ Pa, $E_{ci}=19 \pm 7$ Pa) and for retraction ($E_{br}=23 \pm 10$ Pa, $E_{cr}=13 \pm 7$ Pa). The errors represent the standard deviations. For the glass (stiffer) substrate, the elastic modulus measured during indentation was 27% higher than that obtained for the more compliant collagen substrate. For retraction, the difference between glass and collagen-coated substrates was even larger: 43%. For both substrates, the elastic modulus measured for indentation was smaller than for retraction (by 11.5% for glass substrates and 31.6% for collagen-coated substrates).

The distribution of the elastic modulus values can be better observed from the box plot representation in Fig. 7. Notice that while the 50% clusters (2nd+3rd quartiles) are quite similar in dimension for all cases, the elastic modulus data for bare substrates have more spread than those for collagen coated substrates. A *t*-test has been applied to show the data sets are significantly different ($p < 0.01$).

Our results show that cell elasticity correlates with the substrate stiffness; HBL-100 cell elasticity increases when cells are cultured on stiffer substrate. Moreover, the elastic modulus

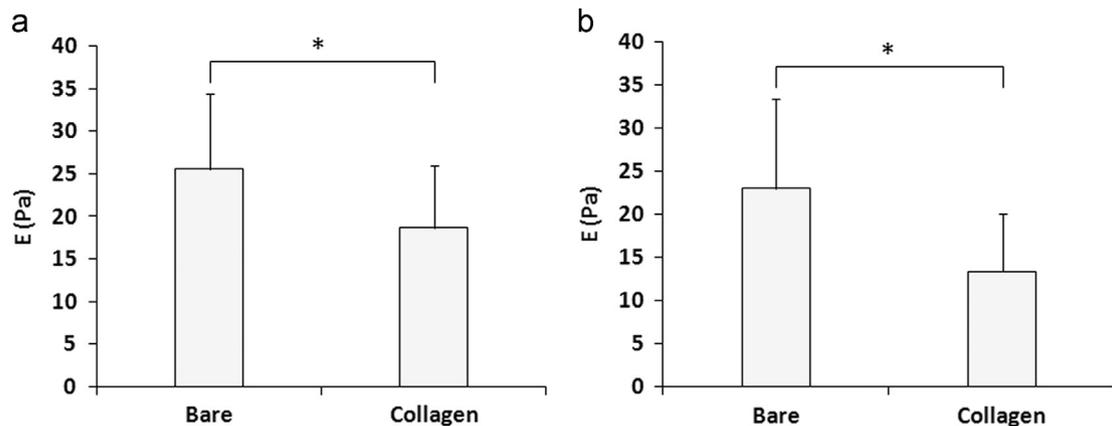


Fig. 6. Mean values of elastic modulus for (a) indentation and (b) retraction. (Nb, Nc=26; $p < 0.01$ (*t*-test)).

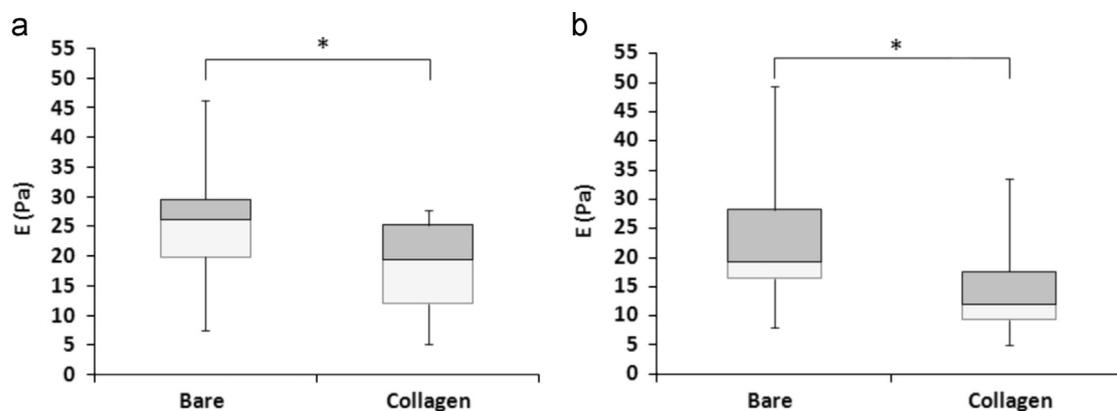


Fig. 7. Box plot representation of the distribution of elastic modulus for (a) indentation and (b) retraction. (Nb, Nc=26; $p < 0.01$ (*t*-test)).

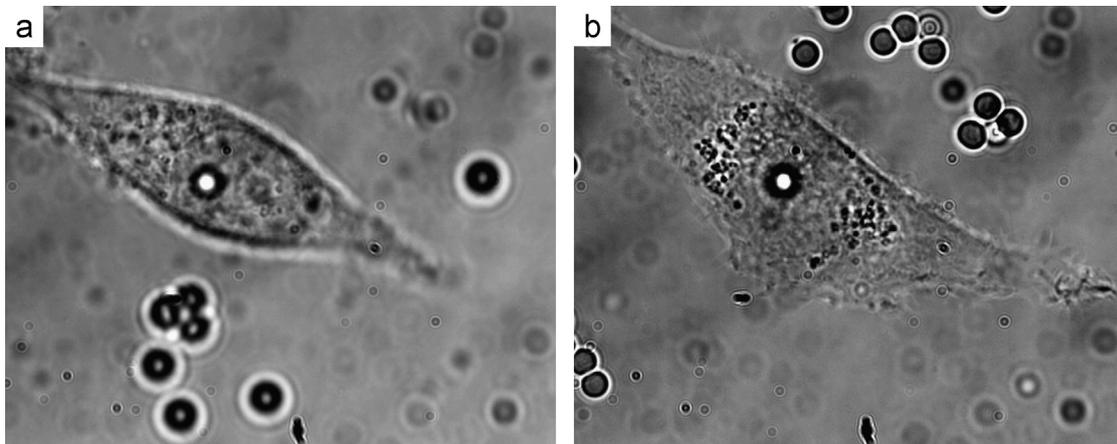


Fig. 8. Optical image of morphological changes of HBL-100 cells cultured on (a) collagen coated and (b) bare substrate.

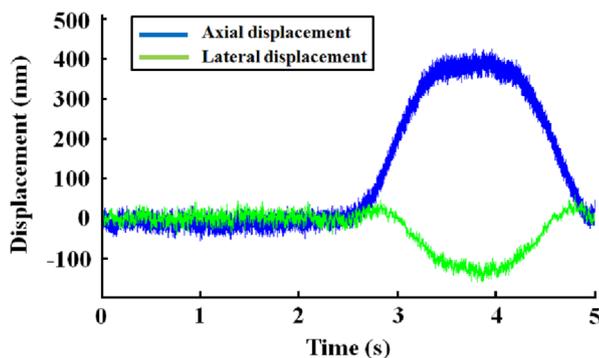


Fig. 9. Illustration of axial and lateral movement of the bead during cell–bead interaction.

probed at indentation is different from that measured during retraction. It is known that, for similar AFM cell elasticity measurements, the force–indentation curve at indentation is different from the retraction curve. The difference between those two curves has been explained by considering the energy dispersed by the cell between indentation and retraction, due to the viscous contribution [30]. Nevertheless, as shown by the force–indentation curve (Fig. 5), the cell–bead interaction is elastic and hence the viscous contribution can be discarded. Moreover, the difference between the two curves is opposite to that of AFM, meaning that more energy is spent at indentation than at retraction. It is not clear why this difference should exist. Since the interaction cell–bead takes place at a very low loading rate with respect to the AFM experiments, one reason might be a local reconfiguration of the plasma cell membrane (loss of elasticity) during indentation. This hypothesis will be checked in future experiments by applying different loading rates.

Substrate stiffness is known to influence the organization of cell cytoskeleton, showing that cells respond to extra-cellular environmental changes. Cytoskeleton re-arrangement is also accompanied by variations of cell spreading and motility. For instance, cells on compliant substrates exhibit reduced spreading, greater migration rates, and elevated lamellipodial activity compared with cells on more rigid substrates. Increased motility and lamellipodial activity on compliant substrates is associated with more dynamic focal adhesions, whereas cells on rigid substrates had more regularly shaped, stable adhesions [22,37,38]. Although the present study focuses on cell elasticity measurement and not on cell spreading and motility, the images acquired for each measured cell show that cells cultured

on glass spread more than those cultured on collagen (see Fig. 8).

Besides the axial indentation, our setup allows us to monitor the lateral cell–bead interaction using BFP interferometry and the QPD sensor. This is a supplementary feature to the other two OT axial indentation setups reported in the literature [30,31]. Even if the displacement of the cell towards the bead is axial, the cell–bead interaction can induce a lateral displacement of the bead as well. This is due to the non-planar shape of the cell membrane in contact with the bead. An example of this, where we have tracked the bead in two directions, is shown in Fig. 9. The presence of a lateral component in the bead displacement implies that the indentation force is not perfectly vertical and the total force applied to the cell is bigger than the vertical indentation. Even if this lateral force is smaller than the vertical force, it is not negligible and it is important since it stresses the cell in a plane tangential to the surface membrane providing additional information about cell membrane elasticity and the mechanisms behind it. Monitoring the bead in more than one direction allows better evaluating the contact point and observing the cell–bead interaction. By using three dimensional (3D) tracking we plan to measure the 3D elasticity components and analyze in more detail the cell–bead interaction (e.g. slip, roll). Interestingly, working in scanning mode with feedback limited forces one can obtain the 3D local map of the cell topography from the 3D displacement of the bead. The topographic information, correlated with the elasticity map, will allow a more thoughtful characterization of the local 3D cell elasticity.

5. Conclusions

In this paper we demonstrated the strength of a simple optical tweezers setup to measure cell–bead interaction by axial displacement of the cell against a trapped bead. Force and elasticity measurements were performed at a low loading rate (5 pN/s) and with low forces (< 10 pN), thus providing a complementary regime to the AFM measurements, which are characterized by higher loading rates and forces. Cell elasticity was measured for HBL-100 cells cultured on two substrates with different stiffness, showing that cells adapt their elasticity to the compliance of the substrate: cells are observed to be less stiff with more compliant substrates. These results confirm that the substrate mechanical properties influence not only cell spreading and motility, but also cell elasticity.

Acknowledgments

We would like to gratefully acknowledge the Applied Physics section of the International Centre for Theoretical Physics (ICTP), Trieste for partial financial support to build the Optical Tweezers setup and partial financial support by the ERC Ideas Program through a senior Grant to GS, titled: MOlecular NAnotechnology for Lfife Science Applications: QUAntitative Interactomics for Diagnostics, PROteomics and QUAntitative Oncology (MONALISA QUID-PROQUO) Grant # 269051. FN acknowledges the ICTP-STEP program. We thank Daniela Cesselli from the University of Udine for critical reading of the manuscript and valuable suggestions.

