

Discrimination Cellulaire par Dielectrophorèse Ultra Haute Fréquence : Etude des Fréquences de Transition de Cellules de Glioblastomes

R. Manczak¹, S. Saada², T. Provent¹, C. Dalmay¹, B. Bessette², G. Begaud², S. Battu², P. Blondy¹, M.O. Jauberteau², C. Baristiran Kaynak³, M. Kaynak³, C. Palego⁴, F. Lalloue², A. Pothier¹

¹XLIM-UMR 7252, Université de Limoges/CNRS, 87060 Limoges, France

²CAPTUR-EA 3842, Université de Limoges, 87025 Limoges, France

³IHP, 15236 Francfort (Oder), Allemagne

⁴Université de Bangor, Bangor, LL57 1UT, Royaume-Uni
remi.manczak@xlim.fr

Résumé – Cet article présente les premiers résultats de spectroscopie diélectrique menées sur des cellules de lignées de glioblastomes (GBM) en mesurant, par diélectrophorèse, leurs fréquences de transition dans le domaine des Ultra Hautes Fréquences (>50 MHz). L'approche de caractérisation électrocinétique employée peut être utilisée pour discriminer des spécificités de propriétés diélectriques intracellulaires entre des cellules pouvant présenter des différences de profils phénotypiques : cellules indifférenciées vs différenciées. Grâce à un microsystème microfluidique, permettant l'analyse de cellules individuelles, nous avons pu mettre en évidence des différences notables de fréquences de transition sur deux lignées de GBM que nous pouvons corrélérer à des spécificités phénotypiques et biologiques.

cellules permet d'apporter de précieuses informations sur leurs caractéristiques biologiques et physiques. Parmi elles, la diélectrophorèse (DEP) est une méthode d'analyse de type "label-free", rapide et peu coûteuse, utilisant les principes de polarisation et de mouvement des bio-particules soumises à un champ électrique non uniforme [3]. Son efficacité a déjà été démontrée pour le piégeage et le tri de cellules à des fréquences de quelques dizaines voire centaines de kHz. Translatées dans la gamme des Ultra Hautes Fréquences (UHF), cette approche offre de nouvelles possibilités très prometteuses pour étudier des différences de propriétés diélectriques [4], cette fois ci intracellulaires, notamment au sein de populations de cellules différenciées et indifférenciées.

1. Introduction

Le glioblastome multiforme (GBM) est l'une des tumeurs les plus fréquentes et les plus agressives du système nerveux central, avec 240 000 nouveaux cas diagnostiqués dans le monde entier [1] pour une médiane de survie inférieure à 15 mois. Ce sombre pronostic est principalement dû à la récurrence de la tumeur, liée très probablement selon plusieurs hypothèses à l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC), qui résistent aux traitements conventionnels tels que la chimiothérapie et la radiothérapie. Cette sous-population est composée de cellules très immatures et non différenciées [2], responsables de l'hétérogénéité des cellules tumorales, sur-exprimant des marqueurs cellulaires non différenciés tels que CD133 et CD44 ainsi que des facteurs de transcription comme OCT-4, SOX2, pSTAT3 et NANOG. Ces différents marqueurs sont considérés comme des acteurs clés dans la régulation de la transcription des CSCs.

Néanmoins, les sous-populations de CSC sont très rares dans les tumeurs et leur identification nécessite souvent de les enrichir par une sélection, dans un milieu de culture spécifique, ce qui peut être très chronophage et rendre très complexe leur diagnostic. Pour optimiser ces méthodes de diagnostic, le développement de techniques basées sur la mesure des propriétés diélectriques des

2. Electromanipulation cellulaire par DEP

Dans le cas présent, un système de microélectrodes, composé de quatre électrodes disposées à 90° les unes des autres avec un gap de 40/40 µm et implémentées dans un canal microfluidique en Polydiméthylsiloxane (PDMS) [5], est utilisé comme capteur (Figure 1). Soumise à un champ électrique non uniforme, une cellule suspendue dans une solution aqueuse se comporte comme une particule diélectrique polarisable. Elle peut ainsi être sujette à des forces DEP capables de la déplacer [6]. L'intensité de cette force DEP peut se calculer à partir de l'équation (1), en considérant les équations (2) et (3).

