
Application de la microscopie à force atomique (AFM) à la biologie cutanée

Anna Drillat, Gaël Runnel, Julien Chlasta, Pascale Milani⁽¹⁾

BioMeca® SAS

ENS de Lyon, site Monod, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France.

(1) Corresponding author : pascale.milani@bio-meca.com

I – Introduction

La peau constitue l'organe le plus étendu du corps humain. Elle joue un rôle de barrière, mais sert également à communiquer avec l'environnement extérieur. Elle est caractérisée par ses capacités d'élasticité et ses propriétés mécaniques qui lui sont propres et lui confèrent ses fonctions. La peau humaine est composée de plusieurs couches, chacune avec une structure et une fonction unique. Comprendre le comportement mécanique de ces différentes couches est important pour la recherche clinique et cosmétique, à titre d'exemple, pour le développement de produits de soins et la compréhension des affections cutanées.

L'un des moyens d'accéder à ces informations est l'étude de la biomécanique de la peau. Ainsi, des techniques comme l'utilisation d'un cutomètre permettent de mesurer l'augmentation d'élasticité apportée à la peau dans le cas d'injection d'acide hyaluronique(Choi et al., 2017). D'autres, s'intéressent à la structure de la peau avec des méthodes d'imagerie, notamment grâce à la microscopie optique et électronique qui a permis d'étudier des cornéocytes isolés(Barton et al., 1980).

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des processus biologiques plus complexes de la peau, le challenge est d'appréhender l'organisation mécanique de celle-ci à l'échelle subcellulaire. L'un des domaines les plus prometteurs qui a émergé au cours des dernières décennies est la nanotechnologie. Cela permet la manipulation à l'échelle nanométrique et offre de nouvelles perspectives d'étude des propriétés physicochimiques de la matière, y compris les systèmes biologiques.

Ces avancées ont montré que certaines pathologies, comme les lésions cancéreuses telles que le mélanome, présentent des propriétés mécaniques particulières et spécifiques qui leur sont propres. Sobiepanek et al., s'est intéressé à des lignées cellulaires de mélanomes humains et a notamment mis en évidence la plus faible rigidité des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (Sobiepanek et al., 2017).

Au cours de ces dernières années, des études ont également révélé que la modification des propriétés physiques des cellules et de leur micro environnement ainsi que les forces et contraintes mécaniques qui en découlent pouvaient être nécessaires dans des processus biologiques complexes tels que la cicatrisation et la morphogénèse (Chang et al., 2017; Chlasta et al., 2017).

En tant que matériau, la peau se définit comme hétérogène et dynamique, c'est donc une mécanique très complexe qu'il faut appréhender. Peu de méthodologies sont capables de rendre compte de cette complexité. Parmi les différentes approches qui ont été développées, l'AFM présente plusieurs avantages. En effet, elle offre la possibilité de combiner l'imagerie topographique et mécanique avec une résolution spatiale et une force élevée, mais aussi elle peut s'adapter à différents modèles (cellules, cryo-section, tissus...) et à différentes conditions (in vitro, in vivo, air, liquide, ajout de drogue ...). Son principe

repose sur l'acquisition de courbes de force-indentation, obtenues grâce au déplacement d'une pointe très fine, positionnée à l'extrémité libre d'un micro-levier flexible sur toute la surface d'un échantillon.

Nous décrivons ici, dans un premier temps, les principes de la microscopie de force atomique et les méthodologies proposées pour l'étude des cellules et leur microenvironnement. Nous présenterons dans un second temps deux études de cas et les méthodologies optimisées associées. L'une portera sur l'étude du stratum corneum et la capacité de l'AFM à caractériser l'état de la peau de manière non-invasive et la deuxième utilisant le pouvoir résolutif de l'AFM pour l'étude structurale du collagène dans le derme. Les perspectives pouvant être apportées à la biologie cutanée seront également abordées.