References

- [1] Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys Rev Lett* 1970;24:156.
- [2] Ashkin A, Dziedzic J, Bjorkholm J, Chu S. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt Lett* 1986;11:288–90.
- [3] Grier DG. A revolution in optical manipulation. *Nature* 2003;424:810–6.
- [4] Neuman KC, Block SM. Optical trapping. *Rev Sci Instrum* 2004;75:2787–809.
- [5] Ashok PC, Dholakia K. Optical trapping for analytical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:16–21.
- [6] Ashkin A, Dziedzic J. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science* 1987;235:1517–20.
- [7] Ashkin A, Dziedzic J, Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature* 1987;330:769–71.
- [8] Ashkin A, Dziedzic J. Internal cell manipulation using infrared laser traps. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:7914–8.
- [9] Block SM, Goldstein LS, Schnapp BJ. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* 1990;348:348–52.
- [10] Zhang H, Liu K-K. Optical tweezers for single cells. *J R Soc Interface* 2008;5:671–90.
- [11] Ramser K, Hanstorp D. Optical manipulation for single-cell studies. *J biophotonics* 2010;3:187–206.
- [12] Oddershede LB. Force probing of individual molecules inside the living cell is now a reality. *Nat Chem Biol* 2012;8:879–86.
- [13] Moffitt JR, Chemla YR, Smith SB, Bustamante C. Recent advances in optical tweezers. *Biochemistry* 2008;77:205.
- [14] Neuman KC, Nagy A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* 2008;5:491.
- [15] Difato F, Pinato G, Cojoc D. Cell signaling experiments driven by optical manipulation. *Int J Mol Sci* 2013;14:8963–84.
- [16] Huang H, Sylvan J, Jonas M, Barresi R, So PT, Campbell KP, et al. Cell stiffness and receptors: evidence for cytoskeletal subnetworks. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2005;288:C72–80.
- [17] Schoen I, Pruitt BL, Vogel V. The Yin-yang of rigidity sensing: how forces and mechanical properties regulate the cellular response to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* 2013;43:589–618.
- [18] Wen Q, Janmey PA. Effects of non-linearity on cell–ECM interactions. *Exp. Cell Res.* 2013;319:2481–9.
- [19] Geiger TR, Peeper DS. Metastasis mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Rev. Cancer* 2009;1796:293–308.
- [20] Makale M. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Res Part C: Embryo Today: Rev* 2007;81:329–43.
- [21] Guz N, Dokukin M, Kalparthi V, Sokolov I. If cell mechanics can be described by elastic modulus: study of different models and probes used in indentation experiments. *Biophys J* 2014;107:564–75.
- [22] Fischer RS, Myers KA, Gardel ML, Waterman CM. Stiffness-controlled three-dimensional extracellular matrices for high-resolution imaging of cell behavior. *Nat Protoc* 2012;7:2056–66.
- [23] Mierke CT. The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation. *Rep Prog Phys* 2014;77:076602.
- [24] Tavano F, Bonin S, Pinato G, Stanta G, Cojoc D. Custom-built optical tweezers for locally probing the viscoelastic properties of cancer cells. *Int J Optomechanics* 2011;5:234–48.
- [25] Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Mater* 2007;55:3989–4014.
- [26] Kirmizis D, Logothetidis S. Atomic force microscopy probing in the measurement of cell mechanics. *Int J Nanomed.* 2010;5:137.
- [27] Laura Andolfi EB, Migliorini Elisa, Palma Anita, Pucer Anja, Skrap Miran, Scoles Giacinto, et al. Investigation of adhesion and mechanical properties of human glioma cells by single cell force spectroscopy and atomic force microscopy. (accepted). *PloS one* 2014.
- [28] Li Q, Lee G, Ong C, Lim C. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:609–13.
- [29] Medalsy ID, Müller DJ. Nanomechanical properties of proteins and membranes depend on loading rate and electrostatic interactions. *ACS nano* 2013;7:2642–50.
- [30] Nawaz S, Sánchez P, Bodensiek K, Li S, Simons M, Schaap IA. Cell viscoelasticity measured with AFM and optical trapping at sub-micrometer deformations. *PloS one* 2012;7:e45297.
- [31] Dy M-C, Kanaya S, Sugiura T. Localized cell stiffness measurement using axial movement of an optically trapped microparticle. *J Biomed Opt* 2013;18:111411.
- [32] MOTKwct. (https://www.thorlabs.com/NewGroupPage9.cfm?ObjectGroup_ID=3959).
- [33] Cojoc D, Cabrini S, Ferrari E, Malureanu R, Danailov MB, Di Fabrizio E. Dynamic multiple optical trapping by means of diffractive optical elements. *Microelectron Eng* 2004;73:927–32.
- [34] JPK. (<http://www.jpk.com/atomic-force-microscopy.27.en.html>).
- [35] BRUKER. (<http://wwwbruker.com/products/surface-analysis/atomic-force-microscopy.html>).
- [36] De Fromental CC, Nardeux P, Soussi T, Lavalie C, Estrade S, Carloni G, et al. Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Exp Cell Res* 1985;160:83–94.
- [37] Khademhosseini A, Borenstein J, Toner M, Takayama S. Micro and Nanoengineering of the Cell Microenvironment: Technologies and Applications. Norwood MA, USA: Artech House Publishers; 2008.
- [38] Engler A, Bacakova L, Newman C, Hategan A, Griffin M, Discher D. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J* 2004;86:617–628.

The influence of lateral forces on the cell stiffness measurement by optical tweezers vertical indentation

Fatou Ndoye^{a,b}, Muhammad Sulaiman Yousafzai^{c,d}, Giovanna Coceano^{c,d}, Serena Bonin^e, Giacinto Scoles^{d,f}, Oumar Ka^a, Joseph Niemela^b, and Dan Cojoc^c

^aDepartment of Physics, Cheikh Anta Diop University, Dakar, Senegal; ^bInternational Centre for Theoretical Physics (ICTP), Trieste, Italy; ^cInstitute of Materials (IOM-CNR), Area Science Park, Basovizza, Trieste, Italy; ^dSchool of Nanotechnology, University of Trieste, Trieste, Italy; ^eDepartment of Medical Sciences (DSM), University of Trieste, Italy; ^fDepartment of Biological and Medical Science, University of Udine, Santa Maria della Misericordia Hospital, Udine, Italy

ABSTRACT

We studied the lateral forces arising during the vertical indentation of the cell membrane by an optically trapped microbead, using back focal plane interferometry to determine force components in all directions. We analyzed the cell-microbead interaction and showed that indeed the force had also lateral components. Using the Hertz model, we calculated and compared the elastic moduli resulting from the total and vertical forces, showing that the differences are important and the total force should be considered. To confirm our results we analyzed cells from two breast cancer cell lines: MDA-MB-231 and HBL-100, known to have different cancer aggressiveness and hence stiffness.

KEYWORDS

Cancer cell; cell mechanics; cell stiffness; optical tweezers; vertical indentation

1. Introduction

In the last two decades, cell mechanics has been acknowledged as a possible biomarker for numerous diseases, most importantly cancer^[1,2]. The mechanical properties of a cell play a pivotal role in many cellular processes like cell motility, adhesion, cell division and proliferation^[3–5]. The cell continuously feels the mechanical changes in its microenvironment and alters its biochemical response accordingly. Cell mechanics play a significant role in tumorigenesis, cancer invasion, and metastasis^[6]. Metastasis is the most common cause of death in cancer patients and the main obstacle in cancer treatment^[7,8]. The transient journey of metastatic cells from a primary tumor to the secondary sites exhibits a mechanical character^[9,10]. Thus, studying the mechanical alterations that cancer cells acquire or induce in the surrounding environment (extracellular matrix (ECM)) at different level of aggressiveness is fundamental to elucidating cancer metastasis.

Microtubules, microfilaments and intermediate filaments are the main load bearing components of a cell cytoskeleton and give structural stability to the cell. These cytoskeletal constituents along with other cytoplasmic components account for the viscoelastic behaviors of a cell^[11]. Actin filaments are the most prominent components of cell cytoskeleton^[12]. The process of actin polymerization and depolymerization makes the cell responsive to external stress. The cell stiffness, a widely measured property for cell viscoelastic characterization, can be viewed at molecular level as actin/myosin perturbation and cytoskeletal deformation^[13]. Regarding cancer, it is widely accepted that cancer cells are softer than non-transformed cells while the tumor by itself is stiffer^[14,15]. The cellular processes, which orchestrate cytoskeletal mechanical components, are sensitive to forces in the pN range.

Nomenclature

OT	optical tweezers	<i>BD</i>	bead displacement
AFM	atomic force microscopy	<i>k</i>	trap stiffness
BFP	back focal plane	β	force angle with z-axis
QPD	quadrant photo diode	α	force angle with x-axis
ECM	extra cellular matrix	<i>t</i>	time
<i>Id</i>	indentation	pN	pico newton
<i>F</i>	total force	<i>SD</i>	stage displacement
F_z	vertical force	3D	3 dimensional
ν	Poisson ratio	<i>E</i>	elastic modulus

Therefore, this property is exploited to establish various biophysical techniques capable of generating forces and measuring the mechanical properties of cancer cells.

A variety of biophysical methods such as microplate or optical stretchers, micropipette aspiration, magnetic twisting, atomic force microscopy (AFM) and optical tweezers (OT) are being used to study mechanical nature of cells, as reviewed in^[2,11]. In the past two decades, AFM and OT emerged as strong candidates to study cells cultured on substrates. These techniques offer a novel mechanism to probe the elasticity (stiffness) at different sites of the cell, using the same axial cell indentation scheme^[16–19]. In the AFM techniques, the forces range from 10 to 10^3 pN with a cantilever stiffness larger than 10 pN/nm. Although AFM is not a high throughput technique, it offers the advantage to measure and map with high spatial resolution the local elasticity of the cells in liquid media^[20]. However, there are some restrictions that limit its use in small force domain. The thermal noise of the cantilever in a liquid, which is of the order of tens of pN^[18], limits the minimum applied force. Furthermore, as an example, if the stiffness of the cantilever is 100 pN/nm (normally used in biological experiments), any small error in indentation of 1 nm will induce a force of 100 pN, which is critical for many of the biological processes. To overcome these limitations, OT can be employed to characterize cell mechanics at small forces (<10 pN). OT, in general, impart forces in the range of $10^{-1} - 10^2$ pN with a spring constant of $10^{-3} - 1$ pN/nm, which makes OT ideal for low mechanical force regimes^[21]. The higher sensitivity of OT over AFM lies in the different kinds of probes through which they apply forces. In the case of OT, the probe is a micron size bead held tightly in a laser trap^[22], which is more sensitive than a mechanical cantilever. Moreover, using OT one can also probe the cell laterally, as we also have shown recently by pulling membrane tethers and locally measuring the viscoelastic properties of the membrane^[23]. When analyzed with AFM in axial/vertical indentation, the cells show elastic modulus values even three orders of magnitude higher than those obtained with OT. This highlights the fact that the cells are sensitive to the applied forces and the loading rates (measured in N/s)^[24] because of their viscoelastic, inhomogeneous and anisotropic nature. Therefore, for characterization of different cell lines it is important to complement AFM vertical indentation measurements by OT measurements following the same scheme^[25–27].

In AFM and OT techniques, where the cells are indented axially for elasticity measurements, only the axial force is taken into account. We introduce here, the concept of total force which comprises both axial and lateral force components. Axial indentation in OT can be monitored using video tracking^[28] or a photo diode QPD^[26]. In both of these approaches, a trap bead is moved against the stationary cell and only the axial component of the force is monitored. We have previously demonstrated^[19] the axial indentation of a cell by moving the cell against the trapped bead while monitoring the axial as well as the lateral components of displacements using QPD. This mechanism is more reliable than the trap movement since it avoids possible drifts and changes in trap focusing size.

Since the cytoskeletal architecture is not uniform, the bead indentation is not perfectly axial even at the center of the cell. We monitored the lateral components of the bead displacement and found that indeed the indentation force was not perfectly axial. The axial force that accounts for cell vertical indentation appears to be just a component of the total force, applied to the cell. We propose an approach to calculate the total force generated during cell indentation and the direction of the indentation.

Following our previous work^[19], we have studied the elastic modulus of HBL-100 and MDA-MD-231 using OT with axial indentation and 3-D force monitoring mechanism. We have studied also the effect of lateral components of the applied force on elastic modulus that are being lost during most of the cell indentation experiments. The combination of axial and lateral components of the total force leads to a more accurate measurement.

2. Experimental approach and data analysis

Cell stiffness, expressed by the elastic modulus, is measured locally by vertical indentation using a trapped microbead as probe. The relative position between the trapped microbead and the cell to be probed is shown in Figure 1 in two optical microscope images taken at two different instances before the measurement.