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \text{Re}[K(\omega)] \nabla |E_{rms}|^2 \quad (1)$$

$$K(\omega) = \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right) \quad (2) ; \quad \epsilon_x^* = \epsilon_0 \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{\omega} \quad (3)$$

Où ϵ_m , représente la permittivité du milieu de suspension, r le rayon de la particule, ω la fréquence angulaire du champ électrique appliqué, E_{rms} la valeur quadratique moyenne de ce champ électrique, ∇ l'opérateur du gradient et $\text{Re}[K(\omega)]$ la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti dans lequel ϵ_p^* et ϵ_m^* représentent les permittivités de la particule et du milieu de suspension, calculées à partir de leurs permittivités relatives respectives et de la constante électrique ϵ_0 ($8.854 \cdot 10^{-12}$ F m⁻¹).

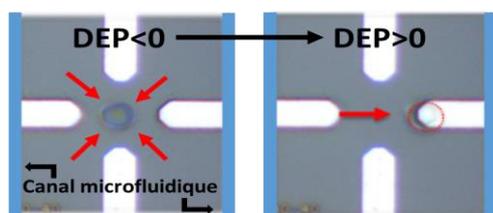


Figure 1. Principe de détermination de la fréquence de transition par DEP.

Lorsque $Re[K(\omega)]$ est négatif, la force générée est répulsive et la particule se retrouve confinée au centre des microélectrodes où l'intensité de champ électrique est minimale (DEP négative). En revanche, lorsque $Re[K(\omega)]$ est positif, la force est attractive amenant la particule à se déplacer vers une des électrodes latérales où le champ électrique est le plus intense (DEP positive). La fréquence de transition est atteinte lorsque la force devient nulle, cette configuration peut s'observer juste avant que la cellule bascule de sa position centrale à un bord d'électrode ou inversement.

Selon le type de propriétés cellulaires auquel on souhaite accéder, le choix de la gamme de fréquences DEP présente un réel intérêt [7]. Si des informations sur les spécificités de la membrane plasmique cellulaire sont recherchées, les fréquences DEP conventionnelles (typiquement de 100 kHz à 5 MHz) conviennent parfaitement à ce type d'analyse. En effet, dans cette gamme de basses fréquences, la forme, la morphologie et la taille de la cellule ont un impact important sur l'interaction avec le champ électrique. Inversement, dans la gamme de fréquences UHF (de 50 MHz à 500 MHz), le champ électrique généré par les microélectrodes n'est plus bloqué par la membrane cellulaire [8]. Il pénètre à l'intérieur de la cellule et permet de sonder son contenu. Ainsi, les fréquences de transitions UHF peuvent être caractéristiques des spécificités intracellulaires, différant d'une cellule à l'autre, suivant leur profil phénotypique.

3. Matériels et Méthodes

Dans cette étude, deux lignées de glioblastomes humains ont été utilisées, U87-MG et Ln18, toutes deux issues de gliomes de stade IV de patients adultes, provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Ces cellules de GBM ont été mises en culture dans deux milieux différents :

1. *Milieu de culture normal* (NN pour Normal Normoxie, conditions de différenciation classique), composé d'un milieu DMEM/Glutamax complété par 10% de Serum Fœtal Bovin (FBS), 2 mM de glutamine et de 100 U de pénicilline/0.1 mg/mL streptomycine.

2. *Milieu de culture sélectif, dit défini* (DN pour Défini Normoxie, conditions de culture stringentes) composé d'un milieu DMEM/F12 complété par 0.6% de glucose, 1.2% de bicarbonate de soude, 5 mM de HEPES, 9.6 µg/mL de putrescine, 10 µg/mL d'ITSS, 0.063 µg/mL de progesterone, 2 µg/mL d'héparine, 20 ng/mL d'EGF, 20 ng/mL de bFGF, 1X pénicilline/streptomycine et 2% de supplément B27 sans vitamine A.

