

# Journée thématique : Applications des techniques de microscopies à sondes locales à la biologie

Action Nationale de Formation – CNRS

18-19 Mars 2019

Village Vacancier, Carry-le-Rouet





## **Chères participantes, Chers participants**

Merci de votre participation à cette journée thématique dédiée aux avancées actuelles sur les applications des techniques SPM à la biologie. En effet, si les techniques de microscopies à sondes locales sont maintenant bien établies, de nouveaux couplages se sont mis en place depuis quelques années en particulier avec la biologie.

Il s'agit maintenant d'un domaine mature avec d'ailleurs une expertise forte des laboratoires CNRS de l'aire marseillaise, mais qui nécessite des développements de la technique pour s'adapter à la spécificité des objets sondés (par exemple imagerie AFM de cellules avec balayage rapide) et aux contraintes qu'ils imposent. On peut par exemple évoquer la nécessité d'optimiser la sensibilité de l'instrument en milieu liquide pour mesurer des forces faibles (de l'ordre du pN), ou les difficultés d'excitation du levier supportant la sonde.

Cette école sera organisée en deux parties, réparties sur deux demi-journées de trois heures chacune. La première demi-journée sera dédiée à trois cours théoriques d'une heure chacun, à destination de la totalité des participants. Dans la seconde, des ateliers pratiques seront organisés avec une implication forte des participants autour d'un équipement issu d'un partenaire industriel.

Ces parties pratiques, au nombre de trois et d'une durée d'une heure chacune, seront organisées en parallèle autour de petits groupes d'environ cinq apprenants afin d'optimiser l'interaction avec le formateur. Chaque groupe tournera ainsi entre les ateliers pendant trois heures.

Le but de ces deux demi-journées est de :

- Connaître les spécificités et les contraintes liées à l'application de l'AFM à l'analyse des objets biologiques
- Identifier les paramètres importants sur lesquels il faut jouer
- Savoir mettre en œuvre une expérience en milieu liquide
- Permettre aux personnes formées d'avoir un état de l'art des travaux dans le domaine de l'AFM en biologie, en sachant où se trouvent les compétences spécifiques dont ils pourraient avoir besoin en France et à l'international.

Enfin nous espérons que l'esprit dans lequel nous avons organisé ces deux demi-journées permettra de créer du lien entre les acteurs de la recherche française que vous êtes, qui, bien que reliés par une thématique commune, ne dialoguez pas

forcément entre vous sur vos recherches. Bien souvent cela fait émerger des idées et des collaborations nouvelles !

Bonne formation à toutes et à tous !

**Le comité local d'organisation,**

Conrad Becker, CINA  
Sylvain Clair, IM2NP  
Virginie Gadenne, IM2NP  
Hubert Klein, CINA  
Thomas Léoni, CINA

Christian Loppacher, IM2NP  
Laurence Masson, CINA  
Laurent Nony, IM2NP  
Franck Para, IM2NP,  
Lionel Patrone, IM2NP  
Alain Ranguis, CINA

# Programme

<i>Lundi 18 Mars 2019: cours théoriques</i>		
13:30	Accueil	
14:00-15:00	<b>Vincent Duprès</b>	<b>AFM et mécanobiologie</b>
<i>Pause café</i>		
15:30-16:30	<b>Frank Lafont</b>	<b>Utilisation de la microscopie à force atomique en corrélation avec les microscopies photonique et électronique appliquée au domaine biomédical</b>
<i>Pause</i>		
17:00-18:00	<b>Ignacio Casuso Páramo</b>	<b>Introduction to high-speed AFM</b>

<i>Mardi 19 Mars 2019: ateliers pratiques</i>			
	<u>Atelier #1</u>	<u>Atelier #2</u>	<u>Atelier #3</u>
	<b>Sébastien Janel</b> (JPK-Bruker) <i>Mécano biologie</i>	<b>Sang-Joon Cho</b> (Park Instruments) <i>SCIM</i>	<b>Lorena Redondo-Lorata</b> (Bruker Nanoscope V) <i>Supported lipid bilayers</i>
09:00-10:00	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
10:00-11:00	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 1
11:00-12:00	Groupe 3	Groupe 1	Groupe 2