The experimental approach is illustrated in Figure 2. The microbead is optically trapped above the cell, without touching it (left image). Then the stage is displaced vertically, first down and then up following one period of a sinusoidal wave (amplitude = 1 μm , period $T = 5$ s). When the cell intercepts the bead, it exerts a force causing a displacement BD of the bead from the trap equilibrium position. The bead also begins to push the cell, inducing an indentation Id in the cell membrane. Since the displacement of the stage, SD , is known, it means that by measuring the bead displacement BD one can easily derive the indentation Id as follows:

$$Id = SD - BD \quad (1)$$

To measure the bead displacement we employed BFP interferometry^[29], which considers the interference pattern formed by the trapping laser beam scattered by the bead in the BFP of the microscope lens. Using a convergent lens, this pattern is imaged then on a QPD. The lateral displacement of the pattern corresponds to the lateral displacement of the bead, while the change of the fringe radius is related to the vertical displacement of the bead^[19]. The displacement of the bead in all the three directions can thus be measured with nanometer precision at tens of kHz. This allows tracking the small and fast position changes that characterize the thermal motion of the bead in the trap and its interaction with the cell.

The optical setup to implement this experimental approach has been described in detail in our recent paper^[19]. Here we will describe the procedure to calculate the local elastic modulus of the cell starting from the bead displacement data. Throughout the tracking of the bead in the trap, free of any other perturbation, we determine the trap stiffness, k , with its axial components $k = (k_x, k_y, k_z)$ ^[22].

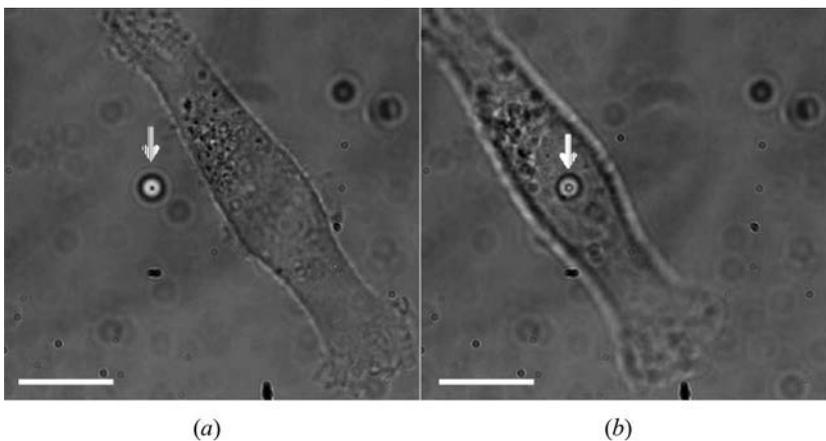


Figure 1. Optical microscope image of an HBL-100 cell and of a trapped microbead. (a) A microbead (indicated by the white arrow) is first trapped near the HBL-100 cell (cell is in focus) cultured on the coverslip; (b) the cell is displaced vertically and laterally to get the microbead in contact with the cell membrane (microbead is in focus). The scale bar represents 10 μm .

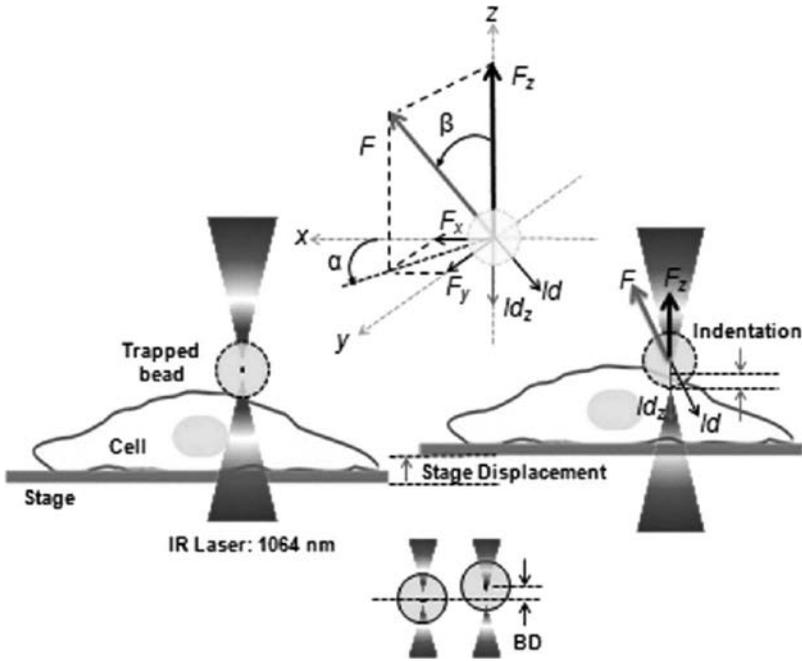


Figure 2. Experimental approach for cell vertical indentation by optical tweezers.

Since the bead in the trap behaves as in a harmonic potential well, the force $F = (F_x, F_y, F_z)$ exerted on the bead is proportional to its displacement $BD = (BD_x, BD_y, BD_z)$:

$$F_x = k_x BD_x; F_y = k_y BD_y; F_z = k_z BD_z \quad (2)$$

So, measuring the bead displacement, BD , serves both to calculate the cell indentation, Id , and the force F , exerted by the bead on the cell. The force-indentation (F - Id) curve is then used to determine the elastic moduli, using the Hertz model^[26]:

$$E = \frac{3(1 - \nu^2)F}{4Id^{\frac{3}{2}}r^{\frac{1}{2}}} \quad (3)$$

where E is the elastic modulus, r the radius of the microbead, and ν the Poisson coefficient.

Since the displacement of the stage is vertical, one expects the displacement of the bead to be also vertical. However, the experiments show that the bead is moving also laterally. This is due to the specific interaction of the bead with the cell, which is a soft body and has a non-uniform shape. As a consequence, the force exerted by the cell on the bead has a direction slightly deviated from vertical. The situation is similar for the indentation direction, as indicated in [Figure 2](#). Since with our setup we can measure bead displacements and calculate the force components in all the three directions, we analyze how much different the values calculated for the elastic modulus are when only the vertical component of the force is considered, with respect to the values obtained when the total force is considered.

The trapped bead is positioned at a small distance above the cell (left image: [Figure 2](#)). The stage (and hence the cell) is moved vertically to intercept the bead (right image: [Figure 2](#)). The force exerted by the bead on the cell produces the cell indentation. This force is determined from the displacement of the bead (down image: [Figure 2](#)). If the bead displacement is vertical, the force has only one component, F_z (upper image: [Figure 2](#)) and the indentation, Id_z is only vertical. However due to the bead-cell interaction, the bead is displaced also laterally, which corresponds to lateral force components and hence the direction of the total force, F and of the indentation, Id are deviated from the vertical direction.

Figure 3 shows an example of the stage displacement together with the bead displacement in the trap during the vertical indentation experiment. The stage is set to follow a sinusoidal movement first vertically downward and then upward. In the first half of the period the cell moves off from the trap position and thus the microbead freely moves in the trap (Brownian motion). The tracking of the microbead displacement at high frequency (e.g., 10 kHz for Figure 3) allow us to calculate the trap stiffness $k = (k_x, k_y, k_z)$ considering the real experimental conditions. For instance, for the case shown in Figure 3, using a laser power of 30 mW (at the sample plane) and a silica microbead with a radius $r = 1.5 \mu\text{m}$, we obtain a stiffness $k_x = k_y = 0.02 \text{ pN/nm}$ and $k_z = 0.015 \text{ pN/nm}$. These trap stiffness values confirm that the optical trap stiffness is lower vertically^[22]. For the second half of the period, the cell intercepts the microbead and pushes it up (Figure 3, z (▽)) until the stage/cell begins to move back to the initial position. However, even if the movement of the cell is only in the vertical direction, from the figure one can observe also lateral x and y displacements of the microbead.

Using the force formula (2) we can calculate the force components, the total force and its orientation. The force amplitude and orientation are represented in Figure 4. All the force components increase during the indentation and decrease during the retraction phase due to the cell-bead interaction. The total force F (○) is however larger than the vertical force F_z (▽), due to the lateral components $F_x(x)$ and $F_y(+)$. The orientation of the total force is not vertical and changes considerably, as indicated by the excursion of α and β (Figure 4(b)). The amplitude and direction fluctuations of the force indicate that the total force is a more adequate parameter than the vertical component only.

The next step is to analyze the force-indentation curve. We assume that the indentation is the same for the two cases, total force and vertical force. The total force-indentation and vertical force-indentation curves are represented in Figure 5. They are different mainly in the regions of minimum and maximum forces. To determine the elastic modulus from the force-indentation curve we select a range of forces going from the $0.1F_{max}$ to $0.9F_{max}$, to eliminate the effect of force saturation. This prevents the need to define the point of contact during cell-bead interaction and excludes the last part of the stage movement. The procedure is similar to data processing in AFM experiments. The elastic modulus formula (3) can be expressed as a function of indentation Id :

$$F = E \frac{4r^{\frac{1}{2}}}{3(1 - \nu^2)} Id^{\frac{3}{2}} \quad (4)$$

where E is to be determined using the $F(Id)$ curve. Since the equation above is not linear, we proceed with linearization in terms of Id :

$$F^{\frac{2}{3}} = E^{\frac{2}{3}} * C * Id \quad (5)$$

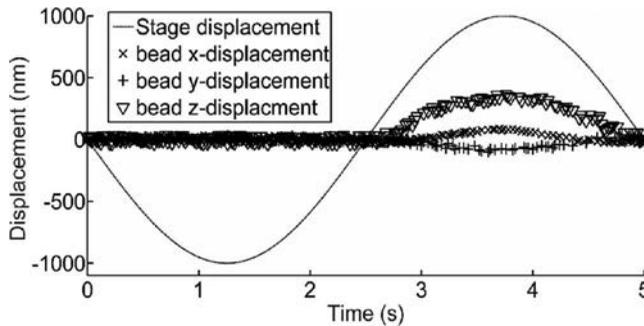


Figure 3. Displacement of the stage (cell) and of the microbead in the trap during the experiment. The sinusoidal movement of the stage make the microbead displacements: in x , y and z . In the first half of the period, the cell moves down and hence the microbead moves freely in the trap. At the beginning of the second half of the period, when the cell intercepts the microbead and pushes it up, the displacement of the bead in z begins to be significant and it is accompanied by smaller lateral displacements in x and y .

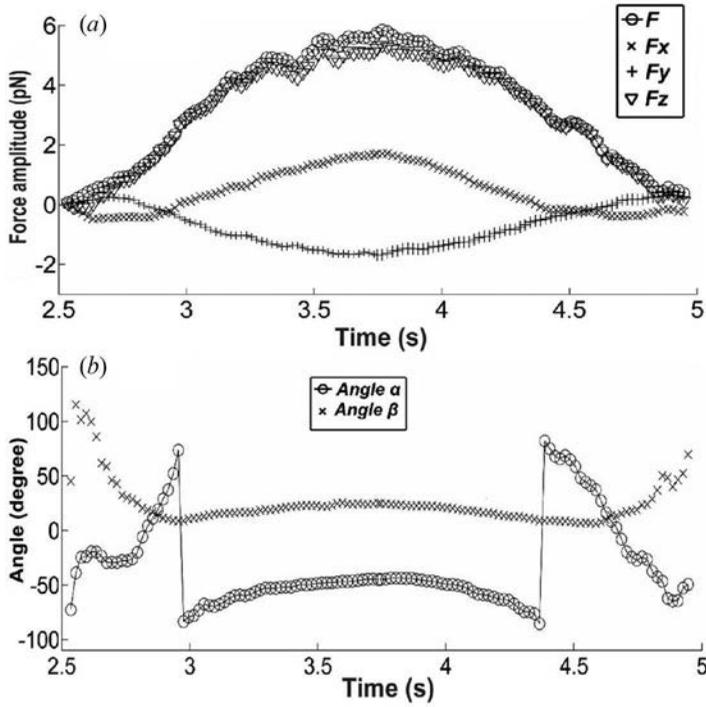


Figure 4. Force excursion vs time during the vertical indentation. (a) Total force F and force components: F_x , F_y and F_z ; (b) The orientation of the total force F : angle α and angle β (angles defined in Figure 1).

