



Extension d'un biocapteur hyperfréquences à l'électroporation in situ de cellules individuelles

A Calvel, Olivia Peytral-Rieu, Marie-Pierre Rols, David Dubuc, Katia Grenier

► To cite this version:

A Calvel, Olivia Peytral-Rieu, Marie-Pierre Rols, David Dubuc, Katia Grenier. Extension d'un biocapteur hyperfréquences à l'électroporation in situ de cellules individuelles. XXIIIèmes Journées Nationales Microondes, Jun 2024, Antibes Juan-Les-Pins, France. <hal-04651136>

HAL Id: hal-04651136

<https://hal.science/hal-04651136v1>

Submitted on 17 Jul 2024

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.



HAL Authorization

Extension d'un biocapteur hyperfréquences à l'électroporation *in situ* de cellules individuelles

A. Calvel^{1,2}, O. Peytral-Rieu¹, M-P. Rols², D. Dubuc¹, K. Grenier¹

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

² Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, UPS, Toulouse, France

anne.calvel@laas.fr

Résumé – Ce papier présente un biocapteur, initialement développé pour effectuer des analyses par Spectroscopie Diélectrique HyperFréquence (SDHF), qui est évalué pour l'ElectroPoration (EP) *in situ* de cellules individuelles. Nous démontrons la possibilité de caractériser des cellules cancéreuses vivantes dans le capteur HyperFréquences (HF) en mesurant leurs propriétés diélectriques, puis nous évaluons l'utilisation de ce capteur HF pour appliquer des champs électriques pulsés afin de déclencher la perméabilisation cellulaire. L'effet de la tension appliquée sur le nombre de cellules perméabilisées est étudié, permettant de déterminer le seuil de perméabilisation. Cela ouvre la voie à de futures études évaluant l'impact de l'EP *in situ* avec la méthode SDHF en utilisant un seul et même biocapteur pour une meilleure observation et compréhension du phénomène d'EP.

1. Introduction

Mener des études à l'échelle de la cellule individuelle est crucial pour une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et de l'hétérogénéité cellulaire. Parmi les méthodes existantes pour étudier les cellules, la Spectroscopie Diélectrique Hyperfréquence (SDHF) est intéressante en tant que méthode non invasive et non destructive permettant d'étudier les cellules directement dans leur milieu de culture, sans avoir recours à des marquages préalables [1], [2].

L'ElectroPoration (EP) est une méthode prometteuse qui suscite de nouveaux espoirs dans le domaine de l'oncologie, en particulier avec les approches de transfert de gènes et d'électrochimiothérapie [3], [4]. Ces méthodes sont basées sur l'application de champs électriques pulsés qui permettent l'entrée d'agents chimiques peu ou non perméants, tels que des plasmides et des agents cytotoxiques. Bien que l'efficacité et l'innocuité de ces techniques aient été démontrées [5], la recherche fondamentale à l'échelle de la cellule individuelle permettrait de mieux comprendre et contrôler l'EP à plus grande échelle. Cela permettrait d'améliorer la médecine personnalisée grâce à l'étude préliminaire des conditions d'EP sur les cellules du patient.

Les microcomposants sont des outils adaptés pour mener de telles études *in vitro* et *in situ*, tout en ne nécessitant que de faibles tensions électriques à appliquer lors de l'EP.

La SDHF s'étant révélée très prometteuse pour la détection précoce du comportement des cellules face à différents traitements [6], [7], il serait intéressant d'évaluer par SDHF la réponse cellulaire aux traitements d'EP *in situ*. Une telle étude a été abordée jusqu'ici avec EP réalisée *ex situ* [8]. Or, il est important également de l'étudier *in situ* pour ouvrir à une meilleure compréhension du phénomène d'EP. Dans ce but, nous proposons de réaliser l'EP *in situ* de cellules individuelles en utilisant un capteur HF conçu à l'origine pour réaliser des analyses SDHF. Après avoir démontré la capacité de notre biocapteur à effectuer des mesures SDHF, nous évaluons l'EP *in situ* avec ce même capteur. Nous étudions ensuite l'impact de champs électriques pulsés de différentes intensités sur des cellules cancéreuses PC3-GFP vivantes. Pour cela, nous quantifions pour cela la perméabilisation cellulaire en utilisant des biomarqueurs.

Par cette étude, nous démontrons ainsi la capacité du capteur HF à permettre l'application de champs électriques pulsés qui peuvent être utilisés pour déclencher une perméabilisation cellulaire réversible ou irréversible.

Ainsi, après avoir présenté les matériaux biologiques et les solutions cellulaires utilisés lors de nos expériences, nous présentons le biocapteur HF, initialement développé pour étudier les caractéristiques diélectriques de cellules individuelles dans leur milieu de culture, et évalué dans le cadre de l'EP de cellules.

