

# Cytomètre électromagnétique pour tri continu de cellules biologiques basé sur l'effet de forces diélectrophoretiques hautes fréquences

Thomas Provent, Rémi Manczak, Sofiane Saada, Claire Dalmay, Barbara Bessette, Pierre Blondy, Gaëlle Bégaud, Serge Battu, Marie Odile Jauberteau, Arnaud Pothier

▶ **To cite this version:**

Thomas Provent, Rémi Manczak, Sofiane Saada, Claire Dalmay, Barbara Bessette, et al.. Cytomètre électromagnétique pour tri continu de cellules biologiques basé sur l'effet de forces diélectrophoretiques hautes fréquences. XXIémes Journées Nationales Microondes, May 2019, Caen, France. hal-02481100

**HAL Id: hal-02481100**
**https://hal.science/hal-02481100**

Submitted on 17 Feb 2020

**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.

XXI[èmes] Journées Nationales Microondes
14-17 mai 2019 – Caen

# Cytomètre électromagnétique pour tri continu de cellules biologiques basé sur l'effet de forces diélectrophoretiques hautes fréquences

Thomas Provent[1+], Rémi Manczak[1], Sofiane Saada[2], Claire Dalmay[1], Barbara Bessette[2], Pierre Blondy[1], Gaëlle Begaud[2], Serge Battu[2], Marie Odile Jauberteau[2], Fabrice Lalloué[2], Arnaud Pothier[1]

[1] *XLIM-UMR 7252, University of Limoges/CNRS, 87060 Limoges, France,*
[2] *CAPTuR-EA 3842, University of Limoges, 87025 Limoges, France,*
[+]*thomas.provent@xlim.fr*

***Résumé*** *– Ce papier démontre le fort potentiel et les capacités de la diélectrophorèse Ultra-Haute Fréquence (DEP-UHF) pour trier des populations cellulaires. Le concept proposé combine des forces hydrodynamiques et diélectrophoretiques majoritairement répulsives au sein d'un cytomètre de type laboratoire-sur-puce. L'objectif principal est de séparer différents types de cellules en suspension dans un flux continu sur la base de leurs différences de propriétés diélectriques. Pour cela nous montrons qu'il est important d'appliquer aux cellules un champ électrique adéquat dans une gamme de fréquences particulières afin de produire différentes intensités de forces et de déviations de trajectoire associées. L'efficacité du dispositif sera illustrée au travers l'exemple d'un test de tri de cellules mésenchymateuses.*

## 1. Introduction

Dans le domaine biomédical, être capable de trier toujours plus efficacement des cellules est primordial pour un large éventail d'applications incluant le développement de nouvelles approches thérapeutiques ou diagnostiques mais aussi en biologie cellulaire. Ces dernières années, de nombreuses innovations ont permis l'émergence de nouvelles techniques dites «label-free» sans risque d'altération des cellules biologiques à analyser et dans un soucis de réduire les couts et les temps de préparation préalables.

Dans ce cadre, ces travaux portent sur l'utilisation de la Diélectrophorèse Ultra-Haute Fréquence (DEP-UHF) mettant à profit des signaux de quelques dizaines ou centaines de MHz. En effet, tout l'intérêt de cette approche, par rapport aux fréquences DEP utilisées d'ordinaire dans la gamme du kHz, réside dans le fait qu'aux MHz, le champ électrique n'est plus bloqué par la membrane cellulaire et peut pénétrer au sein de la cellule pour en sonder son contenu. Les spécificités intracellulaires peuvent être ainsi analysées [1-2].

L'objectif de ce papier est de développer une nouvelle génération de trieurs électromagnétiques de cellules biologiques à l'image du prototype présenté sur la Figure 1. Le principe de fonctionnement de ce cytomètre est basé sur l'utilisation de forces DEP-UHF principalement répulsives et sera présenté dans la section 2. L'évaluation de ses capacités de tri sur des cellules mésenchymateuses sera discutée dans la section 3.

## 2. Principe de fonctionnement du cytomètre

### *2.a. Interaction des cellules avec le champ*

Pour le cytomètre proposé, les cellules sont mises en suspension dans un milieu liquide circulant dans des canaux microfluidiques (Figure 1). Les cellules sont donc soumises à un flux hydrodynamique et au champ électrique généré par les électrodes implémentées au centre du canal principal. Ainsi leur trajectoire résulte de l'effet de la combinaison des forces hydrodynamiques et DEP.