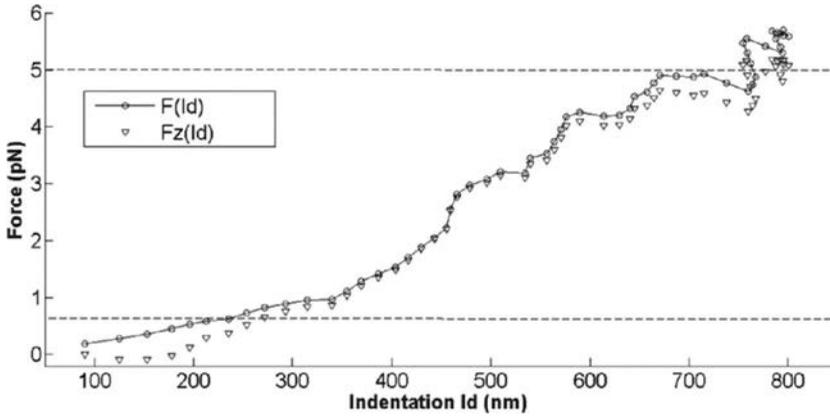


Figure 5. Force-indentation curve for total force F , and the vertical force F_z . The dashed lines define the force range where the fit is applied.

where C is a constant including all the other constants in formula (4). Fitting linearly the $F^{2/3}(I_d)$ curve above, one can easily determine the value of the elastic modulus E .

In section 3 we present cell preparation followed by results and discussion in section 4, where we will discuss the results obtained from measurements from two types of breast cancer cell lines: MDA-MB-231 (basal aggressive cancer cells) and HBL-100 (normal myoepithelial cells).

3. Cells preparation

HBL-100 is an immortalized human cell line, which was developed from the milk of a 27-year-old Caucasian woman with no evidence of breast cancer lesions^[30]. One the other hand, MDA-MB-231

is a basal breast cancer cell from metastasis. MDA-MB-231 and HBL-100 cell lines (ATCC numbers HTB-26, HTB-124 respectively) were cultured in adhesion using low glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with L-glutamine (MDA-MB-231) or Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium with L-glutamine (HBL-100), all supplemented with 10% (v/v) Fetal Calf Serum, 50 IU/ml of penicillin- streptomycin and 1 mM gentamycin. Cell cultures were maintained in 25 cm² flasks at 37°C in 5% CO₂. Cell splitting was performed every 2–3 days, as soon as the cultures reached the confluence, using 1:10 diluted 0.05% trypsin-EDTA. Cells were seeded overnight on 30 mm glass-bottom Petri dishes at a density of 2.5×10^5 cells/ml in 2 ml of medium, washed three times in PBS and rinsed with medium prior to each measurement session. All the reagents for cell culture were purchased from Gibco Life Technology. The cell culture flasks and petri dishes were purchased from Sigma-Aldrich.

4. Results and discussion

We investigated the elastic modulus of HBL-100 and MDA-MB-231 cell lines considering the optical tweezers indentation experiment described in section 2. In order to measure their elasticity, the cells were indented in the vertical direction by a 3 μ m diameter silica bead that was held in the optical trap. The stage was then moved with a sine function with an amplitude of 1 μ m and a period of 5 s. We considered indentation in the region above the nucleus in order to have a good reproducibility, as shown in Figure 1 for a representative HBL-100 cell.

By moving the cell against the trapped bead in the vertical direction, the bead displacements in axial and lateral directions were measured simultaneously by BFP interferometry. From the *BD* data, using Equation (2) we calculated the total force, F and its vertical component, F_z during the cell-bead interaction. As one can note from Figure 4, due to the presence of lateral forces F_x and F_y , the total force F is different from the vertical component F_z . Assuming the indentation Id in vertical and that in the direction of the total force are equal and using the Hertz model and the linearized fitting procedure explained in section 2, we calculated then the elastic moduli corresponding to the total force F , and the vertical force F_z . We considered both the indentation and the retraction interactions between cell and bead (see Figure 2) and calculated the indentation elastic moduli E_i , E_i^z and retraction moduli E_r , E_r^z correspondingly. We measured and compared the elastic moduli of 10 cells from MDA-MB 231 cell line and of 10 cells from HBL-100 cell line. The cells from each type of cell line were selected from two different cultures prepared in different days. The obtained elastic modulus values are presented in Table 1.

As expected, the elastic moduli corresponding to the total force are bigger than those corresponding to the vertical force only, for both types of cells and for both indentation and retraction. The maximum difference between the mean value of the elastic modulus corresponding for total force

Table 1. Elastic moduli of HBL-100 and MDA-MD-231 cells measured for indentation and retraction, resulting from the total and vertical forces; SD – standard deviation; cell number for each cell line $n = 10$.

Cell	HBL-100				MDA-MB-231			
	Indentation		Retraction		Indentation		Retraction	
	E_i	E_i^z	E_r	E_r^z	E_i	E_i^z	E_r	E_r^z
1	31	27.28	20.95	21.62	8.81	2.13	5.28	2.39
2	17.58	11.45	16.84	26.15	10.73	6.34	13.16	4.45
3	48.2	34.1	13.82	17.32	5.03	3.91	6.16	4.63
4	20.62	15.71	24.82	13.75	7.12	6.11	3.79	2.48
5	19.32	15.61	19.26	14.32	2.97	3.57	1.82	2.15
6	11.55	10	41.39	27	4.02	4.99	2.46	2.63
7	29.59	20.77	21.31	25.81	6.78	6.07	4.86	2.53
8	39.2	35.86	14.99	19.37	19.37	21.38	15.92	18.62
9	16.26	21.19	27.21	14.46	6.76	6.19	19.51	15.44
10	44.23	24.64	29.33	32.18	10.65	5.55	11.14	14.55
Mean	27.75	21.66	23	21.2	8.22	6.62	8.41	7
SD	12.71	8.88	8.21	6.38	4.69	5.37	6.12	6.49

and the elastic modulus corresponding to the vertical force is observed for HBL-100 cells. One can note from the standard deviation (SD), the values are quite dispersed. This is typical for local measurements on live cells due to the variability of the cells: each cell is different from the other cells. Therefore, a larger number of cells should be considered when the investigation will be performed to provide relevant statistical analysis for cancer cell mechanics. Nevertheless, the values from Table 1 already indicate that HBL-100 cells are stiffer than MDA-MB-231 cells. This confirms the results of other studies reported in the literature^[14], which show that basal aggressive cancer cells are softer than the non-neoplastic cells.

Figure 6 summarizes the results (mean-values). For HBL-100 cell line, the elastic modulus is larger for indentation than retraction by 17% when calculated from the total force. However no significant difference is observed for the axial force (only 2%). For indentation, HBL-100 cells appear to be stiffer by 22% when the total force is considered than considering only the axial force component. For retraction the difference is smaller (7.8%). In case of MDA-MB-231 cells, the indentation and retraction values for elastic modulus for both total force and axial force are almost the same, indicating a clear elastic regime. Nevertheless for indentation, the elastic modulus calculated with the total force is 19% higher than that obtained from the axial force. Similarly, the value is about 16% higher for the total force than the axial force during retraction.

The elastic modulus calculated for HBL-100 cells is larger than MDA-MB 231 cells for both indentation and retraction when estimated for total force and axial force. These measurements confirm that the metastatic MDA-MB-231 cells are softer as compared to HBL-100 cells. On the other hand, both cell types appear to be stiffer when probed with total force. This gives evidence of the contributions of lateral forces in cell bead interaction. These results suggest that considering the lateral forces provides a more accurate measurement of the effective elastic modulus, allowing a better analysis of the cell mechanics. All our measurements have been performed on the top of the cell, in a region above

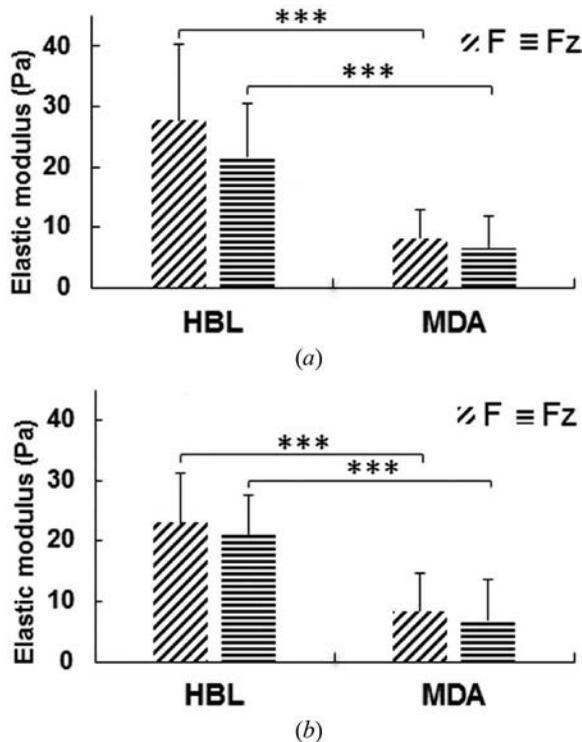


Figure 6. Elastic modulus values calculated for HBL-100 and MDA-MB-231 cells during (a) Indentation and (b) Retraction, using total force (F) and vertical force (F_z). (t-test: *** $p < 0.001$).

the nucleus. In a recently published paper^[27], using also AFM measurements at different positions of the cell, we have indicated this region as the most reliable to make a comparison between different cell lines in terms of cell elasticity. However, we expect that the differences between the cell elasticity results obtained when the total forces are considered instead of the vertical forces, be considerably bigger in the transition regions between the nucleus and the leading edge. These aspects will be studied in detail in the next future by our group.

5. Conclusions

In this work, we used OT to study the effects of the lateral components of the forces on the elastic modulus of the cells. These lateral components are mostly ignored in many biophysical indentations experiments. We used the linearized Hertz model to calculate and compare the vertical and total indentations resulting from axial and total forces, respectively. We selected two breast cancer cell lines i.e. HBL-100 (transformed) and MDA-MD-231 (metastatic) and show that the interior architecture of the cells cytoskeleton influence the elastic modulus when we are in a low force regime. Our results show that MDA-MB 231 is softer than HBL-100 cells. Moreover, elastic modulus found from total force are larger than its vertical component, suggesting that for more rigorous analysis, the total force should be considered rather than only the vertical force.

Funding

We would like to gratefully acknowledge the Applied Physics section of the International Centre for Theoretical Physics (ICTP), Trieste for partial financial support to build the Optical Tweezers setup and doctoral grant to FN through the ICTP-STEP program. Acknowledgements for partial financial support by the ERC Ideas Program through a senior grant to GS, titled: MOlecular NANotechnology for Life Science Applications: QUantitative Interactomics for Diagnostics, PROteomics and QUantitative Oncology (MONALISA QUIDPROQUO) grant # 269051.

References

- [1] Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [2] Hoffman, B.D.; Crocker, J.C. Cell mechanics: Dissecting the physical responses of cells to force. *Annual Review of Biomedical Engineering* **2009**, *11*, 259–288.
- [3] Cheng, G.; Tse, J.; Jain, R.K.; Munn, L.L. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size; and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS one* **2009**, *4*, e4632.
- [4] Ladoux, B.; Nicolas, A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on Progress in Physics* **2012**, *75*, 116601.
- [5] Fu, J.; Wang, Y.-K.; Yang, M.T.; Desai, R.A.; Yu, X.; Liu, Z.; Chen, C.S. Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nature Methods* **2010**, *7*, 733–736.
- [6] Mierke, C.T. The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation. *Reports on Progress in Physics* **2014**, *77*, 076602.
- [7] Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2011**, *61*, 69–90.
- [8] Siegel, R.; Ma, J.; Zou, Z.; Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2014**, *64*, 9–29.
- [9] Geiger, T.R.; Peeper, D.S. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* **2009**, *1796*, 293–308.
- [10] Makale, M. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* **2007**, *81*, 329–343.
- [11] Suresh, S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Materialia* **2007**, *55*, 3989–4014.
- [12] Pollard, T.D.; Cooper, J.A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **2009**, *326*, 1208–1212.
- [13] Ketene, A.N.; Roberts, P.C.; Shea, A.A.; Schmelz, E.M.; Agah, M. Actin filaments play a primary role for structural integrity and viscoelastic response in cells. *Integrative Biology* **2012**, *4*, 540–549.
- [14] Wirtz, D.; Konstantopoulos, K.; Searson, P.C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nature Reviews Cancer* **2011**, *11*, 512–522.
- [15] Bissell, M.J.; Hines, W.C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine* **2011**, *17*, 320–329.