II. Application de la Microscopie à Force Atomique (AFM) à la biologie cellulaire

Le domaine de la mécanique cellulaire s'est développé ces dernières années grâce à la mise en place de nouvelles techniques de micro- et nano-manipulation. Les progrès de la nanotechnologie, avec l'émergence d'une diversité de technologies, ont permis de sonder les propriétés viscoélastiques des cellules ainsi que les interactions avec leur micro environnement. Nous pouvons noter dans les outils proposés : les microplaques (Thoumine and Ott, 1996), les pinces optiques (Hénon et al., 1999)...etc. Parmi ces techniques, la microscopie à force atomique (AFM) a connu une expansion importante. Cet instrument s'est révélé être un outil polyvalent permettant de répondre aux questions essentielles dans un contexte cellulaire et tissulaire (Kuznetsova et al., 2007 ; Chlasta et al., 2017), notamment la cartographie des propriétés mécaniques des cellules et de leurs micro environnements ou l'imagerie du remodelage matriciel (Ludwig et al., 2008). Ainsi, cet outil peut être appliqué à tous types de cellules et tissus, et présente un grand potentiel quant à l'étude de la peau. Nous allons brièvement passer en revue les principes de la microscopie à force atomique utilisés pour l'étude de la mécanique des cellules.

1. Principe général

L'AFM est une méthode relativement récente issue de la microscopie à sonde locale (SPM) développée dans les années 1980 (Binnig et al., 1986). L'AFM utilise des leviers flexibles (cantilevers), assimilés à des ressorts, pour mesurer des forces entre une sonde (la pointe AFM), fixée à l'extrémité du levier, et la surface de l'échantillon (**Fig. 1A**). Le principe repose sur le fait que la force locale entre la surface et la pointe est traduite par la déformation (déflexion) du levier. Un laser, situé sur le dessus du levier, se réfléchit sur les photodiodes du détecteur, ceci fournit des informations très précises quant à la déflexion du cantilever. En biologie, l'AFM est souvent utilisé pour imager des surfaces (topographie) et mesurer leurs propriétés mécaniques.

L'AFM peut être employé selon différents modes en fonction de l'information désirée: mode contact et mode dynamique (non contact, contact intermittent ou modulation de force...). En mode contact, la pointe est au contact de la surface de l'échantillon et une force constante est appliquée, ce qui fournit les propriétés mécaniques. En mode dynamique, le levier vibre et c'est l'oscillation du levier qui est mesurée au lieu de la déflexion statique du levier. Les échantillons biologiques étant considérés comme fragiles, les modes dynamiques, plus doux et moins invasifs, sont souvent privilégiés pour leur imagerie.

2. Imagerie et le pouvoir résolutif de l'AFM

La technique de l'AFM est une technique puissante et très résolutive qui permet notamment d'étudier la topographie des échantillons à des échelles nanométriques. Elle s'est avérée d'une grande utilité par exemple quant à l'imagerie de l'ADN dans des problématiques d'interaction ADN-protéines et a permis notamment d'étudier le positionnement et de la dynamique du nucléosome lors de la régulation des gènes (**Fig 1B**). Kashibuchi et al., a également utilisé ce potentiel afin d'observer les différences morphologiques entre les cornéocytes récoltés sur des peaux saines ou atteintes de dermatite atopique (**Fig 1C**). Ces mesures lui ont permis d'effectuer une comparaison de l'épaisseur, du volume, mais également de l'aire occupée par les cellules de la couche cornée afin de confirmer une différence entre les peaux saines et les

3. Mesure et cartographie des propriétés mécaniques

La microscopie à force atomique permet également la mesure locale de propriétés mécaniques (rigidité, visco-élasticité, adhésion...). Pour cela, l'AFM utilise le levier flexible, avec une pointe à son extrémité, pour indenter, tirer ou scanner les échantillons. Les forces appliquées sur les échantillons sont déterminées en mesurant la déflexion du levier, dont la constante de raideur (k en N/m) est connue.

En biologie, l'AFM est utilisé régulièrement pour caractériser l'aspect mécanique des cellules via la mesure du module élastique. Le module élastique, exprimé en Pascal (Pa), décrit la rigidité d'un matériau. Plus la valeur du module élastique est haute plus le matériau est rigide. Le principe repose sur l'acquisition de courbes de force-indentation, localement, sur les cellules ou sur le tissu à étudier. Les courbes de force-indentation sont acquises en approchant, indentant et décrochant la pointe de l'échantillon tout en enregistrant la déformation du levier (**Fig 1D**). La quantification du module élastique (E_a) est réalisée par l'application d'un modèle théorique (Hertz, Sneddon...) à ces courbes.

