

Caractérisation micro-ondes de cellules biologiques soumises à différents stimuli chimiques

A. Tamra^{1,2}, D. Dubuc¹, M.P. Rols², K. Grenier¹

¹ LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

² IPBS-CNRS, Toulouse, France

grenier@laas.fr, dubuc@laas.fr

Résumé — L'analyse cellulaire par spectroscopie diélectrique micro-ondes gagne en intérêt, car elle présente des caractéristiques attrayantes, comme être non invasive, non destructive, sans marquage, tandis que les cellules peuvent être analysées directement dans leur milieu de culture. Plus important encore, la gamme des micro-ondes permet des investigations intracellulaires. Ce papier confirme une telle capacité grâce à l'évaluation de différentes réponses cellulaires chimio-induites de deux lignées cellulaires, HCT 166 et THP1. De plus, cette méthode d'analyse ne présente pas seulement des contrastes capacitifs différents selon les lignées cellulaires. Il permet également d'extraire des variations diélectriques distinctes dues à un agent chimique, variations attribuées à différentes modifications internes des cellules dépendant de la lignée cellulaire.

I. INTRODUCTION

La spectroscopie diélectrique hyperfréquence est en cours de développement depuis des décennies et est déjà exploitée dans divers domaines d'application tels que la détection d'eau ou de canalisation dans les sols, ainsi que dans l'agriculture et l'alimentation pour les évaluations de qualité [1]. Cette méthode présente en effet de nombreux attraits, à savoir non-destructif, non invasif, sans nécessiter de contact direct avec le matériau testé et adapté pour analyser tout type de matériaux, qu'ils soient solides, liquides ou gazeux. Sa grande sensibilité à l'eau rend cette technique particulièrement adaptée à la détection de matériaux biologiques en raison de la forte teneur en molécules d'eau du vivant [2]. Combinée aux microtechnologies, la technique donne accès à de cellules biologiques et notamment à l'échelle unique [3-9]. Enfin, la caractéristique la plus importante de la spectroscopie diélectrique hyperfréquence correspond à sa gamme de fréquences, qui permet des investigations intracellulaires. La technique peut donc non seulement quantifier mais aussi discriminer des sous-populations de cellules [10]. Pour aller encore plus loin dans la démonstration des capacités de cette méthode de détection, cet article se concentre sur l'évaluation de l'impact d'un stress chimique sur différentes lignées cellulaires. Dans ce cas, deux lignées cellulaires humaines ont été soumises à la même concentration d'un agent chimique et étudiées par spectroscopie diélectrique micro-ondes.

Pour ce faire, le biocapteur micro-ondes dédié à l'analyse des cellules individuelles et le banc de test associé sont brièvement décrits dans une première section. La deuxième section se concentre sur la caractérisation micro-ondes de différentes lignées cellulaires soumises ou non au même agent chimique.

II. BIOCAPTEUR MICRO-ONDE POUR LA CARACTERISATION DE CELLULE UNIQUE

Le capteur hyperfréquence [3] comprend un guide d'ondes coplanaire avec une coupure capacitive en son centre, comme illustré sur la figure 1. La ligne réalisée sur un substrat de quartz présente des dimensions telles que son impédance caractéristique dans l'air est de 50Ω . Au dessus est placé un canal microfluidique, qui comprend un bloqueur mécanique situé au-dessus de la coupure capacitive afin de piéger une cellule là où est focalisé le champ électromagnétique.

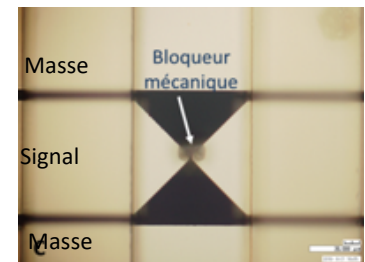
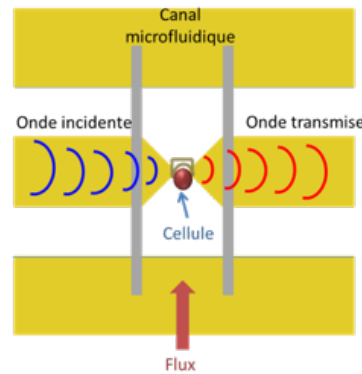


Fig. 1. Schéma et photographie du biocapteur micro-onde pour analyse de cellules individuelles.