- [16] Andolfi, L.; Bourkoula, E.; Migliorini, E.; Palma, A.; Pucer, A.; Skrap, M.; Scoles, G.; Beltrami, A.P.; Cesselli, D.; Lazzarino, M. Investigation of adhesion and mechanical properties of human glioma cells by single cell force spectroscopy and atomic force microscopy. *PLoS one* **2014**, *9*, e112582.
- [17] Li, Q.; Lee, G.; Ong, C.; Lim, C. AFM indentation study of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, *374*, 609–613.
- [18] Bodensiek, K.; Li, W.; Sánchez, P.; Nawaz, S.; Schaap, I.A. A high-speed vertical optical trap for the mechanical testing of living cells at piconewton forces. *Review of Scientific Instruments* **2013**, *84*, 113707.
- [19] Yousafzai, M.S.; Ndoye, F.; Coceano, G.; Niemela, J.; Bonin, S.; Scoles, G.; Cojoc, D. Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation. *Optics and Lasers in Engineering* **2016**, *76*, 27–33.
- [20] Neuman, K.C.; Nagy, A. Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature Methods* **2008**, *5*, 491–505.
- [21] Zhang, H.; Liu, K.-K. Optical tweezers for single cells. *Journal of The Royal Society Interface* **2008**, *5*, 671–690.
- [22] Neuman, K.C.; Block, S.M. Optical trapping. *Review of Scientific Instruments* **2004**, *75*, 2787–2809.
- [23] Tavano, F.; Bonin, S.; Pinato, G.; Stanta, G.; Cojoc, D. Custom-built optical tweezers for locally probing the viscoelastic properties of cancer cells. *International Journal of Optomechatronics* **2011**, *5*, 234–248.
- [24] Chiou, Y.-W.; Lin, H.-K.; Tang, M.-J.; Lin, H.-H.; Yeh, M.-L. The influence of physical and physiological cues on atomic force microscopy-based cell stiffness assessment. *PLoS ONE* **2013**, *8*(10), e77384.
- [25] Yehoshua, S.; Pollari, R.; Milstein, J.N. Axial optical traps: a new direction for optical tweezers. *Biophysical Journal* **2015**, *108*, 2759–2766.
- [26] Nawaz, S.; Sánchez, P.; Bodensiek, K.; Li, S.; Simons, M.; Schaap, I.A. Cell visco-elasticity measured with AFM and optical trapping at sub-micrometer deformations. *PLoS ONE* **2012**, *7*(9), e45297.
- [27] Coceano, G.; Yousafzai, M.; Ma, W.; Ndoye, F.; Venturelli, L.; Hussain, I.; Bonin, S.; Niemela, J.; Scoles, G.; Cojoc, D. Investigation into local cell mechanics by atomic force microscopy mapping and optical tweezer vertical indentation. *Nanotechnology* **2016**, *27*, 065102.
- [28] Dy, M.-C.; Kanaya, S.; Sugiura, T. Localized cell stiffness measurement using axial movement of an optically trapped microparticle. *Journal of Biomedical Optics* **2013**, *18*, 111411–111411.
- [29] Gittes, F.; Schmidt, C.F. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Optics Letters* **1998**, *23*, 7–9.
- [30] De Fromentel, C.C.; Nardeux, P.; Soussi, T.; Lavialle, C.; Estrade, S.; Carloni, G.; Chandrasekaran, K.; Cassingena, R. Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Experimental Cell Research* **1985**, *160*, 83–94.

Effect of neighboring cells on cell stiffness measured by optical tweezers indentation

Muhammad S. Yousafzai,^{a,b,c} Giovanna Coceano,^{a,b} Alberto Mariutti,^c Fatou Ndoye,^{d,e} Ladan Amin,^f Joseph Niemela,^d Serena Bonin,^g Giacinto Scoles,^c and Dan Cojoc^{a,*}

^aInstitute of Materials (IOM-CNR), Area Science Park, Basovizza, S.S. 14, Km 163.5, 34149 Trieste, Italy

^bUniversity of Trieste, PhD School of Nanotechnology, Via Alfonso Valerio 2, Trieste 34127, Italy

^cUniversity of Udine, Department of Biological and Medical Science, Santa Maria della Misericordia Hospital, Piazzale Kolbe 4, Udine 33100, Italy

^dThe Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics (ICTP), Via Beirut 6, Trieste 34149, Italy

^eCheikh Anta Diop University, Department of Physics, Dakar 5005, Senegal

^fInternational School for Advanced Studies (SISSA), Neuroscience Area, Via Bonomea 265, Trieste 34136, Italy

^gUniversity of Trieste, Department of Medical Sciences, Cattinara Hospital, Strada di Fiume 447, Trieste 34149, Italy

Abstract. We report on the modification of mechanical properties of breast cancer cells when they get in contact with other neighboring cells of the same type. Optical tweezers vertical indentation was employed to investigate cell mechanics in isolated and contact conditions, by setting up stiffness as a marker. Two human breast cancer cell lines with different aggressiveness [MCF-7 (luminal breast cancer) and MDA-MB-231 (basal-like breast cancer)] and one normal immortalized breast cell line HBL-100 (normal and myoepithelial) were selected. We found that neighboring cells significantly alter cell stiffness: MDA-MB-231 becomes stiffer when in contact, while HBL-100 and MCF-7 exhibit softer character. Cell stiffness was probed at three cellular subregions: central (above nucleus), intermediate (cytoplasm), and near the leading edge. In an isolated condition, all cells showed a significant regional variation in stiffness: higher at the center and fading toward the leading edge. However, the regional variation becomes statistically insignificant when the cells were in contact with other neighboring cells. The proposed approach will contribute to understand the intriguing temporal sequential alterations in cancer cells during interaction with their surrounding microenvironment. © 2016 Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) [DOI: 10.1117/1.JBO.21.5.057004]

Keywords: optical tweezers; cell stiffness; indentation; cancer; cell–cell interaction; microenvironment.

Paper 150853LR received Dec. 21, 2015; accepted for publication Apr. 25, 2016; published online May 27, 2016.

1 Introduction

Cancer has been extensively studied to unveil its causes and to develop therapeutic tools for cure and prevention.^{1,2} There are multitudes of factors of its occurrence but the major, known, factors lie in the genetic mutations, which lead to aberrant signaling pathways, causing these cells to become malignant.² Most studies have focused on cancer genomics to unravel malignant transformation and cancer invasion; nonetheless, it has emerged that genetics and molecular biology alone have not been able to address the problem completely.^{3–5} Therefore, efforts have been made to approach cancer from a mechanical point of view, which correlates biological processes with cell mechanics.^{6–12} Cells constantly sense mechanical forces from their microenvironment [extracellular matrix (ECM) and neighboring cells] that play a pivotal role in cell functions.^{7,13} Mechanical properties of cancer microenvironment are crucial, as they may have a role in cancer initiation, promotion, or they may cause the cancer to revert back.^{14,15} At the very early stage, when a cell turns into cancerous, a very strong interplay between microenvironment and the cell gets initiated, leading to cell cytoskeleton alterations, ECM stiffening, tumor progression, and metastasis.^{16,17}

In the past decade, the mechanical interaction of a cell with its microenvironment has garnered much attention and witnessed considerable progress.¹⁸ The microenvironment is the driving element in cell proliferation,¹⁹ viscoelasticity,^{4,7,20} functionality,²¹ and cell signaling.^{22,23} The mechanical interaction of the cell with the surrounding microenvironment is a blend of cell–matrix and cell–cell interactions. Both of these processes have prime importance for the fundamental understanding of metastasis and cell behavior in malignant conditions. This article is focused on cell–cell interaction dynamics for breast cancer cells. Cell–cell interactions are complex and include cell–cell interactions in normal tissues, primary tumor, interactions during transit at the metastasis stage, and secondary tumor site. The cell–cell mechanical interaction has variant spatial and temporal tendencies and the precise knowledge of these interactions is still lacking. Initiation, detachment, and organ-specific affinity of cancer cells to host cells in terms of mechanical interaction can reveal deeper understanding of cancer progression and metastasis.

Many studies have highlighted cell–cell interactions in terms of adhesion and other chemophysical properties, but few studies have been devoted to their mechanistic nature. The interaction between MDA-MB-231 cells and noncancerous Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells has been studied in

*Address all correspondence to: Dan Cojoc, E-mail: cojoc@iom.cnr.it

time-lapse three-dimensional (3-D) configuration by Ivers et al.,²⁴ demonstrating that microenvironment has a strong impact on the growth and dynamics of cancer cells by stressing the organ-specific affinity of cancer cells to host cells. Using the optical tweezers (OT) pulling method, Hu et al.²⁵ categorized stroma–cell interactions as tightly adherent, loosely adherent, and freely suspended. They also observed dynamic signaling pathways during cell–cell interactions coupling OT to fluorescence microscopy.²⁶ The effect of neighboring cells on cell stiffness was recently investigated for human mammary epithelial cells, representing four different phases of cancer progression, by means of atomic force microscopy (AFM).²⁷ This work reports that cell–cell contact strongly influences the cell stiffness of normal cells, while it has little effect on the cancer cells. In another recent study, Kamińska et al.²⁸ have reported a body of evidence indicating that the interaction between normal and neoplastic cell contributes to tumor growth.

In this study, we employed OT to measure cell stiffness by using a similar approach to that of AFM cell indentation. AFM and OT indentation regimes (force and loading rate) are very different, making these techniques complementary. As shown in some recent papers,^{29,30} the use of both OT and AFM enables the separation of the viscous and elastic components and provides a more robust method to investigate cell stiffness. We investigated the cell stiffness of three types of human breast cells (non-neoplastic, tumorigenic, and metastatic) in isolated and cell–cell contact conditions. The key results of our work are as follows:

1. For all the three cell lines, the stiffness of the cell in isolated condition is higher at the nucleus region and decreases toward the cell edge, confirming recent AFM results reported for similar cell lines.^{30,31}
2. Cell neighboring has a significant effect on the stiffness of metastatic cells; they become stiffer than their counterpart in isolated conditions. This change is confirmed both for the region over the nucleus and regions between the nucleus and the cell edge. The other two cell lines are less sensitive to the cell–cell contact condition. This result is stressing the importance of cell microenvironment when defining cell stiffness.