Les données issues de ce mode d'utilisation ont permis de grandes avancées en mécano-biologie et dans la compréhension de processus biologiques complexes. Ainsi, par exemple, l'AFM a montré sa capacité à sonder des cellules et mettre en relation la mécanique de la cellule et des pathologies comme le cancer. Les premières mesures sur cellules du carcinome de la vessie par AFM ont montré que les cellules cancéreuses sont moins rigides que les cellules non-cancéreuses. Des études plus poussées ont confirmé qu'une baisse du module d'Young est une caractéristique du potentiel métastatique lié à la capacité de migration de la cellule. Ces mesures sont valables pour d'autres types de cancer, mais aussi pour des cellules normales et des tissus. En biologie cutanée, la mesure du module élastique permet par exemple de mesurer l'impact de l'application d'une crème sur la peau (Bhushan, 2012).

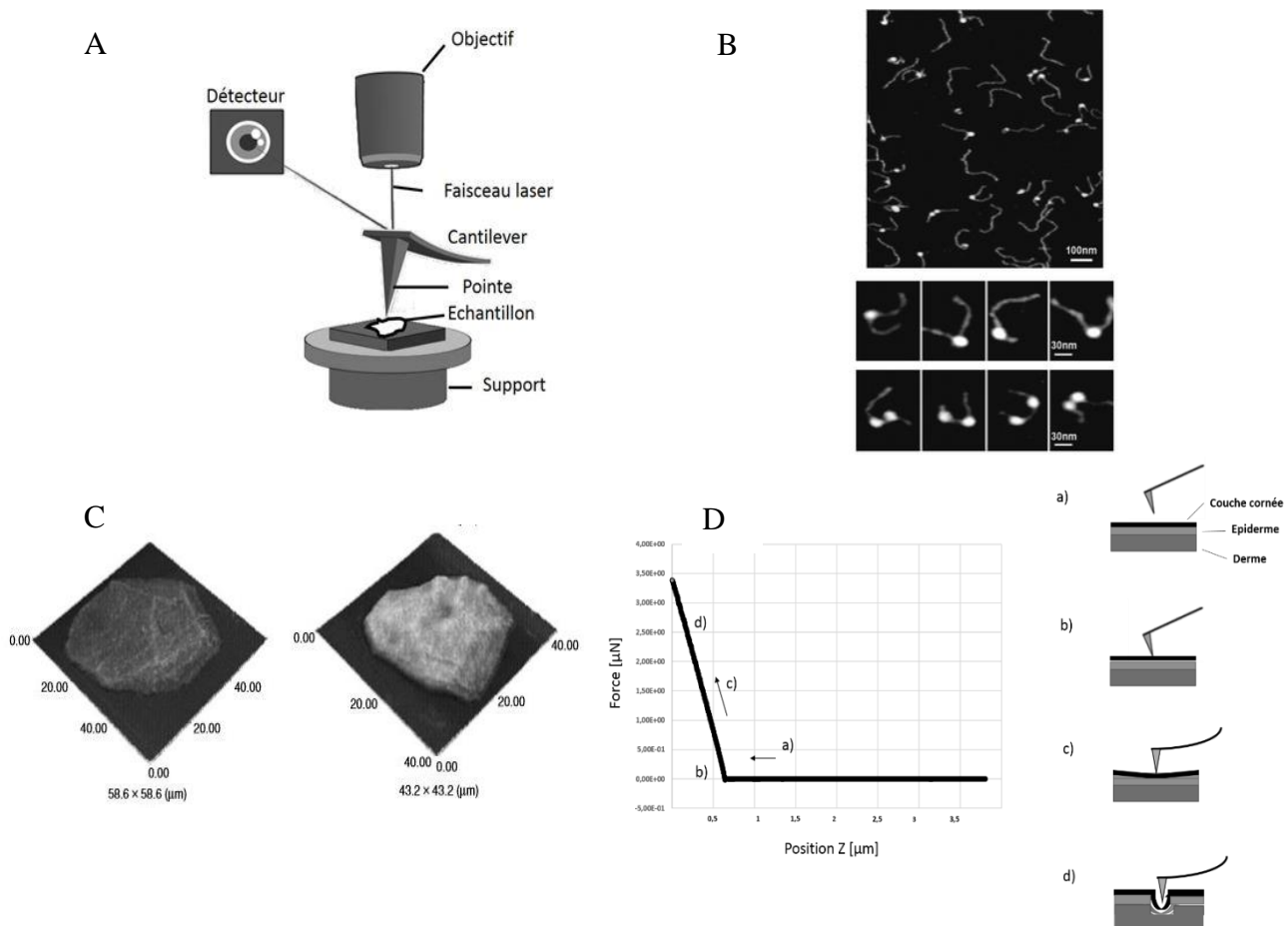


Figure 1 : A, schéma fonctionnement AFM. B, image AFM en liquide de mono- et di-nucléosomes. C, Apparence des

