



HAL
open science

Extraction de la permittivité complexe de cellules biologiques individuelles dans la gamme des micro-ondes

Amel Zedek, David Dubuc, Katia Grenier

► To cite this version:

Amel Zedek, David Dubuc, Katia Grenier. Extraction de la permittivité complexe de cellules biologiques individuelles dans la gamme des micro-ondes. Journées Nationales Micro-ondes 2017, May 2017, Saint-Malo, France. 4p. hal-01529805

HAL Id: hal-01529805

<https://laas.hal.science/hal-01529805>

Submitted on 31 May 2017

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

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

Extraction de la permittivité complexe de cellules biologiques individuelles dans la gamme des micro-ondes

Amel Zedek, David Dubuc, Katia Grenier

¹LAAS-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, CRCT-INSERM, France
dubuc@laas.fr, Katia.grenier@laas.fr

Résumé – Ce papier décrit l'extraction de la permittivité de cellules individuelles soumises à différents stimuli en utilisant un biocapteur micro-ondes, développé pour l'analyse de cellules uniques dans leur milieu de culture. La partie sensible du dispositif est constituée d'un gap coplanaire de 5 μ m, sur lequel la cellule est piégée par un bloqueur mécanique, permettant d'obtenir les contrastes capacitifs et conductifs d'une cellule. Des simulations électromagnétiques, dans lesquels la permittivité de la cellule (sphère) est ajustée, ont permis de définir des courbes de calibrage adaptées reliant les contrastes capacitif et conductif aux parties réelles et imaginaires de la permittivité relative. Plusieurs mesures ont été effectuées sur différentes cellules (dans leur milieu de culture) après différents stimuli dans le but d'induire différents stress altérant l'état de la cellule. Les résultats montrent que cette technique non-invasive, incluant un post-traitement de de-embedding, nous fournit l'image intrinsèque diélectrique d'une cellule biologique, qui par la suite révèle l'état biologique de celle-ci.

1. Introduction

L'un des principaux défis en biologie, et particulièrement dans la recherche contre le cancer est d'évaluer le comportement de la cellule en fonction de n'importe quel stimulus extracellulaire. Les chercheurs dans ce domaine sont très intéressés par toute technique pouvant les informer de la réaction et la cinétique d'une cellule [1].

En biologie et dans les laboratoires médicaux, les principales méthodes d'analyse cellulaire sont optiques comme les microscopes et la cytométrie en flux. Ces techniques sont très précises et efficaces dû à l'utilisation de marqueurs et fluorochromes afin de mettre en évidence certains processus cellulaires. Toutefois cela impose l'ajout de produits chimiques en dehors ou dans la cellule, qui peuvent interagir avec d'autres molécules. Par ailleurs, la préparation des échantillons pour chaque expérience coûte chère et est chronophage, et cela peut affecter les cellules, qui ne peuvent pas être réutilisables. De plus, la possibilité d'effectuer des analyses cellulaires de systèmes biologiques a augmenté considérablement au cours des deux dernières décennies [2]. Comme le nombre des combinaisons entre les échantillons, les

réactifs et les dosages augmente, il est devenu nécessaire de développer de nouvelles approches pour comprendre et utiliser cette complexité.

L'une des approches pour aborder cette complexité a été de réduire l'ampleur des expériences grâce à la microfluidique ou « lab-on-a-chip ». En effet ils ont été développés et utilisés pour effectuer et améliorer un certain nombre d'essais biologiques avec une consommation de réactifs minimale dans des canalisations de dimensions d'ordre du micromètre (quelques μ litres) [3]. Afin de compléter les analyses cellulaires, les techniques mécaniques et électriques sont également en cours de développement. Parmi elles, la spectroscopie diélectrique hyperfréquence présente des caractéristiques intéressantes [4]; comme aucun contact direct avec l'échantillon n'est exigé, cela révèle des modifications intracellulaires, tout en étant compatible avec l'analyse de liquides, et en particulier des liquides chargés en ions comme c'est le cas des milieux de culture cellulaires traditionnels. Enfin la technique est non invasive et ne nécessite aucune molécule exogène pour l'analyse des cellules. Cette méthode peut également répondre au besoin de suivi des processus biologiques au cours du temps. Elle a déjà été développée pour l'analyse de cellules en suspension mais également de cellules uniques. Jusqu'à présent, les cellules uniques ont été caractérisées dans la gamme hyperfréquence grâce aux mesures des paramètres S [5,6] et aussi grâce à l'extraction de contrastes capacitif et conductif entre la cellule dans son milieu de culture et le milieu seul [7,8].