III. DESCRIPTION DES CELLULES ÉTUDIÉES ET DU PROTOCOLE DE STRESS CHIMIQUE

Pour les expériences, deux lignées cellulaires ont été sélectionnées, THP1 et HCT116, qui correspondent respectivement à une lignée cellulaire monocyttaire leucémique humaine et à une lignée cellulaire cancéreuse du côlon humain. Les cellules HCT116 et THP1 sont cultivées dans leurs milieux de culture respectifs: milieu de culture DMEM («Dulbecco's Modified Eagle Medium») pour la lignée cellulaire HCT166 et milieu de culture RPMI

(Roswell Park Memorial Institute Medium) pour les cellules THP1, tous deux complétés par 10% de sérum de veau fœtal, de la pénicilline et de la streptomycine. Les cellules sont incubées pour prolifération à 37 ° C avec 5% de CO2. Peu de temps avant de mener les expérimentations micro-ondes, les cellules sont tout d'abord trypsinées durant 3 minutes pour les détacher de leur boîte de culture, comme indiqué sur la figure 2. Une fois en suspension, les cellules sont placées dans un eppendorf puis centrifugées à 1400 tour/minute pendant 3 minutes. Le surnageant est alors éliminé et remplacé par du milieu de culture complété de l'agent chimique stressant.

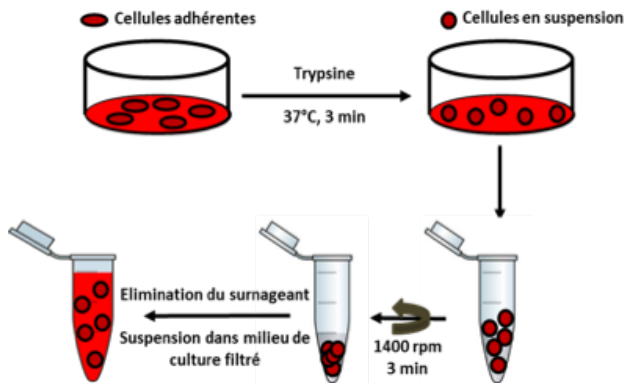


Fig. 2. Protocole de récupération et préparation des cellules en suspension.

Le traitement chimique utilisé dans l'étude correspond à la saponine, un détergent qui crée des trous dans la membrane cytoplasmique. La perméabilisation obtenue est irréversible, entraînant une mort artificielle des cellules. Une concentration de 0,02% (W / V) pendant 15 minutes est appliquée aux lignées cellulaires, qui sont ensuite placées dans leur milieu de culture frais respectif avant mesures RF.

IV. BANC DE TEST POUR ANALYSE MICRO-ONDE DE CELLULES BIOLOGIQUES INDIVIDUELLES

Afin de faire la caractérisation micro-ondes des deux lignées cellulaires, le biocapteur est connecté à un analyseur de réseau vectoriel (VNA) via des points coplanaires et câbles, comme indiqué sur la figure 3. La caractérisation micro-ondes des cellules est effectuée de 40 MHz à 40 GHz. Le capteur est placé sur une station sous pointe qui comprend un contrôle en température du chuck et sur table anti-vibration.

Les mesures sont réalisées en deux étapes. La structure est d'abord mesurée chargée uniquement par le milieu hôte des cellules, ce qui conduit à la mesure des paramètres [S] milieu. Dans une deuxième étape, le capteur est chargé avec une cellule individuelle, conduisant à l'obtention de la matrice [S] cellule. En utilisant un modèle électrique de la structure [3], la capacité et la conductance dans les deux configurations, sont extraites. Nous obtenons ainsi 2 couples de valeurs capacité et conductance suivant les configurations du capteur, chargé par une cellule avec son

milieu de culture et celle avec le milieu seul, à savoir ($C_{cellule}$, $G_{cellule}$) et (C_{milieu} , G_{milieu}) respectivement.

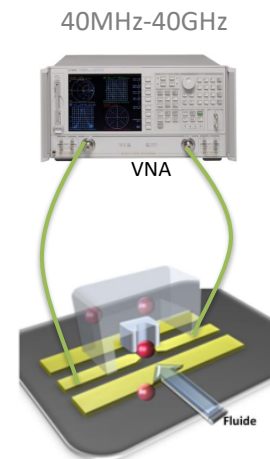


Fig. 3. Configuration du banc de test pour analyse de cellules biologique individualisée.