cornéocytes humain normaux (image de gauche) comparé à ceux de patients atteints de dermatite atopique (image de droite) (Adapté de Kashibuchi et al.). D, Pour une courbe de force, la déflexion du cantilever est mesurée lorsque l'extrémité de l'AFM se rapproche (a à d). a) Le cantilever commence à partir d'un endroit où il n'y a pas de contact avec la surface. b) La pointe entre en contact avec l'échantillon. c) Une force contrôlée est appliquée sur l'échantillon mou, ce qui entraîne une indentation dans la couche cornée. d) La pointe indente plus profondément et déforme les couches plus en profondeur: l'épiderme et le derme. Ensuite la pointe se retire de l'échantillon.

4. Les méthodes corrélatives

Parce que l'AFM est une technique pouvant donner des détails surfaciques de très haute-résolution, sa combinaison avec d'autres techniques de microscopie (optique, raman...) apporte des informations précieuses supplémentaires (identité cellulaire, localisation moléculaire, chimique...). Ces méthodes corrélatives sont notamment utiles pour l'étude des processus cellulaires.

Nous notons, entre autres, son intérêt dans l'étude de cellules de mélanome. Dans une étude menée en 2005 par Poole K et son équipe, les auteurs corrélaient la variabilité de rigidité par acquisition d'une cartographie du module élastique et la localisation de l'actine et de la $\beta 1$ intégrine (Poole and Müller, 2005).

III. Applications à la peau

La peau est l'organe qui protège le corps humain, il en va de soi qu'elle est soumise à de nombreuses contraintes mécaniques. De par sa fonction, il est primordial de pouvoir quantifier les propriétés biomécaniques du tissu cutané. Aujourd'hui, seul l'AFM est capable de fournir des informations assez précises dans ce domaine, et il est utilisé dans certaines études afin de caractériser l'état de la peau. Nous illustrerons son intérêt dans deux études de cas.

1. Etude du stratum corneum

En utilisant une méthode peu invasive comme le tape stripping, il est possible d'observer et de quantifier les propriétés de la couche la plus superficielle de la peau qu'est la couche cornée (Lademann et al., 2009). Il s'agit d'une couche de cellules aplaties, dépourvue d'organites cellulaires et remplie de kératine. Les cellules, appelées cornéocytes, présentent une enveloppe lipidique ainsi qu'une enveloppe cornifiée renfermant une matrice fibrillaire. Plus on s'approche de la surface de la peau, plus les cellules sont compactées et s'enrichissent en matrice fibrillaire (Schatzlein and Cevc, 1998). Potter et al., s'est intéressée aux propriétés mécaniques liées aux cornéocytes, en étudiant la couche cornée à différents niveaux : cellulaire, tissulaire et en considérant la couche cornée comme un organe à part entière. Ainsi, l'influence de l'hydratation cutanée, par exemple, grâce à l'application d'un produit cosmétique, entraîne une réduction du module élastique de la couche cornée.

Il peut également être intéressant de connaître les propriétés mécaniques internes des cornéocytes, et de les comparer à leur position dans la couche cornée, afin de connaître les changements de propriétés mécaniques auxquelles ils sont soumis lors de leur maturation. Cela devrait permettre d'approfondir les recherches pour fournir une meilleure compréhension des processus physiologiques et pathologiques conduisant à l'établissement puis à la desquamation de la barrière formée par la couche cornée. C'est ce qui a été proposé récemment par Milani et al. Pour cela, il a été extrait, dans un premier temps, le module élastique à différentes indentations de la surface (enveloppe lipidique) vers l'intérieur de la cellule (matrice fibrillaire) afin de représenter la rigidité des différentes strates du cornéocyte. Il a été observé que l'enveloppe lipidique qui recouvre le cornéocyte était relativement flexible en comparaison des couches plus profondes composées de fibres de kératine. Une représentation de la cellule peut ensuite être réalisée grâce à la méthode de tomographie de rigidité permettant de décrire la raideur d'un échantillon en profondeur. Dans un second temps, les données de rigidité des cornéocytes ont été

comparées à la position des cellules dans la peau. Ainsi, il a été mis en évidence une différence significative entre les cornéocytes présents en surface cutanée, plus rigides, et ceux plus en profondeur qui sont plus souples. Ceci confirme l'existence de changements morphologiques liés à la profondeur et à la maturation dans la couche cornée, et suggère également que la rigidité des cellules pourrait être utilisée comme une indication de maturation (**Fig 2**).