Afin d'approfondir la caractérisation diélectrique d'une cellule unique, nous présentons dans ce papier l'extraction de la permittivité relative de cellules uniques soumises à différents stimuli environnementaux, thermique et chimio-induit. Après une brève introduction du biocapteur micro-ondes utilisé lors de l'étude, seront décrites les cellules et stimuli. Les mesures présentées sont données pour différents types cellulaires. La troisième section est dédiée à l'extraction de la permittivité d'une cellule unique.

2. Mesures de cellules uniques

Dans cette partie, l'architecture du biocapteur est brièvement décrite suivie par une description des cellules utilisées et soumises à différents stimuli. Leur

caractérisation micro-ondes est effectuée de 40MHz à 40GHz.

2.a. Architecture du biocapteur

Le biocapteur est composé de deux parties principales, l'une dédiée à la caractérisation hyperfréquence et la seconde consacrée au flux et piégeage de particules en solution, comme indiqué dans la Fig. 1.

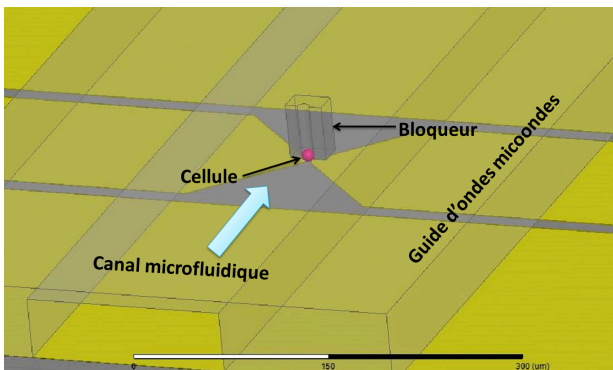


Fig. 1. Vue schématique du biocapteur hyperfréquence, incluant une coupure capacitive de 5 µm.

La partie micro-ondes est constituée d'un guide d'onde coplanaire réalisé en or, dont les paramètres (w,s) sont (150,15) µm, avec une coupure capacitive de 5 µm permettant d'optimiser la sensibilité du capteur [8]. Un canal microfluidique permet l'écoulement du liquide biologique sous test ; ce canal contient en son centre un piège mécanique, qui permet le blocage de particules individuelles au-dessus du gap capacitif. De plus, le canal permet de maintenir la cellule dans son milieu de culture lors de la caractérisation micro-ondes. Dès qu'une particule est piégée, le signal électrique change due à la permittivité de la particule sous test différente du milieu hôte.

2.b. Protocole expérimental

Les cellules THP1 étudiées dans ce document sont des cellules de lignée monocyttaire humaine de leucémie. Ces cellules circulantes sont généralement utilisées comme modèle par les biologistes dans des études en cancérologie. Les THP1 sont cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ en incubateur et conservées dans leur milieu de culture, qui est composé de RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) supplémenté par 10% de SVF (sérum de veau fœtal) et des antibiotiques.

Les cellules sont mesurées après différents stimuli.

- Le premier échantillon est constitué de cellules vivantes en suspension dans leur milieu de culture, sans stress appliqué.
- Le second échantillon est constitué de cellules, qui ont subi un stress thermique (chauffées dans leur milieu de culture à 50°C pendant 10 minutes).
- Le troisième échantillon est composé de cellules THP1 perméabilisées par l'ajout d'un agent chimique. Le stimulus chimique est réalisé grâce à un détergent communément appelé saponine à une

concentration de 0.04%(w/v). La saponine crée des trous micrométriques dans la membrane cellulaire menant la cellule à la mort.