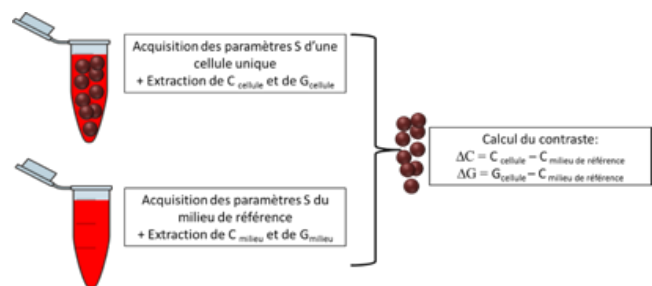


Fig. 4. Protocole de test utilisé et introduction de contrastes capacitif et inductif.

Deux contrastes électriques, capacitif et conductif, sont ensuite calculés avec les équations suivantes respectivement :

$$\Delta C = C_{cellule} - C_{milieu} \quad (1)$$

$$\Delta G = G_{cellule} - G_{milieu} \quad (2)$$

Ce calcul est réitéré pour chaque cellule individuelle. Chaque milieu est considéré comme la référence de ces contrastes.

Des exemples de réponses diélectriques pour 3 cellules HCT 116 et pour THP1 sont indiqués sur la figure 5. Le contraste capacitif est le plus important aux environs de 5 GHz, tandis que la valeur absolue de ce contraste diminue vers la référence à zéro, à savoir le milieu de culture des cellules, lorsque la fréquence augmente. Les cellules HCT116 présentent une très faible dispersion, avec une valeur moyenne de -0.4fF seulement et un écart type de 0.046 fF à 5 GHz. Les cellules THP1, quant à elles, présentent un contraste plus fort d'une valeur moyenne de 0.6 fF à 5 GHz, avec un écart type un peu plus important de 0,1 fF. Si l'on tient compte du fait qu'il s'agit de cellules vivantes qui n'ont pas été synchronisées dans leur cycle de répllication cellulaire, la reproductibilité des résultats obtenus entre cellules uniques est remarquable. De plus, l'écart type peut être expliqué par la variabilité dans le

cycle cellulaire ainsi que par des modifications intrinsèques caractéristiques du vivant, même si les cellules sont issues de même lignées.

Il est intéressant de noter que la technique de spectroscopie diélectrique micro-onde permet de distinguer de façon totalement non invasive des cellules de lignées différentes, puisque les réponses diélectriques diffèrent.

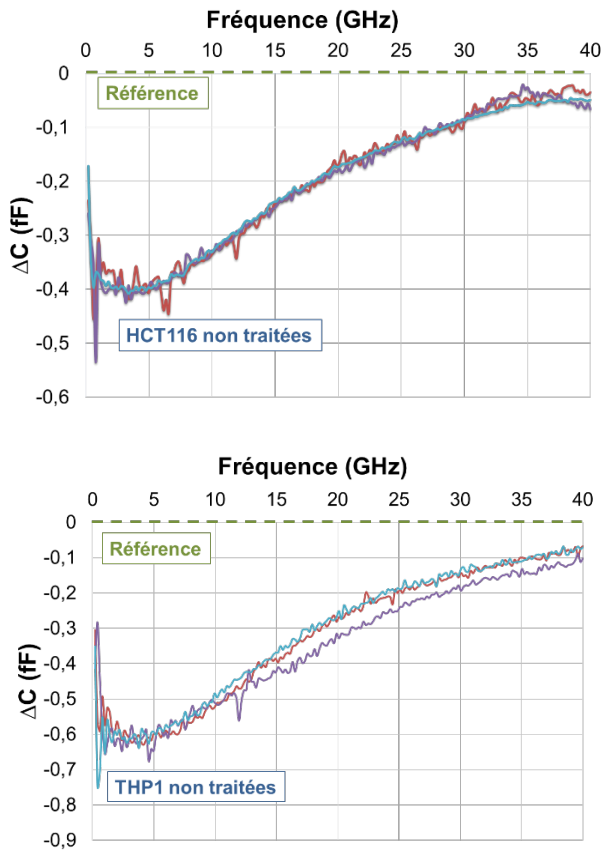


Fig. 5. Contrastes capacitifs suivant la fréquence mesurés pour 3 cellules individuelles HCT116 et THP1 non traitées chimiquement.