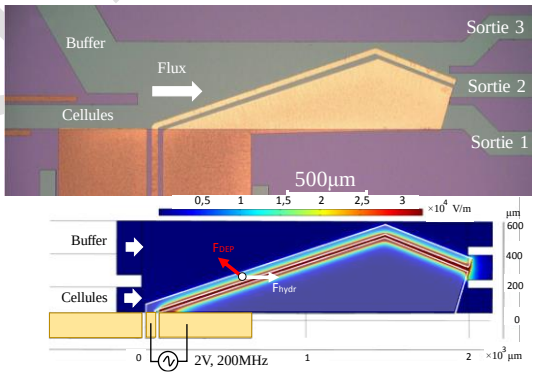



**Figure 1. Vue de dessus de la zone de tri du cytomètre et plot du champ électrique associé.**

Comme une cellule se comporte comme une particule polarisée une force de DEP agit sur elle lorsque celle-ci pénètre dans un gradient de champ électrique. L'intensité de cette force est principalement basée sur l'intensité du gradient de champ électrique, le rayon de la cellule, mais aussi sur les spécificités diélectriques propres de la cellule ce qui peut générer des critères de tri différents en fonction du type de cellules. L'intensité de cette force [3] est donnée par la formule (1) :

$$F_{DEP} = 2\pi \varepsilon_m f_{CM} r^3 \nabla |E_{rms}|^2 \qquad (1)$$

Avec $\varepsilon_m$ qui est la permittivité diélectrique du milieu de suspension de la cellule, $\nabla|E_{rms}|$ est le gradient du champ électrique, r le rayon de la cellule et $f_{CM}$ le facteur de Clausius-Mossotti qui peut se calculer au moyen de (2) :

$$f_{CM} = \frac{\varepsilon^*_p - \varepsilon^*_m}{\varepsilon^*_p + 2\,\varepsilon^*_m} \qquad (2)$$

Accepted Paper

Avec $\mathcal{E}^*_m$ et $\mathcal{E}^*_p$ sont respectivement la permittivité complexe du milieu et de la cellule. Considérant la cellule comme une sphère diélectrique uniforme entourée d'une membrane isolante, $\mathcal{E}^*_p$ peut être exprimé par (3) :

$$\mathcal{E}^*_p = \mathcal{E}^*_{mem}\left[\frac{\left(\frac{r}{r-d}\right)^3 + 2\frac{\mathcal{E}^*_{int} - \mathcal{E}^*_{mem}}{\mathcal{E}^*_{int} + 2\,\mathcal{E}^*_{mem}}}{\left(\frac{r}{r-d}\right)^3 - \frac{\mathcal{E}^*_{int} - \mathcal{E}^*_{mem}}{\mathcal{E}^*_{int} + 2\,\mathcal{E}^*_{mem}}}\right] \quad (3)$$

Avec d l'épaisseur de la membrane, $\mathcal{E}^*_{int}$ and $\mathcal{E}^*_{mem}$ qui sont respectivement la permittivité complexe du contenu intracellulaire et de la membrane. Ces permittivités complexes sont données par (4) :

$$\mathcal{E}^*_x = \mathcal{E}_x - \frac{j}{\omega}\sigma_x \quad (4)$$

Avec $\mathcal{E}_x$ la permittivité absolue, $\sigma_x$ est la conductivité et ω la fréquence angulaire du signal du champ électrique.

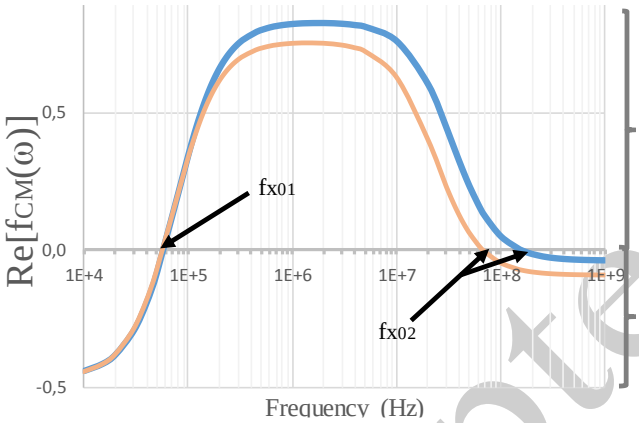



**Figure 2. Exemple de tracé de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti pour deux cellules avec des caractéristiques électriques différentes.**