L'approche proposée peut potentiellement être utilisée pour évaluer diverses affections cutanées telles que le vieillissement, l'hydratation et les pathologies liées aux anomalies de la couche cornée, et ce, de manière non-invasive (Milani et al., en cours de publication).

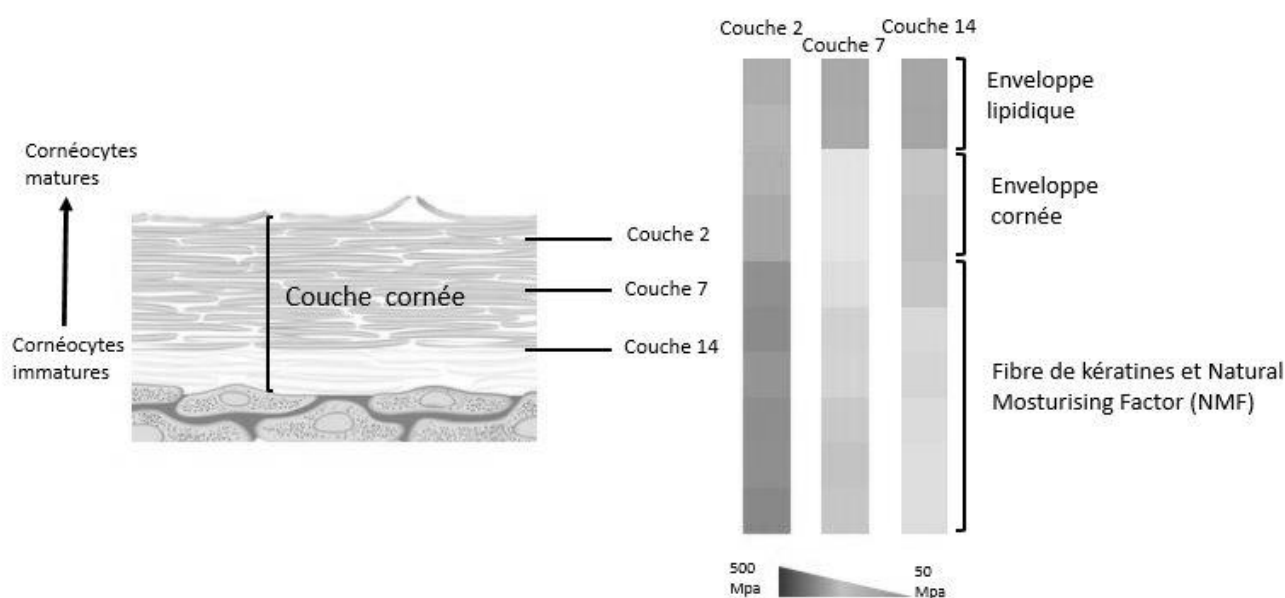


Figure 2 : Analyse tomographique de cornéocytes prélevés à différentes profondeurs chez un même sujet. Des cornéocytes les plus profonds de la couche 14, vers les plus superficiels, la couche 2. Gradient interne de raideur, qui augmente, de l'enveloppe lipidique vers les fibres de kératines. Raidissement important de la couche de kératine et de l'enveloppe cornée au cours de la maturation des cornéocytes, de la couche 14 vers la couche 2, alors que l'enveloppe cornée conserve les mêmes propriétés physiques (Adapté de Milani et al.).

2. Etude du collagène du derme

Le derme, situé sous l'épiderme, est divisé en deux zones distinctes : le derme papillaire et le derme réticulaire. Il est principalement constitué de collagène et d'élastine, synthétisé par les fibroblastes. Il existe de nombreux types de collagènes. Dans le derme réticulaire, le réseau de collagène est peu dense, avec présence de collagène XII et collagène XVI. Alors que dans le derme papillaire, on retrouve du collagène I, III, V et VI, puis plus en profondeur, du collagène XIV (Ricard-Blum and Ruggiero, 2005).