V. ANALYSE MICRO-ONDE DE CELLULES BIOLOGIQUES INDIVIDUELLES SOUMISES À UN STIMULUS CHIMIQUE

Fort de ces résultats, nous nous sommes demandés si la technique d'analyse RF pouvait distinguer différents comportements cellulaires lorsque soumises à un même stimulus chimique.

Dans un deuxième temps, nous avons donc appliqué le traitement chimique indiqué précédemment aux deux lignées cellulaires. Les résultats correspondants sont indiqués sur la figure 6.

Quelle que soit la lignée cellulaire, le traitement à la saponine conduit à une diminution des contrastes capacitifs en valeur absolue. Les valeurs correspondantes sont résumées dans le tableau I. Cette réduction peut s'expliquer par le fait que, en raison de la perméabilisation de la membrane cytoplasmique, un échange entre les milieux intracellulaire et extracellulaire se produit jusqu'à atteindre un équilibre entre les deux compartiments.

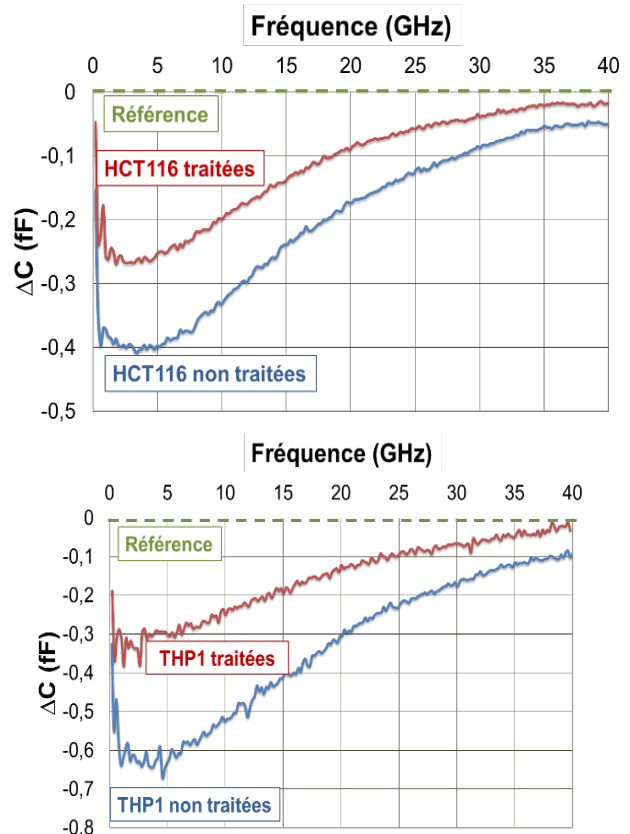


Fig. 6. Contrastes capacitifs suivant la fréquence mesurés et moyennés pour des cellules uniques HCT116 et THP1 traitées et non traitées.

Les cellules traitées ont alors tendance à présenter des contrastes capacitifs, dont les valeurs se déplacent vers celle du milieu de culture, référence de la mesure. Ce contraste ne peut pas atteindre zéro, car le traitement à la saponine conserve toujours l'architecture des cellules avec des organites à l'intérieur de la membrane cytoplasmique.

TABEAU I. RÉSUMÉ DES CONTRASTES CAPACITIFS DES CELLULES, SELON LEUR TYPE, AVEC ET SANS TRAITEMENT CHIMIQUE

Type cellulaire	$\Delta C @ 5 \text{ GHz}$ (fF)
HCT116 non traitées	-0.40 ± 0.046
HCT116 traitées	-0.25 ± 0.04
THP1 non traitées	-0.60 ± 0.10
THP1 non traitées	-0.30 ± 0.077

En ce qui concerne la variation du contraste capacitif, celle-ci est proche de 37% pour la lignée cellulaire HCT116, alors que les cellules THP1 présentent une modification du contraste de 50%. La différence de 13% entre les comportements de ces cellules ne s'explique pas uniquement par la variation diélectrique des deux milieux de culture. Les modifications internes induites par le traitement chimique doivent également différer selon les lignées cellulaires, conduisant à une telle variance mesurée de la réponse chimio-induite cellulaire. Ce résultat est intéressant car il peut trouver des applications dans

l'évaluation rapide de l'efficacité d'agents thérapeutiques notamment pour le traitement personnalisé de patients.