Les cellules réagissent ainsi différemment au champ électrique suivant la fréquence du signal le générant comme le montre la Figure 2. Deux fréquences spécifiques nous intéressent spécifiquement ici, qui dépendent principalement des caractéristiques électriques (conductivité et permittivité) de la cellule. Ce sont les fréquences de transition du facteur de Clausius-Mossotti. À ces fréquences, appelées $fx_{01}$ et $fx_{02}$ pour respectivement la première fréquence de transition et la seconde, l'effet du champ sur les cellules est nul, et devient plus intense en s'écartant de ces fréquences. Lorsque le facteur de Clausius-Mossotti est supérieur à 0 (pour $fx_{01} < f < fx_{02}$), la cellule est sous l'influence d'une force DEP d'attraction dite positive (pDEP). À l'inverse, lorsque le facteur est inférieur à 0 (pour $f < fx_{01}$ ou $f > fx_{02}$), la cellule sera repoussée par le champ: la force sera négative (nDEP). Dans cet article nous intéresserons plus spécialement à la seconde fréquence de transition $fx_{02}$.

La Figure 3 illustre l'impact de cette force sur la trajectoire d'une cellule, guidée dans un canal microfluidique par un flux allant de droite à gauche, lorsqu'elle arrive à proximité d'un champ électrique généré par deux électrodes fines. C'est l'équilibre entre les forces hydrodynamiques et DEP qui déterminera si la cellule peut ou pas traverser le champ électrique. Dans les cas de forces DEP nulles (Figure 3 (c)), de forces nDEP faibles (Figure 3 (d)) et de forces pDEP faibles (Figure 3 (c)), les forces hydrodynamiques sont plus fortes et la cellule continuera à traverser le canal avec éventuellement une trajectoire légèrement modifiée [4]. En revanche, lorsque les forces DEP seront plus importantes, la cellule pourra se retrouver bloquée par le champ électrique : repoussée à distance en nDEP (Figure 3 (e)) ou piégée entre les électrodes en pDEP (Figure 3 (a)).

C'est pourquoi il semble intéressant de placer la fréquence DEP proche de $f_{x02}$. Cela permettra de modifier et d'ajuster plus finement la trajectoire de la cellule sous l'influence combinée du champ électrique et du flux.

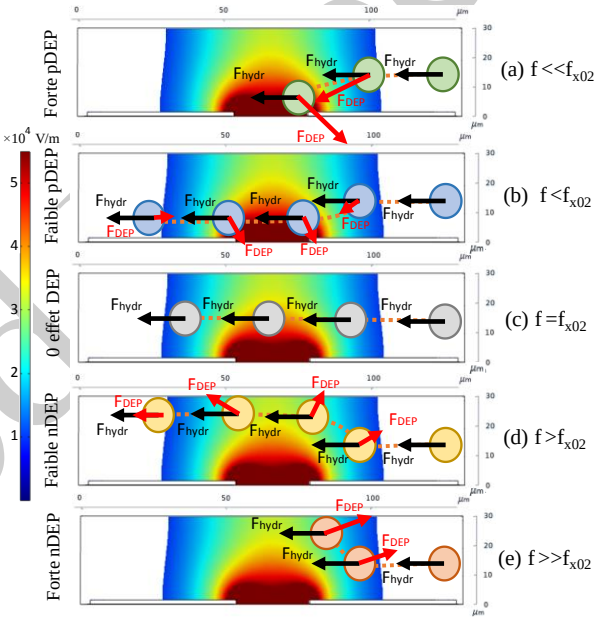



**Figure 3. Influence du champ électrique sur la trajectoire de la cellule.**

C'est sur ce principe et sur une géométrie d'électrode particulière similaire à celle utilisée dans [5] qu'a été conçu le cytomètre. Comme le montre la Figure 1, le champ généré par deux électrodes de 2µm d'épaisseur disposées à 20° de la direction de déplacement des cellules permet d'agir différemment sur leurs trajectoires. En configuration forte nDEP, les cellules sont repoussées et guidées jusqu'à la sortie 3 alors que pour de faibles forces elles seront collectées sur la sortie 2.