Des études AFM ont été menées sur le derme. Aziz et al., s'est notamment intéressé à la différence de qualité du derme entre une peau normale et celle étirée à l'aide d'un extenseur. Cette technique est souvent utilisée dans les cas de greffes de peau dont le succès dépend de la qualité du tissu utilisé. C'est pourquoi il est intéressant de vérifier s'il existe ou non une différence de propriétés mécaniques sur les peaux soumises à une contrainte physique. Il a pour cela utilisé l'excellent pouvoir résolutif de l'AFM afin de comparer les zones, de manière hautement précise grâce l'étude topographique des fibres de collagène présentes dans le derme. Des scans à l'échelle micrométrique ($1\mu\text{m}^2$) permettent de mettre en évidence la structure des fibres de collagène et de pouvoir comparer à la fois, la période D, le diamètre des fibres, mais également les espaces entre les périodes (**Fig 3**). Le module élastique a pu ensuite être calculé grâce aux

courbes de forces obtenues sur des fibres de collagène de peaux de mouton, avec et sans expandeur. Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence l'absence de différence entre les deux zones. Ceci confirme le fait que les peaux étendues à l'aide de l'expandeur et utilisées en cas de greffe présentent les mêmes caractéristiques, notamment du point de vue de leur organisation collagénique, que les peaux dites normales (Aziz et al., 2018).

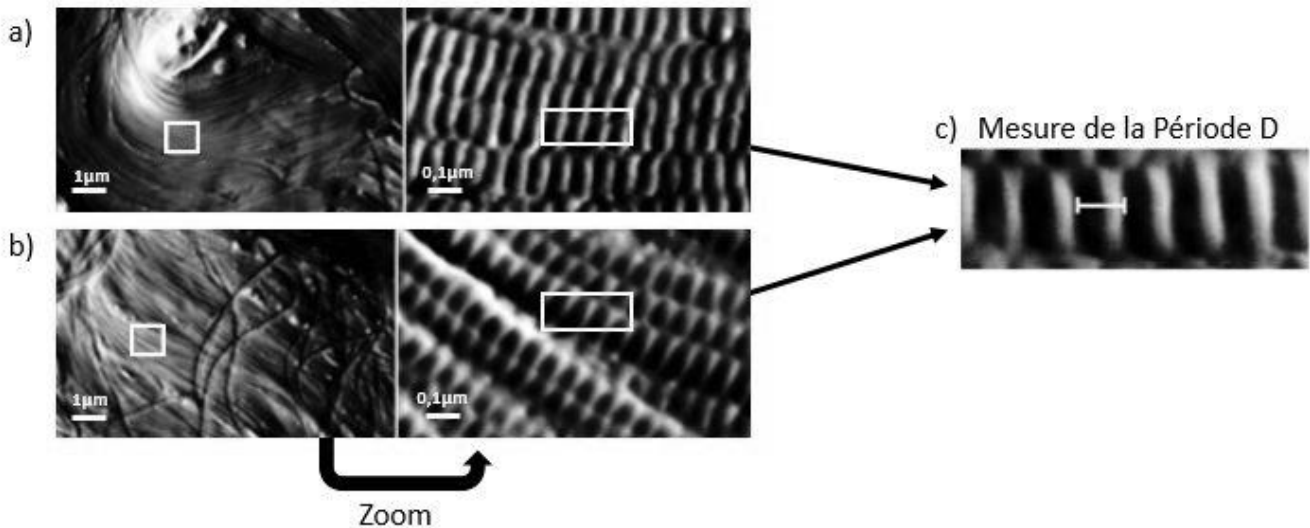


Figure 3: Observation des fibres de collagène par AFM. a) Groupe contrôle, b) Groupe expandeur, c) image haute résolution AFM de la période D des fibres de collagène (Adapté de Aziz et al.).

IV. Perceptives et Conclusion

Ces dernières années, on observe les multiplications des études en biomécanique de la peau. La capacité de l'AFM à fournir des informations à la fois sur la topographie, l'adhésion et les propriétés mécaniques du tissu est pour le moment insurpassée. Le pouvoir informatif de cet appareil est d'autant plus important lorsqu'il est utilisé en combinaison avec d'autres méthodes telles que la microscopie confocale ou la microscopie raman, qui permet par exemple de corréler comportement mécanique, structural et chimique des échantillons étudiés.