**Lundi 18 Mars 2019**  
Cours théoriques





# AFM et mécanobiologie

**Vincent Duprès**

*Microbiologie Cellulaire et Physique de l'Infection, Institut de Biologie de Lille –  
Institut Pasteur  
CNRS UMR8204 – INSERM U1019 – Univ. Lille Nord de France  
1, rue du Professeur Calmette, 59021 Lille, France*

[vincent.dupres@ibl.cnrs.fr](mailto:vincent.dupres@ibl.cnrs.fr)

Initialement confinée à l'imagerie, la microscopie à force atomique (AFM) s'est progressivement imposée comme un outil parfaitement adapté aux problématiques liées à la mécanobiologie. Ce domaine de la science, en plein essor depuis une trentaine d'années, s'intéresse à la manière dont les cellules et les tissus biologiques réagissent aux contraintes mécaniques et aux déformations.

En effet, l'AFM utilisé en mode spectroscopie de force permet de stimuler mécaniquement des échantillons biologiques, tels que des cellules, à l'échelle nanométrique mais également de caractériser leurs propriétés mécaniques, tout en conservant ces cellules dans un environnement physiologique. Les avancées technologiques récentes, et notamment le développement de modes multiparamétriques tels que les modes Quantitative Imaging ou PeakForce-QNM, ne font que renforcer le potentiel de cette approche.

C'est donc cet aspect de l'AFM que j'aborderai dans le cadre de cette présentation, en discutant notamment des applications pour la mécanique cellulaire. Les aspects pratiques seront abordés (préparation des échantillons, sélection des paramètres expérimentaux et des modèles mathématiques pour l'extraction des données mécaniques...) avant de mettre en évidence les forces et les limitations actuelles de cette technique et de discuter des perspectives que l'on peut en attendre.



# Utilisation de la microscopie à force atomique en corrélation avec les microscopies photonique et électronique appliquée au domaine biomédical

**Frank Lafont**

*Cellular Microbiology and Physics of Infection Group - Center for infection and Immunity of Lille*  
*Institut Pasteur de Lille, CNRS, INSERM, CHU de Lille, Université de Lille*  
*1 rue du Pr Calmette, F-59019 Lille*

[frank.lafont@pasteur-lille.fr](mailto:frank.lafont@pasteur-lille.fr)

La corrélation entre les différents types de microscopies (photonique, électronique et de champ proche) permet pour un même échantillon biologique d'obtenir la valeur ajoutée de chaque technique.

Par exemple, il est possible de réaliser en utilisant le nanoguidage d'objets biologiques des mesures fonctionnelles dynamiques en biophotonique lorsque l'objet est placé en interaction avec une cellule vivante. Pour réaliser le nanoguidage, un levier utilisé en microscopie à force atomique (AFM) permet des interactions itératives, voire le relargage de l'objet (avec l'emploi de leviers perforés connectés à une nanopompe pour maintenir l'objet sur le levier par différence de pression). Il est alors possible de suivre le recrutement, autour de l'objet en interaction avec la cellule, de molécules fluorescentes exprimées dans la cellule. L'analyse peut être effectuée grâce aux techniques de microscopie optique comme la microscopie par localisation photoactivée ou à déplétion par émission stimulée.

Dans une autre approche, sur cellule vivante, alors que l'utilisation de la microscopie à fluorescence de super-résolution est utilisée pour identifier des compartiments subcellulaires, l'AFM permet de caractériser les propriétés biophysiques de ces compartiments (par exemple l'élasticité par calcul du module de Young). Ensuite, l'échantillon peut être traité pour une observation en microscopie électronique qui ajoute une dimension ultrastructurale à l'analyse avec les données obtenues sur les parties non marquées qui ont été analysées en AFM. Il est donc possible d'établir une triple corrélation photonique, AFM et électronique.