### *2.b. Choix adéquat de la fréquence DEP pour un tri efficace*

Pour l'application envisagée, un flux continu est généralement préférable pour traiter une suspension de cellules d'autant plus si un débit de tri élevé est recherché. Dans un tel objectif, l'immobilisation par piégeage de cellules au cours du tri se doit d'être évité. Elle favorisera la formation d'agglomérats qui vont perturber le flux et pourront affecter l'efficacité du système, voire même générer des obstructions dans les canaux et ainsi induire une défaillance du cytomètre.

Accepted paper

Pour utiliser un signal DEP capable de réaliser un tri efficace, nous recommandons de sélectionner une fréquence supérieure ou au moins voisine de $f_{x02}$ de la population de cellule d'intérêt. En effet, comme le présente la Figure 4, où deux types de cellules sont considérées avec leurs différences spectrales du facteur de Clausius-Mossoti, il devient possible de les séparer les deux populations en établissant la fréquence de tri du cytomètre juste au-dessus du plus haute valeur médiane des fréquences de transition des deux populations ($f_{x02B\ Median}$ ici).

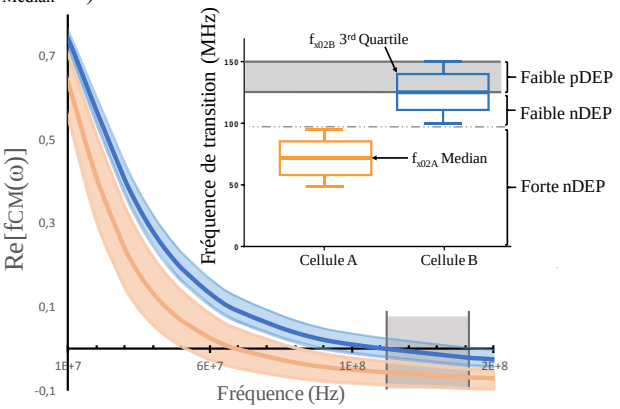



**Figure 4. Courbe du facteur de Clausius-Mossotti et dispersion de $f_{x02}$ pour deux populations de cellules différentes. La zone grise correspond aux fréquences intéressantes pour le tri.**

Au sein même d'une population de cellules intervient une hétérogénéité qui implique une différence des caractéristiques électriques entre cellules. Il en résulte une dispersion des fréquences de transition [6-7]. En prenant en compte une telle dispersion, pour les fréquences $f_{x02A}$ et $f_{x02B}$, on pourrait générer un champ qui ne soumettrait toutes les cellules de types B qu'à de très faibles forces et donc une déviation dans leurs trajectoires limitées. Dans cette situation, la plupart des cellules de type A seraient sous l'influence d'une force nDEP bien plus forte et donc prendraient un chemin autre. Comme le montre la Figure 4, les fréquences de tri appropriées pour ce cas se situent dans la partie haute des fréquences de transition de la cellule B. Attention tout de même à limiter la probabilité de piégeage de cellule par pDEP. Il est à noter qu'un tri d'autant plus efficace pourra être obtenu si la différence des fréquences de transitions des cellules et grande et un chevauchement limité entre leurs valeurs extrêmes.

## 3. Résultats expérimentaux

### *3.a. Matériels et Méthodes*

Le cytomètre présenté ici a été fabriqué sur un wafer de silicium de haute résistivité couvert par un oxyde de silicium de 1µm d'épais, et de de 2µm d'or pour réaliser le motif des électrodes. Pour ce qui est des canaux microfluidiques, ils ont été réalisés à partir un capot de PDMS texturé et aligné au-dessus des électrodes formant des canaux de 38µm de hauteur.

Les cellules utilisées dans nos expériences sont des Cellules Mésenchymateuses Souches (MSC) couramment utilisées. La culture a été réalisée dans un milieux F12 DMEM, complété par 10% de FCS et 20ng/mL de bFGF (basic Fibroblste Growth Factor) à 37°C dans un incubateur à 5% d'humidité et $CO_2$-95%. Elles ont été ensemencées à $5\times10^5$ cellules viables/ml dans un flacon approprié.

Les cellules pour les expériences ont été suspendues dans un milieu DEP de sucrose présentant une conductivité de 22,4mS/m. Pour maintenir les cellules en vie durant les expériences, une osmolarité de 304mOsm a été établie en ajustant la concentration de saccarose dans une eau déionisée.