2 Materials and Methods

2.1 Cells Sample Preparation

MDA-MB-231, MCF-7, and HBL-100 cell lines (ATCC numbers HTB-26, HTB-22, and HTB-124, respectively) were cultured in adhesion using low glucose Dulbecco's modified Eagle medium with L-glutamine (MDA-MB-231 and MCF-7) or Roswell Park Memorial Institute 1640 medium with L-glutamine (HBL-100), supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 50 IU/ml of penicillin–streptomycin, and 1 mM gentamycin. Cell cultures were maintained in 25-cm² flasks at 37°C in 5% CO₂. Cell splitting was performed every 2 to 3 days, as soon as the cultures reached confluence, using 1:10 diluted 0.05% trypsin–EDTA. The day before the experiments, the cells were seeded overnight on 18-mm glass coverslips at a density of 10×10^4 cells/ml and 15×10^4 cells/ml in 2 ml of medium. Before starting the experiment, cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and rinsed with medium before every measurement session. All reagents for cell culture were purchased from Gibco

Lifetechnology; cell culture flasks and petri dishes were purchased from Sigma-Aldrich.³²

2.2 Optical Tweezers Indentation

We employed a modified Thorlabs OKBT modular setup for force measurement by the vertical cell indentation technique, previously described by Yousafzai et al.³³ Briefly, an infrared (IR) laser (single-mode Yb fiber laser YLM-5, 1064 nm, max 5 W, IPG Photonics GmbH) is focused into the sample chamber through Nikon 100× lens [NA 1.25 oil immersion, working distance (WD) 0.3] to produce a stable trap (Fig. 1). During force measurements, the cells cultured on a coverslip are kept at physiological temperature (37°C) using a temperature controller unit (RS components). The sample is imaged through CMOS camera (Thorlabs-DCC1240C). The trapped bead is positioned above the cell using a nanopiezo cube, PS, (Thorlabs, NanoMax 3-axis flexure stage), allowing to control the sample displacement with <5-nm resolution. The position of the trapped bead is monitored using back focal plane interferometry³⁴ of the IR beam scattered by the trapped bead and collected by a second microscope lens (Nikon 10×, NA 0.25, WD 7). The interference pattern is imaged by an additional convergent lens onto the quadrant photo detector (Thorlabs, PDQ80A, detector size 7.8 mm), which senses the lateral and axial displacement of the trapped bead. A laser power of 500 mW was used, which corresponds to 25 mW at

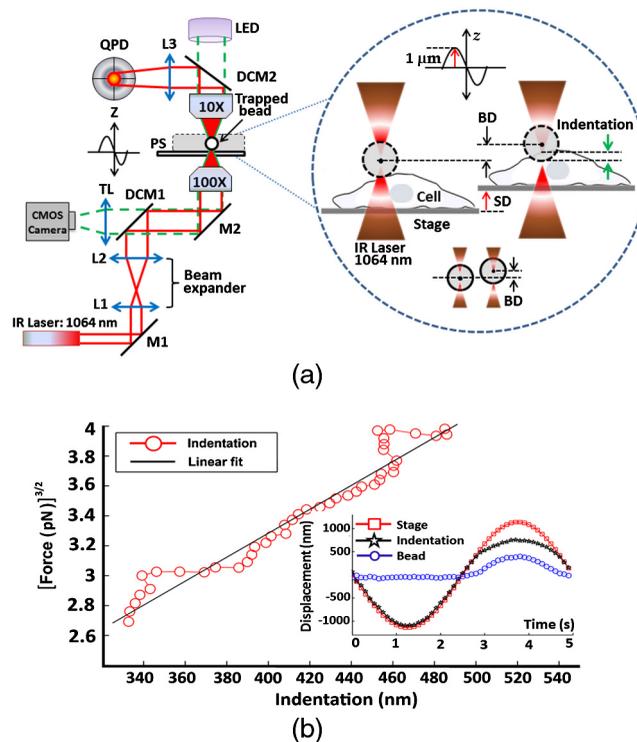


Fig. 1 (a) OT indentation and force measurement setup. IR trapping laser path (solid line) and bright-field imaging path (dashed line). QPD, quadrant photodiode; PS, 3-axis nanopiezo stage; TL, tube lens; L1 to L3, convergent lenses; M1 to M3, mirrors; and DCM, 1-2 dichroic mirrors. Inset: The cell is positioned below the trapped bead and the stage is moved up by stage displacement (SD). The cell interacts with the bead displacing it by bead displacement (BD) and causing the cell indentation. (b) Linearized force–indentation plot for elastic modulus calculation. Inset: By subtracting BD from SD, indentation is obtained.

the sample plane and was shown to be not damaging the cells and provide stable trap with a stiffness of 0.015 pN/nm. The cells were indented vertically by moving the cell holder, coupled with PS, against the trapped bead by a sinusoid signal (amplitude $A = 1 \mu\text{m}$ and one period $T = 5 \text{ s}$ with frequency of 0.2 Hz) as shown in Fig. 1, and the displacement of the bead in the trap was acquired at a 10-KHz sampling frequency.

2.3 Cell Site Selection and Cell Neighboring

Cells are indented at three locations, at the center above the nucleus (L1), out of the cell nucleus (L2), and near the leading edge (L3), as shown in Fig. 2. Each location was indented at least two times and the results were averaged for each location.

All three cell lines were cultured on the same type of glass coverslips, which act as a hard substrate to the cells (approximately 70 GPa of stiffness). Since the cell senses its surrounding, to understand the effects of neighboring cells on the mechanical properties of the cell under study, the cells were cultured with varying densities (Sec. 2.1) to get cell–cell contact [Fig. 2(b)]. An isolated cell is not touching any other cell, while a connected cell has at least two connecting sites with the neighboring cells. The surrounding cells act as mechanical cage to the cell under study.

2.4 Cell Stiffness Calculation

We investigated the elastic modulus of the three cell lines at three different locations of the cell (Sec. 2.3) using OT vertical indentation having a trap stiffness of 0.015 pN/nm. We used 3- μm silica beads as the handle to indent cells by moving the stage (cell) against the bead in a sinusoidal ($T = 5 \text{ s}$ and $A = 1 \mu\text{m}$) form and the corresponding loading rate was 5 pN/s.

The elastic modulus was calculated using the Hertz model.²⁹ The apparent elastic modulus, E , is

$$E = 3(1 - \nu^2)F / (4 \text{Id} \sqrt{\text{Id} \times R}), \quad (1)$$

where R is the bead radius, F is the force, $\nu (=0.4)$ is the Poisson ratio, and Id is the indentation, calculated as (see inset Fig. 1(b))

$$\text{Id} = \text{SD} - \text{BD}. \quad (2)$$

The elastic modulus formula [Eq. (1)] can be expressed as a function of indentation, Id , as

$$F = E \left[(4\sqrt{r}) / (3(1 - \nu^2)) \right] \text{Id}^{2/3}. \quad (3)$$

Linearizing the preceding equation in terms of Id leads to

$$F^{3/2} = E^{3/2} \times C \times \text{Id}, \quad (4)$$

where C is a constant including all the other constants in Eq. (3). By fitting linearly the $F^{3/2}$ curve, one can easily determine the value of the elastic modulus E .

2.5 Immunostaining and Confocal Microscopy Imaging

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde containing 0.15% picric acid in PBS, saturated with 0.1 M glycine, permeabilized with 0.1% Triton X-100, saturated with 0.5% BSA in PBS (all from Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) and then incubated for 40 min with Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland). Cells were further washed, before mounting in Vectashield (VECTOR Laboratories, Burlingame, California) incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (1:500) in PBS for 5 min. All the incubations were performed at room temperature (20°C to 22°C). Cells were examined using a Leica DMIRE2 confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany) equipped with DIC and fluorescence optics, diode laser 405 nm, Ar/ArKr 488 nm, and He/Ne 543/594 nm lasers. The fluorescence images (1024 × 1024 pixels) were collected with a 60× and 1.3 NA oil immersion objective.

3 Results

3.1 Stiffness at Different Subcellular Regions

A wide range of approaches like AFM, optical starching, and micropipette aspiration have been used to study viscoelastic properties of cellular subregions.^{27,35–37} We used OT for the first time to study cell stiffness at three different cell locations. All three cell lines in isolated condition are indented at the three subregions as indicated in Fig. 2(a). The results [Fig. 3(a) and Table 1] show a descending trend in elastic modulus from nuclear region toward the leading edge. All three cell lines exhibit higher stiffness at the center (L1) than the intermediate position (L2) yet having higher value than position L3 near the leading edge. The elastic modulus values at the three locations

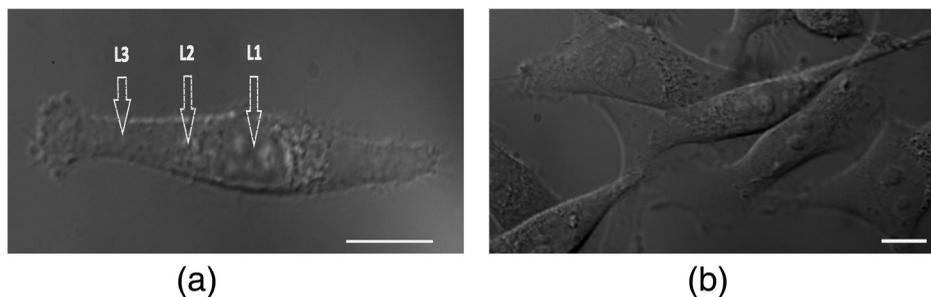


Fig. 2 Differential interference contrast (DIC) image of MDA-MB-231 cells cultured on glass substrate. Cell is categorized as (a) isolated cell: when there is no interaction with any other cell and (b) connected cell: when the cell interacts with two or more cells. Each cell is indented at three locations: L1—above nucleus, L2—intermediate position (cytoplasm), and L3—near the leading edge (a). Scale bars are 10 μm .

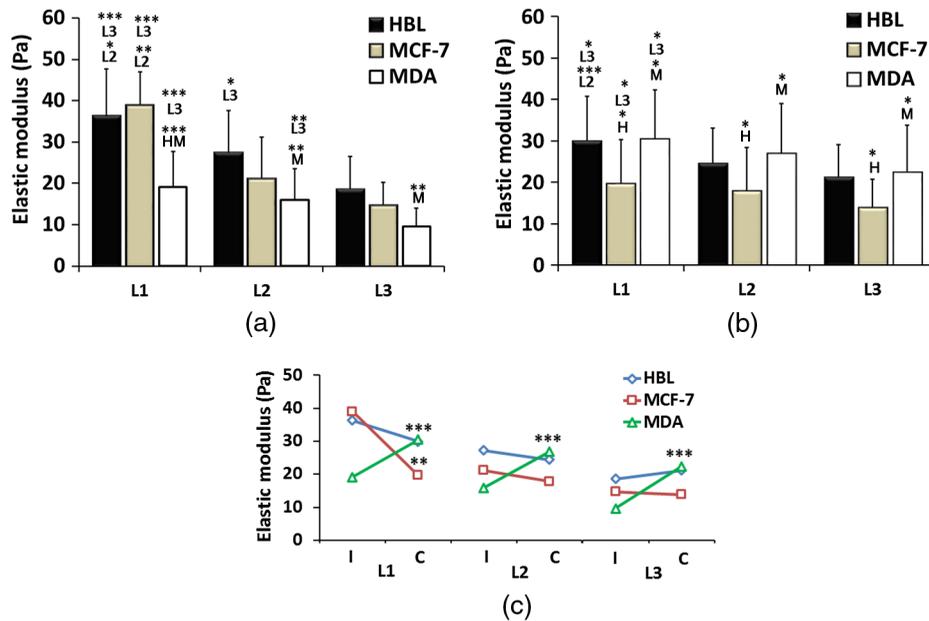


Fig. 3 (a) Isolated cells: all the three cell lines have descending character for stiffness, higher at the center and decreasing toward the leading edge. (b) Connected cells: stiffness decreases from nuclear region to the leading edge. Cell lines exhibit the same stiffness in the cytoplasm and leading edge indicating that cell cytoskeleton organization during interactions becomes more dynamic. MDA-MB-231 shows the same stiffness as HBL-100. (c) Elastic moduli variation in isolated (I) and connected (C) conditions in nuclear (L1), cytoplasm (L2), and leading edge (L3) regions. MDA-MB-231 exhibits a more prominent variation in connected conditions as compared to HBL-100 and MCF-7. The symbols represent H: HBL-100 and M: MCF-7. (*t*-test: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001).

Table 1 Elastic modulus measurements (\pm standard error of the mean) for all three cell lines measured in isolated and connected conditions in three different cellular subregions (L1, L2, and L3).