Ces trois différents échantillons sont par la suite caractérisés diélectriquement.

2.c. Mesures microondes

Les mesures micro-ondes sont réalisées en deux étapes. La première est de mesurer le biocapteur chargé de RPMI (milieu de culture seul), tandis que la seconde est de mesurer la cellule piégée dans son milieu de culture. A partir des paramètres S, sont calculés les contrastes capacitif et conductif de la cellule dans son milieu et le milieu seul comme présentés dans Fig. 2. La ligne zéro correspondant à la référence, soit le capteur chargé par le milieu seul. Les autres courbes dans les Fig. 2. (a) et (b) représentent la valeur moyenne des contrastes capacitif et conductif versus la fréquence des différents échantillons cellulaires, respectivement. Chaque spectre correspond à la valeur moyenne de 3 mesures de cellules uniques pour chaque échantillon cellulaire. L'insert de la Fig. 2 (a) présente une photographie de la partie centrale du capteur lorsqu'il est chargé d'une cellule dans son milieu de culture.

Les résultats montrent que les signatures capacitive et conductive des cellules sont différentes selon la nature du stimulus appliqué : pas de stimulus, stress chimio-induit, et stress par chauffage. Cette figure révèle également que les contrastes maximaux atteints sont à 5GHz et 30GHz pour les contrastes capacitif et conductif respectivement.

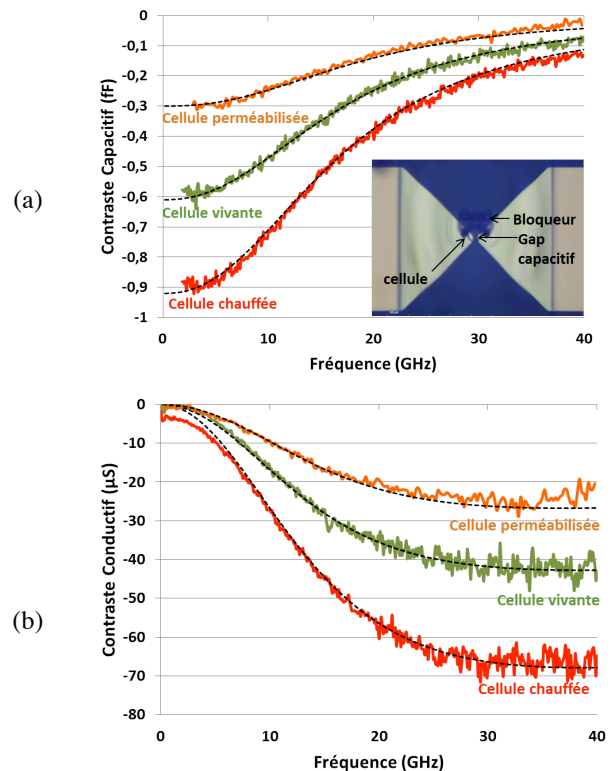


Fig. 2. Valeur moyenne des contrastes capacitif et conductif de cellules uniques soumises à aucun stress, un stress thermique (50°C-10min) et une perméabilisation chimio induite dans leur milieu de culture.

La partie suivante prendra en compte ces deux fréquences afin d'extraire la permittivité des cellules.

3. Extraction de la permittivité de cellules uniques

3.a. Procédure d'extraction

La permittivité et les pertes diélectriques d'une sphère d'un diamètre de $10\mu\text{m}$ (échelle d'une cellule unique), ont été ajustées en utilisant le logiciel de simulation ANSYS® HFSS software. Pour la définition de référence des contrastes, nous avons utilisé une base de données diélectrique du milieu de culture précédemment caractérisée dans le groupe. De ces simulations électromagnétiques, sont extraits les contrastes capacitif et conductif en utilisant le même post-traitement utilisé pour les mesures. La Fig. 3 rassemble les résultats simulés et met en avant une relation linéaire entre (a) le contraste capacitif et la partie réelle de la permittivité de la sphère (à 5GHz) mais aussi (b) le contraste conductif avec la partie imaginaire de la permittivité de la sphère (à 30GHz).