### *3.b. Résultats*

La Figure 5 présente les trajectoires possibles pour une cellule traversant le cytomètre suivant les différentes combinaisons de forces hydrodynamiques et DEP auxquelles elle peut être soumise. On observe ainsi différentes déviations suivant l'intensité des forces DEP qui influence la cellule, pouvant aller à la guider le long de la zone de forte intensité de champ (Figure 5 (a)), à un piégeage dès sa rencontre (Figure 5 (d)).

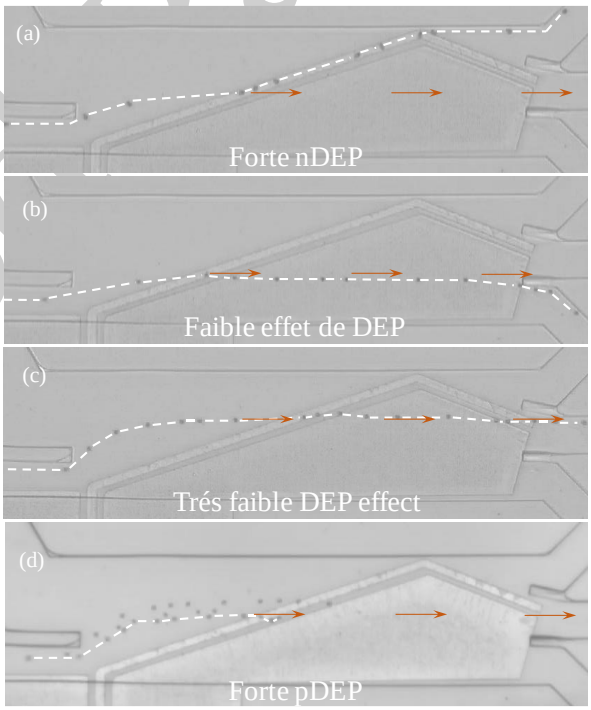



**Figure 5. Superposition d'images montrant la trajectoire de la cellule sous l'influence du champ E. La flèche orange indique la trajectoire attendue en l'absence de champ.**

La capacité de tri du cytomètre a été évalué à partir d'une autre suspension de cellules de plus forte concentration que la précédente. A partir de méthodes de mesure similaires à celles utilisées dans [4]-[7], les cellules mésenchymateuses étudiées ici ont été au préalable caractérisées en utilisant le même milieu de suspension DEP pour toutes les expériences. La plage de fréquence de transition attendue a ainsi pu être établie à partir d'un traitement statistique des données collectées à partir d'une vingtaine de cellules ainsi caractérisées (Figure 6). Ainsi, l'hétérogénéité de la population de

Accepted Paper

cellules se retrouve sur cette représentation graphique ou l'on peut y voir une dispersion de $f_{x02}$ dans une gamme allant de 75MHz à 160MHz avec une médiane des fréquences de transition à 90MHz.

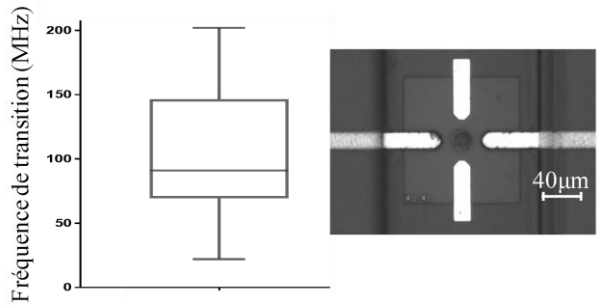



**Figure 6. Gamme de fréquences de transition pour les cellules mésenchymateuses.**

La Figure 7 montre, des résultats de séparation et de tri effectif de cellules MSC pour des configurations de concentration cellulaire plus importante que précédemment, et d'influence différente de la fréquence du signal ($f_{DEP}$) appliquée au cytomètre. En effet suivant notre choix de $f_{DEP}$, l'hétérogénéité naturelle présente au sein de la population cellulaire exprimée dans la Figure 6 doit se retrouver au sein du cytomètre avec des cellules déviées ou non de leur course en plus ou moins grand nombre.

Ainsi, les cellules ayant une fréquence de transition nettement inférieure à celle du signal DEP sont repoussées vers le haut du canal, vers la sortie 3, tandis que celles dont $f_{x02}$ se situe proche de $f_{DEP}$ ne sont pratiquement pas déviées et sont collectées à la sortie 2.