	Cell stiffness at cellular subregions in isolated condition						Cell stiffness at cellular subregions in cell-cell contact condition					
	HBL-100		MCF-7		MDA-MB-231		HBL-100		MCF-7		MDA-MB-231	
	<i>E</i> (Pa)	<i>n</i>	<i>E</i> (Pa)	<i>n</i>	<i>E</i> (Pa)	<i>n</i>	<i>E</i> (Pa)	<i>n</i>	<i>E</i> (Pa)	<i>n</i>	<i>E</i> (Pa)	<i>n</i>
L1	36 ± 11	10	39 ± 8	10	19 ± 9	14	30 ± 11	29	20 ± 11	15	31 ± 12	14
L2	27 ± 10		21 ± 10		16 ± 8		25 ± 9		18 ± 11		27 ± 12	
L3	19 ± 8		16 ± 6		10 ± 4		21 ± 8		14 ± 7		23 ± 11	

are statistically significant and in agreement with studies carried out by other groups using different biophysical methods.^{27,36,37}

Stiffness values for single cells indented at the center (L1) show that the most aggressive cells (MDA-MB-231) are less stiff as compared to HBL-100 and MCF-7. These values agree with other results reported in the literature, showing that metastatic cells are softer as compared to their noninvasive counterparts.^{4,18,27,35,38} The HBL-100 and MCF-7 cells are twofold stiffer than MDA-MB-231 at the nuclear region (L1) and can be used to distinguish between cells with different aggressiveness levels. These results also act as first test for the feasibility of our successive experiments on cell stiffness as a function of cell subregions and of cell-cell interaction.

When comparing different cellular subregions, for HBL-100 cells, the stiffness at the nuclear region is 25% higher than that corresponding to the cytoplasm region and 47% higher than that corresponding to the leading edge. For MCF-7 cells, the

stiffness decreases as 46% and 59%, whereas for MDA-MB-231 it diminishes by 16% and 47%, respectively, for cytoplasm and the leading edge. All three cell lines have significantly different stiffness values at the nuclear region and the leading edge, showing a larger contribution of the nucleus toward mechanical architecture.³⁷ Our results stress that for single-cell force measurement, the region of interest affects mechanical observation and hence should be considered for mechanical studies of the cells.

3.2 Cell-Cell Contact Alters Cell Stiffness

To investigate the stiffness variation during interactions with neighboring cells, we analyzed cells from three different cell lines in contact conditions [Fig. 2(b)]. Prominent variation in stiffness was observed as summarized in Table 1 and shown in Fig. 3(b). Analyzing the cellular regional variation, one can note that the cell stiffness of HBL-100 and MCF-7 cells decreases by

(17% and 10%) and (30% and 30%), while for MDA-MB-231 it decreases by 13% and 26% at the cytoplasm and leading edge regions as compared with the nuclear region. Also, in contact conditions, cell stiffness at the leading edge has a significantly lower value than at the nuclear region. However, when compared to the isolated condition, one observes that the stiffness of the MD-MB-231 cells in connected condition increases and becomes comparable with that of the HBL-100 cells for all the three locations [Fig. 3(b)]. This behavior is opposite to the behavior of the other two cell lines. Comparing the stiffness values corresponding to regional locations in isolated and connected conditions, we find a decreasing trend for HBL-100 and MCF-7, whereas MDA-MB-231 stiffness is increased, as shown in Fig. 3. For HBL-100 and MCF-7, stiffness at nuclear region decreases by 17% and 49%, respectively. MDA-MB-231 responds differently to cell neighboring and becomes stiffer in contact condition. Stiffness increases by 39%, 41%, and 57% in L1, L2, and L3 locations, respectively. The higher increment at the leading edge in contact condition suggests that MD-MB-231 orchestrates more cytoskeletal components at the leading edge and applies greater force on the membrane.

HBL-100 and MDA-MB-321 cells do not express E-cadherins, which are involved in cell-cell tight junctions, whereas MCF-7 does express them; hence, they experience different interaction mechanisms.^{27,35} Furthermore, HBL-100 (nontumorigenic) and MCF-7 (tumorigenic) are noninvasive, but MDA-MB-321 is invasive; therefore, their response to the interacting cells might be different. Lee et al.³⁵ have shown that MDA-MB-231 cells are more mobile in the active interaction environment of MCF-10A (nontumorigenic epithelial cell line and normal counterpart of MCF-7) monolayer as compared to noninvasive MCF-7 cells. They showed that invasive cells (MDA-MB-321) are softer and more sensitive to physical forces, if applied on the lateral surfaces of the cells. Our results show that MDA-MB-231 cells, though softer in isolated conditions, feel stressed in interacting environment whereas the MCF-7 and HBL-100 turns softer during cell-cell interactions, in agreement with the results reported by Kristal-Muscal et al.³⁸ They demonstrated that the cells with metastatic potential (MDA-MD-231) generate greater forces despite their soft character as compared to low metastatic potential cell (MDA-MB-468) and benign cells (MCF-10A), which do not indent the substrate at all.³³

4 Discussion

Cancer cell metastasis formation is a complicated mechanism. The evidence indicates that in the cancer microenvironment, ECM becomes stiffer as compared to its normal state, but cells behave softer³⁹ and exhibit increased actomyosin cortex contractility.^{33,34} Furthermore, some studies show that by altering the mechanics of cell microenvironment, cancerous cells may act as normal ones.^{14,15}

Interesting results on the effect of cell-cell contact on cell motility and cell adhesion have been reported for MDA-MB-231 cells.³⁵ These results indicate that the motility of MDA-MB-231 cells, which are mechanically soft, is dramatically enhanced when they are surrounded by breast epithelial MCF-10A cells, which are mechanically stiff, compared with single-cell motility within a cluster of MDA-MB-231 cells (high density) or single MDA-MB-231 cells (low density) in the absence of non-neoplastic MCF-10A cells. Another interesting result is the cell-substrate contact/interaction effect on the cell's

ability to apply forces,³⁸ showing that cells of higher metastatic potential develop stronger forces on gels stiff enough to provide grip handles yet soft enough to indent, whereas benign cells did not indent substrates at all.

Our work was focused on cell stiffness as a marker to distinguish between cells at different stages of cancer progression. It is known that the values obtained for the cell stiffness might vary depending on the measurement method; therefore, employing complementary techniques (e.g., OT and AFM) increases the reliability.³⁰ Using OT, we show that for the isolated cell condition, the metastatic cells are softer than tumorigenic and non-neoplastic cells and cell stiffness decreases from the nuclear region toward the cell edge for all the three cell models. The results are confirmed by measurements using peak force AFM in our recent work³⁰ and in that of another group.³¹ These results are in line with the general observation that malignant cells are softer than normal cells across a range of different cancers.¹³ However, our results appear partially in contradiction with those obtained by Guo et al.²⁷ Using AFM to measure cell stiffness, they report that metastatic cells are slightly stiffer than tumorigenic cells and only minor or negligible differences in stiffness differentiate the cellular regions. In our opinion, the difference might be attributed to the differences between the cell models (only the metastatic cells MDA-MB-231 are identical) and the difference between the indentation regimes (indentation force, indentation range, and loading rate). Moreover, the experiments by Guo et al. were performed at room temperature, while ours were conducted at the physiological temperature (37°C). It is well known that temperature strongly influences cell health, behavior, and properties (mechanical properties included).

We found that for the metastatic cells MDA-MB-231 cell neighboring induces a significant increase in stiffness. This trend is confirmed for all three locations of measurements, above the nucleus, the cytoplasm, or near the cell edge. The cell stiffness for the other two cell lines (HBL-100 and MCF-7) decreases significantly for the nuclear region and shows minor changes for the other two regions. To our knowledge, this result points to the importance of cell environment when defining cell stiffness. The result is partially in contradiction with that showing the microenvironment condition has little or no effect on immortal and metastatic cells reported by Guo et al., probably due to the same aforementioned factors for the cell stiffness variation with the cell regions. Trying to associate the changes of cell stiffness with the cytoskeleton rearrangements, we analyzed F-actin organization in isolated and connected cells. Some sample images using immunofluorescence confocal microscopy are shown in Fig. 4 for HBL-100 and MDA-MB-231 cells. While for the HBL-100 cells, we have not observed a significant difference between the actin fibers organization in isolated and connected cells, the actin stress fibers seem to be enforced for the connected MDA-MB-231 cells with respect to the isolated cells. This result has to be further confirmed by a more thorough analysis of the indentation regions using higher spatial resolution or combined techniques. In fact, combining immunofluorescence confocal microscopy and peak-force modulated AFM, Calzado-Martin et al. recently showed that actin stress fibers are present at apical regions of healthy cells, while in tumorigenic cells they appear only at basal regions, where they cannot contribute to stiffness as probed by AFM. These results substantiate that actin stress fibers provide a dominant contribution to stiffness in healthy

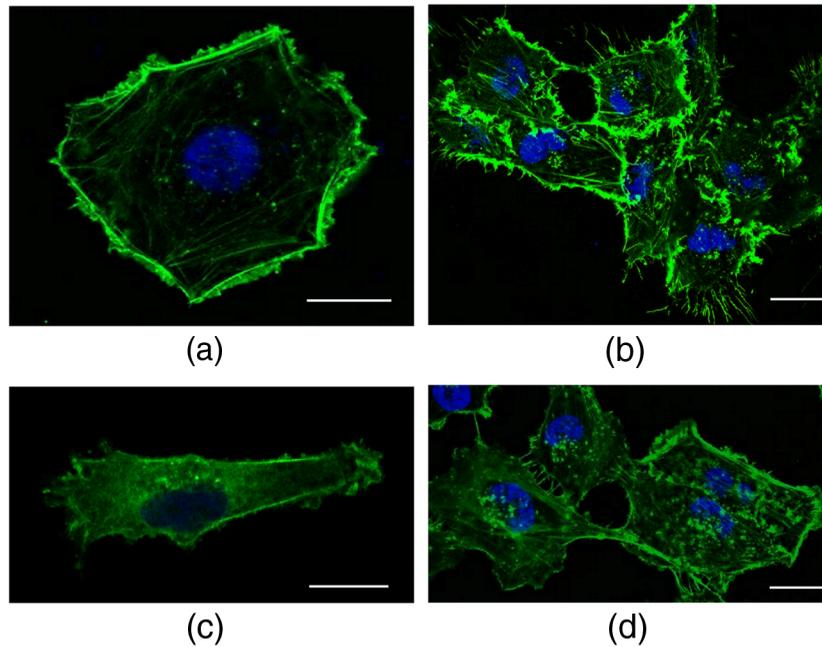


Fig. 4 Immunofluorescence images for F-actin networks in HBL-100 cell [(a) isolated and (b) connected] and MDA-MB-231 cells [(c) isolated and (d) connected]. Scale bars are 10 μm [(a) and (c)] and 20 μm [(b) and (d)].

cells, while the elasticity of tumorigenic cells appears not predominantly determined by these structures. The combination of these two techniques could be applied in the future to investigate also the differences in actin fibers organization for isolated and connected cells.

5 Conclusions

We report an OT approach to investigate on the change of the cell stiffness determined by cell neighboring, and we show that the metastatic cells are those which are influenced the most. By indenting cells axially on the top, we demonstrate that stiffness measurements are sensitive to the cellular subregions as well as the interacting microenvironment. Altogether, our results point to the importance of cell microenvironment when defining cell stiffness. In future studies, we will apply this technique also to investigate effect of ECM on cell–cell interaction and to study the related mechanotransduction pathways. More rigorous mechanical studies on cancer cells corresponding to different range of forces and different microenvironmental conditions may further unravel aspects of cancer progression and metastasis formation. Models of cell cytoplasm behavior and reorganization, like the poroelastic material model,⁴⁰ will help a better understanding of the relation between the cytoskeleton structure and cell stiffness. Cells in 3-D rather than 2-D cell neighboring would be very interesting to be investigated and probably the results will show more variations in terms of cell stiffness. Engineering 3-D cell structures is already a reality,⁴¹ but measuring cell stiffness is unfortunately still impossible with OT or AFM in these conditions. Different probing approaches should be developed, which represents the challenge for the future.

Acknowledgments

We would like to gratefully acknowledge the Applied Physics Section of the International Centre for Theoretical Physics, Trieste, for partial financial support to build the OT setup, and

partial financial support by the European Research Council (ERC) Ideas Program through a senior grant to Giacinto Scoles, titled Molecular Nanotechnology for Life Science Applications: Quantitative Interactomics for Diagnostics, Proteomics and Quantitative Oncology (MONALISA QUIDPRO-QUO) Grant No. 269051.