Les cellules sont maintenues à 37°C dans un incubateur à atmosphère contrôlée avec 5% de CO₂. En milieu défini,

principalement seules les cellules les plus résistantes sont sélectionnées et survivent. Ainsi, comme illustré Figure 2, un fort enrichissement en cellules indifférenciées peut ainsi être réalisé dans les populations cellulaires cultivées en milieu DN.

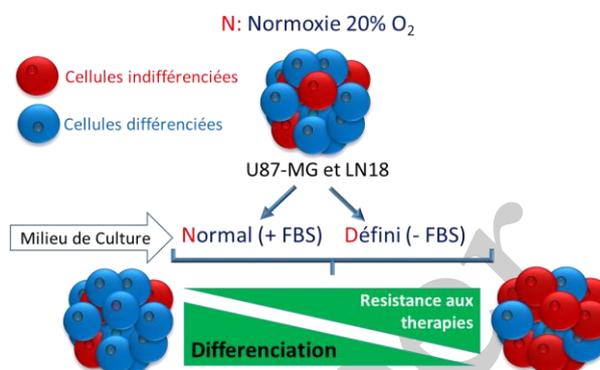


Figure 2. Conditions de cultures appliquées aux lignées GBM étudiées.

Une fois arrivées à confluence, les cellules sont introduites dans le capteur par voie microfluidique pour en caractériser leurs fréquences de transitions DEP. Au préalable, elles sont soumises à deux lavages successifs par centrifugation, et sont suspendues dans un milieu composé d'un mélange sucre/eau (pH : 7,4 ; conductivité : 26 mS/m ; osmolarité : 300 mOsm/L).

4. Résultats expérimentaux et corrélation

4.a. Analyses des marqueurs biologiques

La Figure 3 présente les résultats de l'analyse de l'expression des gènes (niveaux d'ARNm) exprimés par les cellules cultivées dans les deux conditions pendant 6 jours. Pour les deux lignées, les cellules cultivées dans le milieu DN montrent une forte surexpression de marqueurs de CSC (OCT-4, SOX2, et NANOG), par rapport aux mêmes cellules cultivées dans le milieu normal.

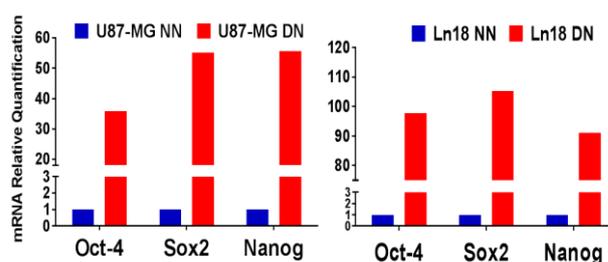


Figure 3. Expression génique de trois marqueurs d'indifférenciation, mesurée par PCR en temps réel.

Ces résultats ont été confirmés au niveau protéique par des analyses en cytométrie en flux. En effet, on observe sur la Figure 4, que pour chaque lignée, une augmentation de l'expression des marqueurs d'indifférenciation testés, CD44, CD133, SOX2 et OCT-4, est observable en milieu défini. L'ensemble de ces analyses biologiques confirme ainsi que la culture en milieu défini génère un fort enrichissement en cellules indifférenciées.