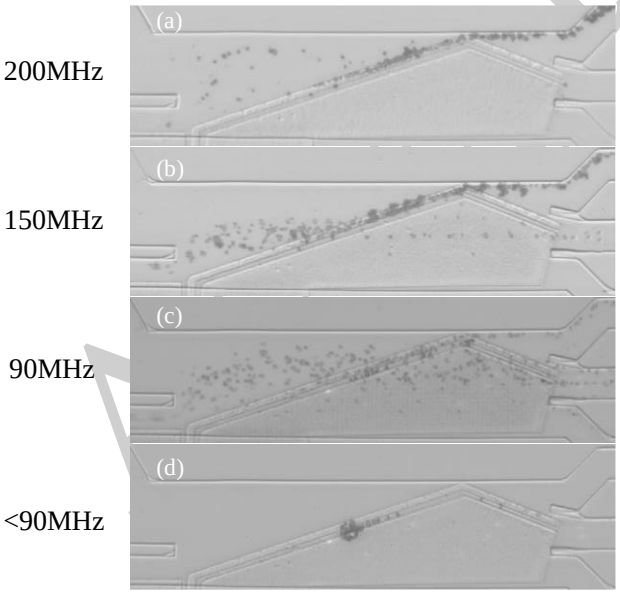



**Figure 7. Influence de la fréquence de DEP sur les sous populations de MSC.**

Comme attendu, à 200MHz presque toutes les cellules réagissent fortement en nDEP et sont déviées vers la sortie supérieure (Figure 7 (a)). Si nous utilisons une fréquence inférieure, à 150MHz, ce qui correspond au troisième quartile de la Figure 6, nous pouvons voir que plus de cellules ne sont plus déviées et sont maintenant collectées dans la sortie centrale (Figure 7 (b)). Ce résultat fait sens vu qu'approximativement 25% des MSCs doivent être soumises à de faibles forces DEP.

À 90MHz, le rapport de de cellules qui atteignent la sortie centrale augmente grandement (Figure 7 (c)) et cela car $f_{DEP}$ est plus proche de la valeur médiane de la fréquence de transition de la population. Pour des fréquences inférieures à 90MHz, de nombreux piégeages de cellules se produisent. Cela est lié au nombre bien trop grand de cellules réagissant maintenant en DEP positive. En conséquence, des agrégats de cellules commencent à se former (Figure 7 (d)). En revanche ce phénomène peut être minimisé en ajustant de manière plus appropriée l'intensité du champ électrique ou la vitesse du flux mais cela au dépend de l'efficacité du cytomètre : un bon compromis doit être trouvé pour pouvoir opérer à de telles fréquences.

## 4. Conclusion

Un premier prototype de cytomètre électromagnétique capable de trier des cellules sur leurs spécificités diélectriques intracellulaires a été conçu et testé. Nous avons pu valider qu'il est capable de séparer efficacement différentes sous populations cellulaires, à partir d'une fréquence de signal DEP judicieusement choisie.

## 5. Remerciements

Ce projet a bénéficié du support de l'Union Européenne au travers de son programme Future and Emergent Technologies Horizon 2020 FET et du projet SUMCASTEC (Grant Agreement N° 737164).

## Références

[1] H. Hadady et al. « *Continuous-flow sorting of microalgae cells based on lipid content by high frequency dielectrophoresis* », AIMS Biophysics, pp. 398-414, 2016.

[2] F. Hjeij *et al.* « *Biological Cell Discrimination Based on Their High Frequency Dielectropheretic Signatures at UHF Frequencies* », IEEE MIT-S Int. Microwave Symn. Dig pp 533-536, Honolulu 4-9 June 2017.

[3] L.WU *et al.* « *Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells* » Biofluidics 6, 0141113, 2012.

[4] S. Afshar, *et al.* « *Multi-Frequency DEP Cytometer Employing a Microwave Sensor for Dielectric Analysis of Single Cells* », in *IEEE Transactions on MTT*, vol. 64, no. 3, pp. 991-998, 2016.

[5] H.S. Moon et al. *« Continuous microfluidic airborne bacteria separation using dielectrophoresis »* TRANSDUCERS 2009, pp 2038-2041.

[6] C. Chung *et al. « Dielectrophoretic Characterisation of Mammalian Cells above 100 MHz »*, journal of Electrical Bioimpedance, pp. 64-71, 2011.

[7] R. Manczak *et al.* « *HF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells*», IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology, On page(s): 1-8, feb 2019.

Accepted Paper