Comme indiqué dans la Fig. 3, les résultats des simulations ont été linéairement adaptés en utilisant la méthode des moindres carrés. Les équations (1) et (2) montrent la relation linéaire entre les contrastes et la permittivité relative. Notons ΔC et ΔG en (fF) et (μS) respectivement.

$$\Delta C_{5\text{GHz}} = 0.037 * (\epsilon' - 77.6) \quad (1)$$

$$\Delta G_{30\text{GHz}} = 3.76 * (\epsilon'' - 31.8) \quad (2)$$

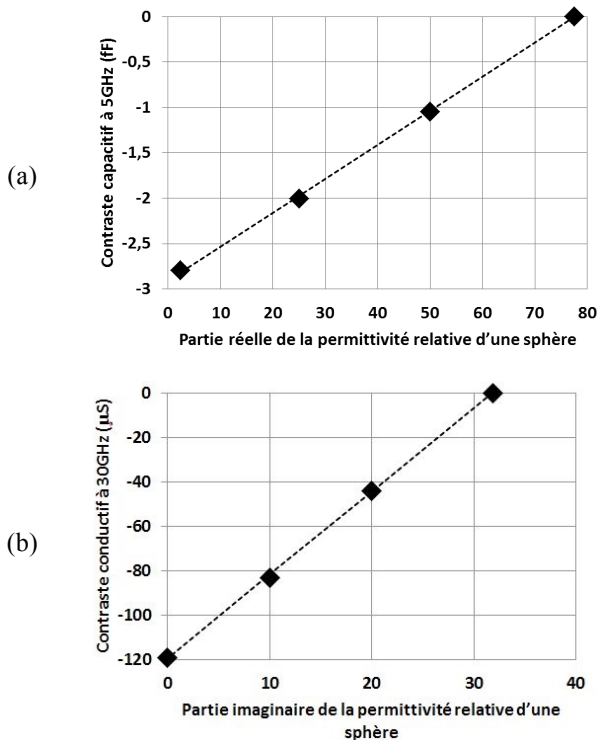


Fig. 3. Courbes (a) contraste capacitif versus ϵ' à 5GHz, (b) contraste conductif versus ϵ'' à 30GHz d'une sphère unique comportant différentes valeurs de permittivité.

Dans les équations (1) et (2), 77,6 et 31,8 sont les valeurs correspondant à la partie réelle de la permittivité du milieu de culture à 5 GHz et sa partie imaginaire à 30 GHz respectivement. Ces deux valeurs ont été forcées lors de la procédure des moindres carrés afin d'assurer une valeur nulle de ΔC et ΔG lorsque le milieu de culture pur est chargé dans le canal microfluidique.

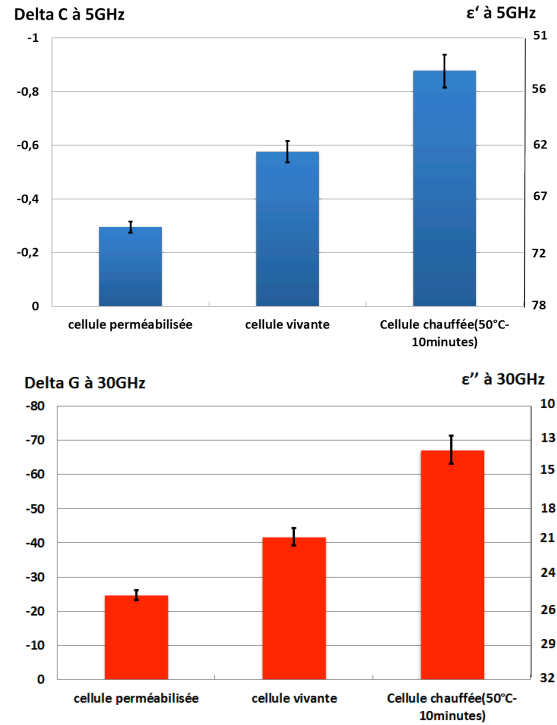


Fig. 4. Valeurs moyennes mesurées des contrastes de différents états cellulaires et leur permittivité diélectrique correspondante obtenues grâce aux équations (1) et (2).