Nous discuterons des avantages et limitations de ces méthodes de corrélation sur différents exemples du domaine biomédical.



# Introduction to High Speed AFM

**Ignacio Casuso Páramo**

*Adhesion & inflammation lab  
Campus de Luminy  
F-13288 Marseille cedex 9*

[ignacio.casuso@inserm.fr](mailto:ignacio.casuso@inserm.fr)

In the last decade, the high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) has opened the door to an unprecedented exploration of the dynamics of the smallest scales in Biology.

Thanks to a x1000 times increase in the speed of reaction with respect conventional AFM, the HS-AFM provides two unique ways to assess biological information. First, label-free subsecond video-visualization of the dynamics of individual biomolecules and ensembles of biomolecules in response to external metabolic-like stimuli. Second, the exploration of the mechanical behavior of the molecules and cells at microsecond reaction times. Mechanics was a long-forgotten parameter in the studies of the smallest scales of Biology, but in the last decades mechanics has gained relevance as a ruling factor and thanks to HS-AFM fast mechanical regimes, not accessible by any other technique, can now be explored.

In this course, the past, the present and the perspectives of the HS-AFM will be addressed from a biological and technical perspective. Both, the imaging of molecular dynamics and mechanical studies will be addressed. The goal of the course is to provide the audience with a full picture of know-hows and know-whys on HS-AFM technique.



**Mardi 19 Mars 2019**  
Ateliers pratiques





## Atelier #1:

### Mécano biologie

Sébastien Janel

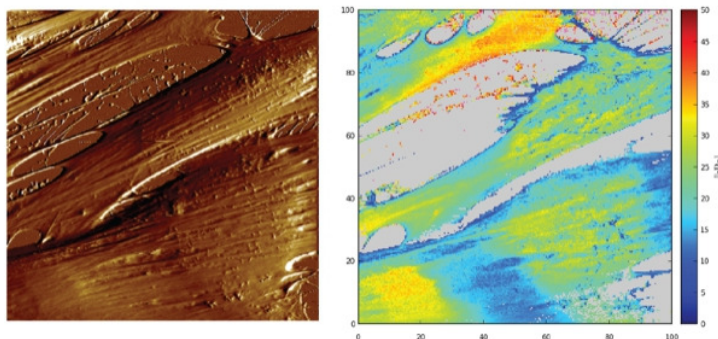
*Cellular Microbiology & Physics of Infection lab  
BICeL Atomic Force Microscopy  
CILL UMR8204 - Institut Pasteur de Lille  
1, rue du professeur Calmette - 59021 Lille Cedex, France*

[sebastien.janel@cnrs.fr](mailto:sebastien.janel@cnrs.fr)

La mécano biologie est un domaine en plein essor, le microscope à force atomique en étant l'un des principaux outils. Il offre une résolution manométrique, et une sensibilité en force de l'ordre de quelques pN. Il permet en outre de travailler sur des cellules vivantes ou des tissus, en conditions physiologiques (milieu de culture, température...), et sur différents types de substrats. Il permet d'imager la topographie des objets biologiques, et, surtout, d'en mesurer les propriétés mécaniques (élasticité, viscosité de la cellule ou de la membrane), et les propriétés d'adhésion.

Lors de ce TP nous effectuerons une expérience de mesure d'élasticité cellulaire. Nous verrons en détail, devant le microscope, les différentes étapes clés de réalisation d'une expérience :

- Les aspects importants de la préparation des cellules : choix du substrat, milieux,
- Les différentes méthodes de calibrage de la constante de raideur : InvOLS, Sader, SNAP
- Les différents mode d'acquisition des données : force mapping, QI, et les paramètres importants
- L'analyse des données, les différents modèles dérivés de Hertz



*Figure 1: Fibroblastes (cellules du derme) vues en topographie (peak force error, gauche) et en élasticité (module d'Young, droite)*