References

1. D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell* **100**(1), 57–70 (2000).
2. D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell* **144**(5), 646–674 (2011).
3. R. Siegel et al., "Cancer statistics, 2014," *CA: Cancer J. Clin.* **64**(1), 9–29 (2014).
4. S. Suresh, "Biomechanics and biophysics of cancer cells," *Acta Mater.* **55**(12), 3989–4014 (2007).
5. G. P. Gupta and J. Massagué, "Cancer metastasis: building a framework," *Cell* **127**(4), 679–695 (2006).
6. H. Huang et al., "Cell stiffness and receptors: evidence for cytoskeletal subnetworks," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**(1), C72–C80 (2005).
7. I. Schoen, B. L. Pruitt, and V. Vogel, "The Yin-Yang of rigidity sensing: how forces and mechanical properties regulate the cellular response to materials," *Annu. Rev. Mater. Res.* **43**, 589–618 (2013).
8. Q. Wen and P. A. Janmey, "Effects of non-linearity on cell–ECM interactions," *Exp. Cell Res.* **319**(16), 2481–2489 (2013).
9. T. R. Geiger and D. S. Peeper, "Metastasis mechanisms," *BBA* **1796**(2), 293–308 (2009).
10. M. Makale, "Cellular mechanobiology and cancer metastasis," *Birth Defects Res. Part C* **81**(4), 329–343 (2007).
11. N. Guz et al., "If cell mechanics can be described by elastic modulus: study of different models and probes used in indentation experiments," *Biophys. J.* **107**(3), 564–575 (2014).
12. P. Schedin and A. Elias, "Multistep tumorigenesis and the microenvironment," *Breast Cancer Res.* **6**(2), 93–101 (2004).
13. C. T. Mierke, "The fundamental role of mechanical properties in the progression of cancer disease and inflammation," *Rep. Prog. Phys.* **77**(7), 076602 (2014).

14. M. J. Bissell and W. C. Hines, "Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression," *Nat. Med.* **17**(3), 320–329 (2011).
15. D. E. Ingber, "Can cancer be reversed by engineering the tumor micro-environment?" *Semin. Cancer Biol.* **18**(5), 356–364 (2008).
16. D. Wirtz, K. Konstantopoulos, and P. C. Searson, "The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis," *Nat. Rev. Cancer* **11**(7), 512–522 (2011).
17. T. Risler, "Focus on the physics of cancer," *New J. Phys.* **17**(5), 055011 (2015).
18. B. D. Hoffman and J. C. Crocker, "Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force," *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **11**, 259–288 (2009).
19. G. Cheng et al., "Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells," *PLoS One* **4**(2), e4632 (2009).
20. B. Ladoux and A. Nicolas, "Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues," *Rep. Prog. Phys.* **75**(11), 116601 (2012).
21. J. Fu et al., "Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates," *Nat. Methods* **7**(9), 733–736 (2010).
22. R. S. Gieni and M. J. Hendzel, "Mechanotransduction from the ECM to the genome: are the pieces now in place?" *J. Cell. Biochem.* **104**(6), 1964–1987 (2008).
23. D. E. Jaalouk and J. Lammerding, "Mechanotransduction gone awry," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**(1), 63–73 (2009).
24. L. P. Ivers et al., "Dynamic and influential interaction of cancer cells with normal epithelial cells in 3D culture," *Cancer Cell Int.* **14**(1), 108 (2014).
25. S. Hu et al., "Manipulating cell adhesions with optical tweezers for study of cell-to-cell interactions," *J. Biomed. Nanotechnol.* **9**(2), 281–285 (2013).
26. X. Gou et al., "Applying combined optical tweezers and fluorescence microscopy technologies to manipulate cell adhesions for cell-to-cell interaction study," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **60**(8), 2308–2315 (2013).
27. X. Guo et al., "The effect of neighboring cells on the stiffness of cancerous and non-cancerous human mammary epithelial cells," *New J. Phys.* **16**(10), 105002 (2014).
28. K. Kamińska et al., "The role of the cell–cell interactions in cancer progression," *J. Cell. Mol. Med.* **19**(2), 283–296 (2015).
29. S. Nawaz et al., "Cell visco-elasticity measured with AFM and optical trapping at sub-micrometer deformations," *PLoS One* **7**(9), e45297 (2012).
30. G. Coceano et al., "Investigation into local cell mechanics by atomic force microscopy mapping and optical tweezer vertical indentation," *Nanotechnology* **27**(6), 065102 (2015).
31. A. Calzado-Martin et al., "Effect of actin organization on the stiffness of living breast cancer cells revealed by peak-force modulation atomic force microscopy," *ACS Nano* **10**(3), 3365–3374 (2016).
32. C. C. De Fromentel et al., "Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information," *Exp. Cell Res.* **160**(1), 83–94 (1985).
33. M. S. Yousafzai et al., "Substrate-dependent cell elasticity measured by optical tweezers indentation," *Opt. Lasers Eng.* **76**, 27–33 (2016).
34. F. Gittes and C. F. Schmidt, "Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers," *Opt. Lett.* **23**(1), 7–9 (1998).
35. M.-H. Lee et al., "Mismatch in mechanical and adhesive properties induces pulsating cancer cell migration in epithelial monolayer," *Biophys. J.* **102**(12), 2731–2741 (2012).
36. J. Guck et al., "Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence," *Biophys. J.* **88**(5), 3689–3698 (2005).
37. F. Guilak, J. R. Tedrow, and R. Burgkart, "Viscoelastic properties of the cell nucleus," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**(3), 781–786 (2000).
38. R. Kristal-Muscal, L. Dvir, and D. Weihs, "Metastatic cancer cells tenaciously indent impenetrable, soft substrates," *New J. Phys.* **15**(3), 035022 (2013).
39. P. Katira, R. T. Bonnecaze, and M. H. Zaman, "Modeling the mechanics of cancer: effect of changes in cellular and extra-cellular mechanical properties," *Front. Oncol.* **3**, 145 (2013).
40. E. Moeendarbary et al., "The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material," *Nat. Mater.* **12**(3), 253–261 (2013).
41. J. W. Haycock, "3D cell culture: a review of current approaches and techniques," in *3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, pp. 1–15, Humana Press, New York (2011).

Nom et prénoms : Fatou NDOYE

Titre de la thèse : Caractérisation des propriétés mécaniques de cellules cancéreuses en utilisant un dispositif de pince optique.

Résumé

Dans ce travail, un dispositif de pince optique (OT) comportant un module de mesure de force a été mis au point, afin d'étudier les propriétés mécaniques d'échantillons biologiques. Nous proposons une approche qui utilise une expérience d'indentation avec la pince optique afin d'examiner l'élasticité de cellules individuelles. Pour éviter des dommages aux cellules ou leur échauffement en raison de la puissance du laser, une bille sphérique de taille microscopique maintenue dans l'équilibre du piège est utilisée comme sonde et la cellule peut être déplacée contre la bille en direction axiale. Pour de petits déplacements de la bille hors de l'équilibre du piège, le potentiel de piégeage peut être considéré comme harmonique et le modèle linéaire de Hooke peut être utilisé pour évaluer la force appliquée sur la cellule et mesurer l'élasticité locale de la cellule.

Des expériences d'indentation axiale ont été réalisées pour étudier l'élasticité de cellules cancéreuses mammaires humaines, à partir de trois lignes: HBL-100 (normale), MDA-MB-231 (métastatique) et MCF-7 (luminale). Les résultats obtenus dans ces expériences ont montré que la cellule métastatique était plus souple et donc de module d'élasticité plus faible par rapport à la cellule normale myoépithéliale et celle luminale. Ce résultat confirme le caractère métastatique des cellules cancéreuses MDA-MB-231. Une étude en AFM (microscopie à force atomique) de ces cellules a également été réalisée en utilisant la même approche d'indentation. La même tendance est trouvée avec les valeurs expérimentales obtenues. De plus, au régime de force élevée comme cela est le cas dans l'AFM, la réponse cellulaire montre également des contributions visqueuses des composantes cellulaires dues au non homogénéité et au caractère visqueux des cellules. Néanmoins, avec l'OT, nous avons été en mesure de discriminer les cellules cancéreuses et les cellulaires normales, alors que les différences entre ces deux lignées cellulaires n'étaient pas significatives avec la technique AFM.

Pour évaluer l'influence de l'interaction cellulaire avec son micro-environnement, l'élasticité cellulaire a été étudiée en cultivant les cellules sur deux substrats différents: un substrat nu (plus rigide) et un substrat revêtu de collagène (plus mou). En utilisant la cellule HBL-100 en tant que modèle dans cette étude, l'élasticité de ces cellules lorsqu'elles sont cultivées sur les deux types de substrats a été évaluée en utilisant la technique d'indentation des pinces optiques. Les résultats montrent que les cellules interagissent avec leur environnement et adaptent leur élasticité au substrat le plus conforme.

Pour une analyse plus rigoureuse de l'élasticité cellulaire, la contribution des composantes latérales de la force appliquée à la cellule est évaluée pour deux types de cellules (MDA-MB-231 et HBL-100) ainsi que la variation induite sur l'élasticité de ces dernières. Les résultats issus de cette étude montrent que les cellules sont moins élastiques lorsque la composante totale de force est considérée; ce qui suggère qu'il faut tenir compte de ces paramètres dans les analyses des propriétés mécaniques de cellules.

Mots clés : pinces optiques, mesure de force, propriétés mécaniques, indentation axiale, cellule cancéreuse, microscopie à force atomique, élasticité cellulaire.

Last name and first name : Fatou NDOYE

Thesis title: Characterization of the mechanical properties of cancer cells using an optical tweezer setup.

Abstract:

In this work, an optical tweezers apparatus comprising a force measurement module is constructed in order to study the mechanical properties of biological samples. Particles of microscopic and nanometric sizes can also be manipulated and their positions determined to a nanometric accuracy. We propose an approach that uses an indentation experiment with optical tweezers to investigate the elasticity of individual cells. To avoid damage to cells or their heating because of the laser power, a spherical bead of microscopic size maintained in the trap equilibrium is used as a probe and the cell can be moved against the bead in the axial direction. For small displacements of the bead out of trap equilibrium, the trapping potential can be considered as harmonic and the linear Hooke model can be used to evaluate the force applied to the cell. Using the Hertz model, the local elasticity of the cell can be extracted.

Axial indentation experiments were carried out to study the elasticity of human mammary cancer cells, from three lines: HBL-100 (normal), MDA-MB-231 (metastatic) and MCF-7 (luminal). The results obtained in these experiments showed that the metastatic cell was softer and therefore of lower elastic modulus compared to the normal cell and the luminal cell. This result confirms the metastatic character of MDA-MB-231 cancer cells. A study by AFM (atomic force microscopy) of these cells was also performed using the same indentation approach. The same trend is found with the experimental values obtained. Moreover, at the high force regime as is the case in AFM, the cellular response also shows viscous contributions of the cellular components due to non-homogeneity and the viscous nature of the cells. Nevertheless, with OT, we were able to discriminate cancer cells and normal cells, whereas the differences between these two cell lines were not significant with the AFM technique.

To evaluate the influence of cellular interaction with its microenvironment, cell elasticity was studied culturing cells on two different substrates: a bare (more rigid) substrate, and a collagen-coated substrate (softer). Using the HBL-100 cell as a model in this study, the elasticity of these cells when cultured on both types of substrates was evaluated using the indentation technique of OT. The results show that the cells interact with their environment and adapt their elasticity to the most conforming substrate.

For a more rigorous analysis of cellular elasticity, the contribution of the lateral components of the force applied to the cell is evaluated for two cell types (MDA-MB-231 and HBL-100) as well as the induced variation on the elasticity of these. The results from this study show that the cells are less elastic when the total force component is considered; suggesting that these parameters should be taken into account in the analysis of the mechanical properties of cells.

Key words: optical tweezers, force measurement, mechanical properties, axial indentation, cancer cell, atomic force microscopy, cell elasticity.