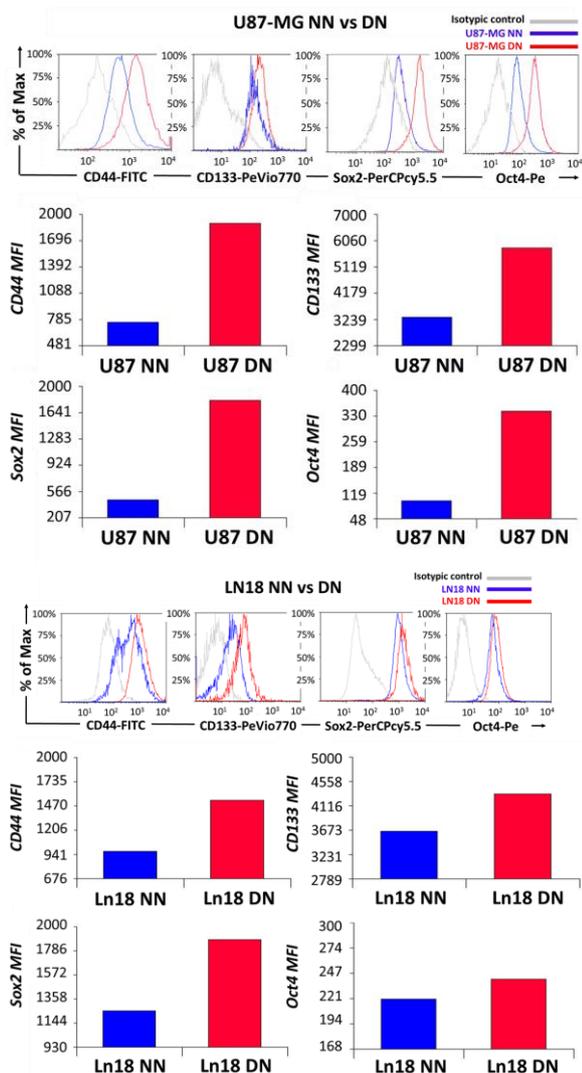


Figure 4. Expression de différents marqueurs d'indifférenciation par cytométrie en flux.

4.b. Etudes des signatures fréquentielles par DEP-UHF

Pour conforter ces résultats et analyses biologiques, ces quatre sous-populations cellulaires ont été également caractérisées par DEP-UHF, en déterminant leurs gammes de fréquences de transition respectives, à partir du capteur décrit Figure 1. Pour ces cellules, l'espacement choisi entre électrodes est de 40 µm. Ceci représente un bon compromis entre une observation correcte au microscope du mouvement de la cellule soumis aux forces DEP positives ou négatives et l'utilisation d'un signal RF modéré pour polariser la structure et agir efficacement sur les cellules piégées (tension appliquée comprise entre 2 et 4 V_{pp}). Lorsqu'une cellule arrive au voisinage du capteur, poussée par le flux imposé dans le canal, elle est ralentie puis stabilisée (en équilibrant la pression d'entrée et de sortie à chaque extrémité du canal microfluidique), pour être capturée par le quadripôle en appliquant simultanément le même signal DEP aux électrodes de gauche et de droite. Les électrodes sont donc ainsi polarisées dans un premier temps avec un signal DEP de

500 MHz, censé être beaucoup plus élevé que leur fréquence de transition et donc approprié pour piéger efficacement les cellules en DEP négative. En effet, des zones de champ de forte intensité sont générées aux bords des électrodes et entourent la zone de champ de faible intensité présente au centre du système. Une cage de champ électrique est ainsi créée dans laquelle la cellule peut être efficacement piégée. De plus, les autres cellules environnantes réagissent également en DEP négative et sont repoussées de la zone d'analyse en se déplaçant vers les zones de champ d'intensité plus faible, loin de la zone d'analyse. Ensuite, le signal DEP est d'abord désactivé pendant quelques secondes pour vérifier que la cellule piégée ne soit pas soumise à d'autres forces de mouvement, puis réactivé en réglant la fréquence du signal au-dessus de la fréquence de transition attendue pour commencer sa caractérisation.

Pour déterminer les signatures fréquentielles de chaque sous-populations de GBM, nous diminuons de manière graduelle la fréquence du signal DEP : tout d'abord par paliers rapides de 10 MHz, puis de 1 MHz au voisinage de la fréquence de transition de la cellule sous test. Étant donné que cet événement survient juste avant le moment où la cellule commence à être attirée par l'une des électrodes latérales, ce balayage lent de la fréquence est suffisant pour observer avec précision le passage d'un comportement DEP négatif à positif. A titre d'exemple, la Figure 5 montre une séquence de caractérisation de la fréquence de transition pour une cellule de lignée Ln18 cultivée en milieu normal. Pour chaque cellule, cette séquence est renouvelée deux ou trois fois avant d'être libérée pour pouvoir piéger une nouvelle cellule et caractériser sa fréquence de transition suivant la même approche.