La figure 4 présente les niveaux diélectriques de ΔC et ϵ' à 5GHz et ΔG et ϵ'' à 30GHz des séries de cellules (dans leur milieu de culture) en fonction de différents stimuli environnementaux appliqués aux cellules. L'axe secondaire de droite des Fig. 4, comme dans le Tableau 1, montre l'extraction (depuis les équations (1) et (2)) des parties réelle et imaginaire de la permittivité à 5GHz et 30GHz d'une cellule vivante, une cellule perméabilisée et une cellule après un stress thermique.

Les valeurs diélectriques les plus élevées (pour chacune des parties réelle et imaginaire) sont atteintes par les cellules perméabilisées. Cette perméabilisation cellulaire reflète en effet un équilibre intra et extracellulaire et par conséquent réduit considérablement les contrastes capacitif et conductif de la cellule. Par conséquent, la permittivité relative tend à atteindre le contraste du milieu de culture (tableau.1).

Inversement, les cellules après chauffage présentent des valeurs diélectriques plus faibles. Au-delà des mécanismes gérant cette diminution, qui sont en cours d'évaluation, ces résultats soulignent que, selon le stimulus environnemental (chimique avec saponine ou thermique), les cellules meurent d'une manière différente

(et atteignent des états biologiques différents) ceci est révélé par l'état diélectrique des cellules.

Tableau. 1. Propriétés diélectriques d'une cellule unique THP1 suivant son état physiologique.

	ϵ' à 5GHz	ϵ'' à 30GHz
Cellule perméabilisée	69,8	25,2
Cellule vivante	62,3	20,7
Cellule chauffée	54,2	13,9

4. Conclusion

Pour conclure, nous avons présentés pour la première fois l'extraction de la permittivité complexe d'une cellule biologique unique mesurée directement dans son milieu de culture. Basée sur les mesures de contrats capacitif et conductif d'une cellule unique et des simulations électromagnétiques, la permittivité des cellules a été extraite à 5GHz et 30GHz pour chacune des parties réelle et imaginaire respectivement. Différents stimuli, tels que stress thermique ou perméabilisation chimio-induite, ont été appliqués et nous ont mené à l'observation et l'extraction de différents états diélectriques des cellules.

5. Acknowledgment

Ce travail a été soutenu en partie par un projet Physicancer du Plan Cancer 2014-2019 (projet n° PC201522) et en partie par la centrale de micro et nanotechnologies du LAAS-CNRS, membre du réseau RENATECH.

Références

- [1] D. Di Carlo, L. P. Lee, "Dynamic single-cell analysis for quantitative biology," *anal. Chem.*, pp. 7918-7925, Dec. 2006.
- [2] S. Maulik et al., *Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies*. John Wiley & Sons, 1997.
- [3] G. M. Whitesides, « The origins and the future of microfluidics », *Nature*, vol. 442, n° 7101, p. 368-373, juill. 2006.
- [4] K. Grenier et al., « Recent Advances in Microwave-Based Dielectric Spectroscopy at the Cellular Level for Cancer Investigations », *IEEE T-MTT.*, vol. 61, n° 5, p. 2023-2030, May 2013
- [5] Y. Ning et al. "Broadband Electrical Detection of Individual Biological Cells," *IEEE T-MTT*, vol. 62, n° 9, 2014.
- [6] Y. Yang et al., « Distinguishing the viability of a single yeast cell with an ultra-sensitive radio frequency sensor », *Lab. Chip*, 2010.
- [7] T. Chen et al., "Microwave biosensor dedicated to the dielectric spectroscopy of a single alive biological cell in its culture medium," *IMS 2013*.
- [8] W. Chen, et al., « Microwave dielectric spectroscopy of a single biological cell with improved sensitivity up to 40 GHz », *IEEE IMS2015*.