D'autre part, le développement de nouvelles méthodes computationnelles d'analyse des données brutes, via des procédés d'analyse quantitative, permet de mieux comprendre, visualiser et interpréter les résultats de l'échantillon étudié. Ainsi, il est maintenant possible de visualiser les propriétés mécaniques en 3D des échantillons, que ce soit dans un contexte cellulaire (cytosquelette, noyau..) ou tissulaire (cellules, matrice extracellulaire...), grâce au traitement informatique des courbes de force-indentation obtenues.

La démocratisation de l'AFM à la biologie va permettre d'appuyer de nouvelles avancées dans de nombreux domaines comme dans la biologie cutanée. En recherche fondamentale, des découvertes concernant la structure et les propriétés mécaniques de la peau restent à faire. En médecine, un dépistage de pathologies cutanées pourra être envisagé par la caractérisation mécanique de la peau. Enfin, en cosmétique, des tests d'efficacité et d'effets notoires des produits sur la peau pourront être effectués afin de revendiquer ou non un effet qui sera par la suite mis en avant par le marketing.

V. Références

- Aziz, J., Ahmad, M.F., Rahman, M.T., Yahya, N.A., Czernuszka, J., and Radzi, Z. (2018). AFM analysis of collagen fibrils in expanded scalp tissue after anisotropic tissue expansion. *Int. J. Biol. Macromol.* *107*, 1030–1038.
- Barton, S.P., King, C.S., Marks, R., and Nicholls, S. (1980). A technique for studying the structural detail of isolated human corneocytes. *Br. J. Dermatol.* *102*, 63–73.
- Bhushan, B. (2012). Nanotribological and nanomechanical properties of skin with and without cream treatment using atomic force microscopy and nanoindentation. *J. Colloid Interface Sci.* *367*, 1–33.
- Binnig, G., Quate, C.F., and Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* *56*, 930.
- Chang, A.C., Liu, B.H., Shao, P.L., and Liao, J.D. (2017). Structure-dependent behaviours of skin layers studied by atomic force microscopy: STRUCTURE-DEPENDENT BEHAVIOURS OF SKIN LAYERS. *J. Microsc.* *267*, 265–271.
- Chlasta, J., Milani, P., Runel, G., Duteyrat, J.-L., Arias, L., Lamiré, L.-A., Boudaoud, A., and Grammont, M. (2017). Variations in basement membrane mechanics are linked to epithelial morphogenesis. *Development* *144*, 4350–4362.
- Choi, S.Y., Kwon, H.J., Ahn, G.R., Ko, E.J., Yoo, K.H., Kim, B.J., Lee, C., and Kim, D. (2017). Hyaluronic acid microneedle patch for the improvement of crow's feet wrinkles. *Dermatol. Ther.* *30*, e12546.
- Hénon, S., Lenormand, G., Richert, A., and Gallet, F. (1999). A new determination of the shear modulus of the human erythrocyte membrane using optical tweezers. *Biophys. J.* *76*, 1145–1151.
- Kashibuchi, N., Hirai, Y., O'Goshi, K., and Tagami, H. (2002). Three-dimensional analyses of individual corneocytes with atomic force microscope: morphological changes related to age, location and to the pathologic skin conditions. *Skin Res. Technol.* *8*, 203–211.
- Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H.-J., and Fluhr, J.W. (2009). The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *72*, 317–323.
- Ludwig, T., Kirmse, R., Poole, K., and Schwarz, U.S. (2008). Probing cellular microenvironments and tissue remodeling by atomic force microscopy. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *456*, 29–49.
- Poole, K., and Müller, D. (2005). Flexible, actin-based ridges colocalise with the $\beta 1$ integrin on the surface of melanoma cells. *Br. J. Cancer* *92*, 1499–1505.
- Ricard-Blum, S., and Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol.* *53*, 430–442.
- Schatzlein, A., and Cevc, G. (1998). Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). *Br. J. Dermatol.* *138*, 583–592.
- Sobiepanek, A., Milner-Krawczyk, M., Lekka, M., and Kobiela, T. (2017). AFM and QCM-D as tools for the distinction of melanoma cells with a different metastatic potential. *Biosens. Bioelectron.* *93*, 274–281.
- Thoumine, O., and Ott, A. (1996). Influence of adhesion and cytoskeletal integrity on fibroblast traction.