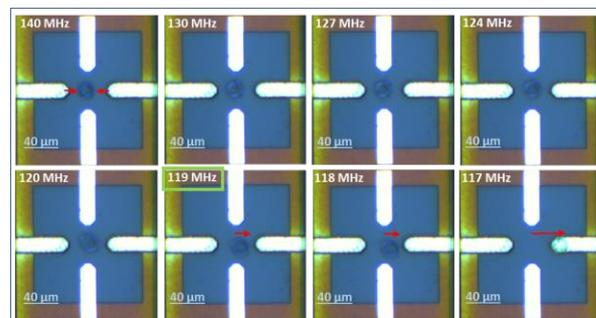


Figure 5. Observation microscopique permettant la caractérisation de la fréquence de transition (119 MHz) d'une cellule Ln18 en condition NN.

L'ensemble des fréquences mesurées pour les deux lignées cellulaires U87-MG et Ln18, dans les deux conditions de culture NN et DN, sont représentées sur la Figure 6 (à noter que la barre horizontale centrale de chaque boîte représente la médiane des valeurs collectées). La fréquence de transition considérée ici correspond à la fréquence à laquelle la cellule piégée commence tout juste à s'éloigner du centre du capteur. En complément, le Tableau 1 synthétise les principales données statistiques : nombre de cellules mesurées, les valeurs moyennes, médianes, l'écart et l'erreur type, ainsi que les fréquences minimales et maximales mesurées.

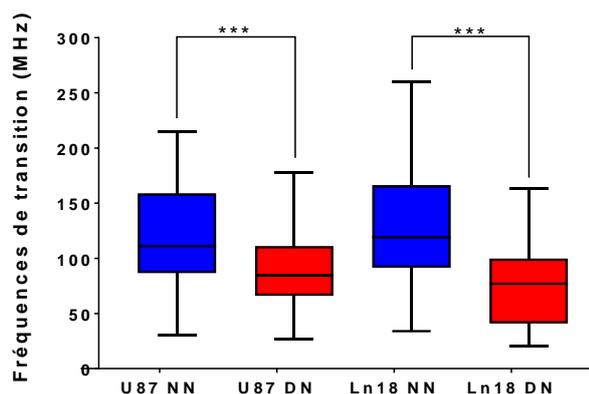


Figure 6. Synthèse des fréquences de transition observées sur cellules U87-MG et Ln18, NN et DN.

Lignée	Nombre	Moy.	Med.	Dev. Std.	SEM	Min	Max
U87 NN	104	120	111	45.11	4.36	30	215
U87 DN	57	91	85	36.34	4.73	27	178
Ln18 NN	138	128	119	53.11	4.47	34	260
Ln18 DN	116	76	77	34.47	3.17	20	163

Tableau 1. Données statistiques des différences de fréquences de transition (MHz) entre les lignées.