VI. CONCLUSIONS

Pour conclure, cet article présente la caractérisation diélectrique de deux lignées cellulaires différentes, qui ont été comparées diélectriquement lorsqu'elles ont été soumises ou non au même traitement chimique.

Premièrement, les lignées cellulaires présentent intrinsèquement différentes propriétés diélectriques lorsqu'elles sont caractérisées dans la gamme des micro-ondes. Ce premier résultat met en évidence l'intérêt de l'investigation intracellulaire de la spectroscopie diélectrique hyperfréquence.

Deuxièmement, comme le traitement chimique appliqué est basé sur l'utilisation d'un détergent, la saponine, qui crée des pores dans la membrane cytoplasmique, tout en préservant l'intégrité de la cellule, une mort artificielle des cellules est obtenue et peut être distinguée par la technique de spectroscopie diélectrique micro-ondes.

Ainsi, cette méthode d'analyse ne présente pas seulement des contrastes capacitifs différents selon les lignées cellulaires. Il permet également d'extraire, en raison d'un agent chimique, des variations diélectriques distinctes, qui sont attribuées à différentes modifications internes des cellules dépendant de la lignée cellulaire. Ce dernier résultat est particulièrement intéressant car il peut trouver des applications dans l'évaluation de l'efficacité d'agents thérapeutiques notamment dans le cadre de traitement personnalisé.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont bénéficié en partie de financements de l'Université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, de la région Midi-Pyrénées et du réseau français RENATECH.

REFERENCES

- [1] K. Kupfer, "Electromagnetic aquametry," Springer, 2010.
- [2] A. Vander Vorst, A. Rosen, Y. Kotsuka, "RF/Microwave interaction with biological tissues," Wiley Series in Microwave and Optical Engineering, 2006.
- [3] T. Chen, F. Artis, D. Dubuc, J. J. Fournié, M. Poupot, and K. Grenier, "Microwave biosensor dedicated to the dielectric spectroscopy of a single alive biological cell in its culture medium," in 2013 IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest (MTT), Jun 2013, pp. 1-4.
- [4] Y. Ning, C. Multari, X. Luo, C. Palego, X. Cheng, J. Hwang, A. Denzi, C. Merla, F. Apollonio, M. Liberti, Broadband electrical detection of individual biological cells, *IEEE T-MTT*, Vol. 62, n° 9, pp. 1905-1911, 2014.
- [5] N. Meyne, G. Fuge, H.K. Trieu, A-P. Zeng, A.F. Jacob., Miniaturized Transmission-Line Sensor for Broadband Dielectric Characterization of Biological Liquids and Cell Suspensions. *IEEE Trans. on Microwave Theory and Techniques*, Vol. 63, n°10, 2015, pp. 3026-3033.
- [6] Y. Yang, Z. Hanqiao, Z. Junjie, W. Gaoyan, T. Tzuen-Rong, X. Xiangchun, H. Kama, and W. Pingshan "Distinguishing the viability of a single yeast cell with an ultra-sensitive radio frequency sensor," *Lab.on a Chip*, 2010, pp. 553-555.

- [7] A. Tamra, M.-P. Rols, D. Dubuc, K. Grenier. "Microwave Monitoring of Single Cell Monocytes Subjected to Electroporation," *IEEE T-MTT*, 2017, DOI: 10.1109/TMTT.2017.2653776.
- [8] K. Grenier, A. Tamra, A. Zedek, G. Poiroux, F. Artis, T. Chen, W. Chen, M. Poupot, J.-J. Fournié, D. Dubuc, "Low Volume and Label-Free Molecules Characterization and Cell Monitoring with Microwave Dielectric Spectroscopy," *IEEE IMBioC*, 2018.
- [9] K. Grenier, D. Dubuc, T. Chen, F. Artis, T. Chrétiennot, M. Poupot, J.-J. Fournié, "Recent Advances in Microwave-based Dielectric Spectroscopy at the Cellular Level for Cancer Investigations," *IEEE T-MTT*, Vol. 61, Issue 5, Part 2, 2013, pp. 2023-2030.
- [10] F. Artis, D. Dubuc, M. Poupot, J. Fournié, K. Grenier, "Label free discrimination of human lymphoma cell sub-populations with microwave dielectric spectroscopy," *IEEE International Microwave Symposium Digest 2018*, Philadelphia, USA, 10-15 June 2018