## Atelier #2:

### Park Systems AFM Workshop and Live Demo : SICM and SICM based SECM Applications for Live Cell Research

**Sang-Joon Cho<sup>1,2</sup>, Seong-Oh Kim<sup>1</sup>, Goo-Eun Jung<sup>1</sup>, Kyo-Suk Goo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Park Systems Corp, KANC 4F, Iui-Dong 906-10, Suwon, Korea

<sup>2</sup>Advanced Institute of Convergence Technology, Suwon 443-270, Republic of Korea

[msicho@parksystems.com](mailto:msicho@parksystems.com)

The high-resolution monitoring of live cell membranes in physiological conditions has been the homework for centuries for biologists. Visualization and Understanding of cell membrane activities could give precious insight upon how cells interact with outer environment. Scanning ion conductance microscopy (SICM) can provide the surface morphology of biological soft materials in liquid directly. The SICM uses ionic current as feedback signal by detecting it through the nano-size opening of glass pipette. The dedicated SICM operating mode called approach and retract scanning (ARS) makes SICM imaging stable in liquid environment. The in-liquid imaging capability without physical contact allows using SICM for various cell study topics in live status such as cell division, fusion, and other fundamental physiological phenomena. For optimal performance, accurate control of the tip position is a critical issue. We present a novel closed-loop control strategy for the ARS mode that achieves higher operating speeds with increased stability. In addition to the obtaining morphology using SICM, minor modification of system and nano pipette could provide valuable information on redox activity of individual cells. Convenient distance control capability and high resolution 3D surface mapping of SICM could enhance the accuracy of SECM measurement. The presenting examples are one of many new possible applications and new challenges in the growing multi-disciplinary study of cell biology.

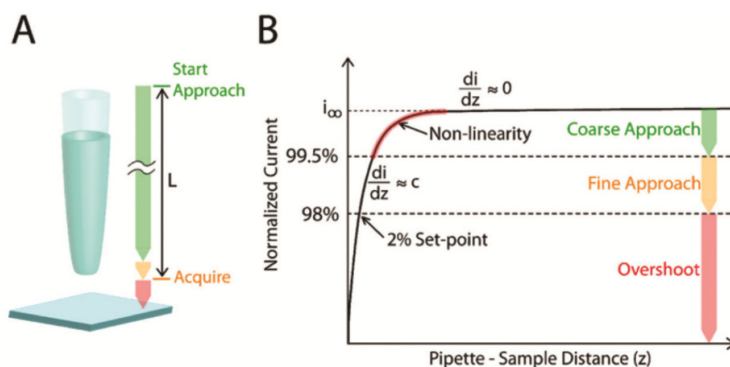


Figure 1: Measurement strategy for the Closed Loop-ARS mode. (A) Schematic of the proposed CL-ARS algorithm. (B) Normalized ion current through pipette,  $i/i_{\infty}$ , as a function of pipette-sample distance,  $z$ .

#### References

[1] G. E. Jung, H. Noh, Y. K. Shin and S. J. Cho, *Nanoscale* 7(25) 10989 (2015).



## Atelier #3:

# Supported Lipid Bilayers

**Lorena Redondo Morata**

*INSERM U1019 – Institut Pasteur de Lille  
1 rue du Professeur Calmette  
59021 Lille Cedex, France*

[lorena.redondo-morata@inserm.fr](mailto:lorena.redondo-morata@inserm.fr)

Supported Lipid Bilayers (SLBs) are widely used as simple models of biological membranes, constituting the basic building block for *in vitro* reconstituted systems for surface techniques. Many studies on SLBs have used AFM as an ideal framework for understanding the physicochemical properties of not only SLBs but soft thin films in general.

Here we will discuss certain methods of preparation of the SLBs and we will see how AFM allows us, to a certain extent, the chemical recognition of the different lipidic species of our mixtures, by imaging them. Also, by force mapping and force spectroscopy we will learn how to discern and quantify the physicochemical properties of the membrane.