Comme indiqué, un nombre significatif de cellules ont été caractérisées suivant la méthode décrite précédemment, présentant ainsi des données statistiquement consolidées. Tout d'abord, il est important de noter que l'hétérogénéité naturelle des lignées cellulaires peut expliquer ces valeurs d'écart type et d'erreur standard, observées notamment pour les sous-populations cellulaires des U87-MG et Ln18 cultivées en NN : elles comprennent un grand nombre de cellules différenciées différentes mais également quelques cellules non différenciées, ce qui augmente la gamme de fréquences de transition. D'autre part, cet écart-type diminue pour les pools de cellules DN, qui concentrent un nombre beaucoup plus élevé de cellules indifférenciées et peu de différenciées, étant donné que les conditions de culture en DN ne sont pas favorables à une croissance cellulaire différenciée. L'analyse statistique des résultats observés et leur niveau de significativité démontre que la culture cellulaire en environnement défini semble avoir un réel impact sur les fréquences de transition des cellules de GBM. En effet, pour les deux lignées cellulaires, les cellules cultivées en DN présentent des signatures fréquentielles en moyenne nettement plus basses que les cellules cultivées en NN, bien que certaines fréquences de transition se chevauchent entre ces deux populations : U87-MG : Moyenne de 120 MHz en NN vs. 91 en DN ; Ln18 : Moyenne de 128 MHz en NN vs. 76 en DN. Ce constat confirme l'existence d'une réelle différence de caractéristiques diélectriques intracellulaires des populations enrichies en cellules indifférenciées par rapport aux cellules différenciées, qui reflètent bien les différences de propriétés biologiques intrinsèques existant entre ces dernières. Cette différence souligne également un fort potentiel de discrimination de cette technique de

spectroscopie par diélectrophorèse UHF entre ces différentes sous-populations cellulaires de la masse tumorale. Par conséquent, la DEP-UHF semble être également très prometteuse pour trier les cellules indifférenciées des cellules déjà différenciées et espérer en isoler les cellules souches cancéreuses.

5. Conclusion

Les deux lignées cellulaires GBM étudiées, U87-MG et Ln18, montrent une forte corrélation entre les différences de marqueurs biologiques analysés et les signatures fréquentielles mesurées par DEP-UHF en fonction des différentes conditions de culture. En complément des approches biologiques classiques, la spectroscopie par DEP-UHF a donc permis de caractériser les différences de propriétés diélectriques intracellulaires entre les populations de cellules différenciées et indifférenciées, démontrant ainsi un potentiel de discrimination élevé, en particulier pour le développement d'une nouvelle méthode sans marquage de caractérisation des cellules souches cancéreuses. Cette méthode confirme donc le potentiel élevé des plates-formes émergentes de laboratoire sur puce (LOC) pour le diagnostic et le traitement du glioblastome.

6. Remerciements

Ce projet a reçu un financement du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne, au titre de la convention de subvention N° 737164.

Références

- [1] M. Cheray et al., Editors In: De Vleeschouwer S1, editor. Glioblastoma [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep. Chapter 4.
- [2] A. Bradshaw, A. Wickremsekera, S. T. Tan, L. Peng, P. F. Davis, T. Itinteang, "Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme", *Front Surg.* 2016 Apr 15;3:21. doi: 10.3389/fsurg.2016.00021. eCollection 2016.
- [3] N. Abd Rahman, F. Ibrahim, B. Yafouz, "Dielectrophoresis for Biomedical Sciences Applications: A review". *Sensors* 2017, 17, 449.
- [4] L.Y. Zhang, C. Bounaix Morand du Puch, C. Dalmay, A. Lacroix, A. Landoulsi, J. Leroy, C. Mélin, F. Lalloué, S. Battu, C. Lautrette, S. Giraud, A. Bessaudou, P. Blondy, M.O.Jauberteau and A. Pothier, "Discrimination of Colorectal Cancer Cell Lines using Microwave Biosensors", *Sensors & Actuators: A. Physical*, Vol 216, 1 Sep 2014, Pages 405-416.
- [5] F. Hjeij et al., 46th European Microwave Conference (EuMC), London, October 2016.
- [6] R. Pethig, "Dielectrophoresis: Theory, Methodology and Biological Applications", 2017 John Wiley & Sons.
- [7] S. Afshar, A. Fazelkhan, E. Salimi, M. Butler, D.Thomson, G. Bridges, "Change in the Dielectric Response of Single Cells Induced by Nutrient Deprivation Over a Wide Frequency Range", 2017 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS).
- [8] C. Chung, R. Pethig, S. Smith, M. Waterfall, "Intracellular potassium under osmotic stress determines the dielectrophoresis cross-over frequency of murine myeloma cells in the MHz range", *Electrophoresis* 2018, 39, 989-997.