2. Matériel biologique et solutions cellulaires

2.a. Solutions et réactifs

Le milieu de culture RPMI Gibco (haute teneur en glucose, GlutaMAX et HEPES), la généticine, la solution pen-strep (100X) (Gibco), le sérum de veau fœtal (SVF) (Hyclone), la trypsine-EDTA à 0,05% (Hyclone) et la Calcéine AM sont achetés auprès de Thermo Fisher Scientific. Le DPBS avec calcium et magnésium (1X) est acheté auprès de Eurobio Scientific. L'Iodure de Propidium (IP) et les constitutants du tampon d'électropulsation (1 mM MgCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 250 mM de saccharose) sont achetés auprès de Sigma Aldrich.

2.b. Culture et préparation cellulaire

Les cellules PC3-GFP (passages 10-30) sont des cellules cancéreuses humaines de la prostate qui sont cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF et 1% de solution pen-strep.

Afin d'être étudiées dans le capteur HF, les cellules sont mises en suspension dans du milieu RPMI et sont marquées à la Calcéine AM à une concentration finale de 1 mM.

3. Biocapteur HF pour l'étude diélectrique de cellules individuelles

Le capteur HF utilisé pour les études d'EP est tout d'abord évalué pour effectuer des analyses SDHF sur des cellules individuelles. Le capteur comprend un guide d'onde coplanaire pour permettre la propagation des ondes électromagnétiques, avec une coupure capacitive de 5 µm au niveau du conducteur central, comme présenté sur la figure 1 [9]. Un piège mécanique, placé au-dessus de la coupure capacitive et au centre d'un canal microfluidique, assure le maintien d'une cellule individuelle pour les études SDHF et d'EP.

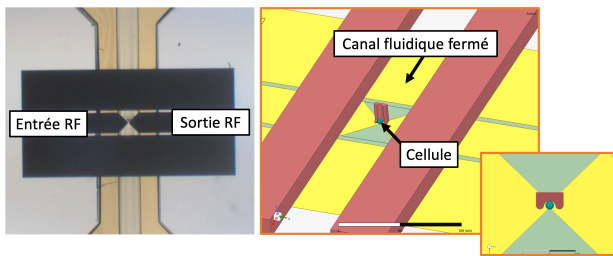


Figure 1. Photographie (à gauche) et schéma (à droite) de la partie centrale du biocapteur HF à cellule unique.

Le canal microfluidique, fait de résine, est transparent, permettant l'observation de la cellule piégée ainsi que des biomarqueurs fluorescents.

3.a. Démonstration de la spectroscopie diélectrique hyperfréquence sur une cellule individuelle avec le biocapteur HF

Les propriétés diélectriques des cellules sont obtenues à l'aide d'un banc de test comprenant un analyseur de réseau vectoriel, deux câbles et des pointes hyperfréquences placées à l'entrée et sortie du capteur. Les mesures sont précédées d'une calibration de type SOLT.

Une solution cellulaire (concentration de 10⁶ cellules/mL) est introduite dans l'entrée fluidique du capteur HF. Le débit est maintenu constant à l'aide d'un pousse-seringue connecté à la sortie du microdispositif. Dès qu'une seule cellule est bloquée dans le piège, l'entrée fluidique est continuellement alimentée en milieu RPMI.

Les propriétés diélectriques de la cellule sont obtenues en considérant un modèle électrique composé d'une capacité en parallèle d'une conductance, et en utilisant une méthode de contraste similaire aux méthodes existantes [9]. Le contraste capacitif de la cellule d'intérêt est obtenu

comme suit : $\Delta C = C_{\text{cellule}} - C_{\text{réf}}$, avec C_{cellule} la capacitance mesurée lorsqu'une cellule est bloquée dans le capteur rempli de milieu RPMI de référence, et $C_{\text{réf}}$ la capacitance mesurée lorsque le capteur est seulement rempli de milieu RPMI de référence. De même, le contraste conductif est obtenu comme suit : $\Delta G = G_{\text{cellule}} - G_{\text{réf}}$, avec G_{cellule} la conductance mesurée lorsqu'une cellule est bloquée dans le capteur rempli de milieu RPMI de référence, et $G_{\text{réf}}$ la conductance mesurée lorsque le capteur contient seulement du milieu RPMI de référence.

Les cellules sont étudiées sur une gamme de fréquences comprises entre 40 MHz et 40 GHz. Les paramètres S sont acquis à l'aide du logiciel CaptureVNA et le traitement de données réalisé pour extraire les propriétés diélectriques d'intérêt est effectué à l'aide d'un programme Matlab développé en interne pour s'affranchir des accès coplanaires et murs fluidiques du capteur et extraire les performances électriques du liquide sous test. Un exemple des propriétés diélectriques mesurées d'une cellule unique PC3-GFP vivante est présenté sur la figure 2.

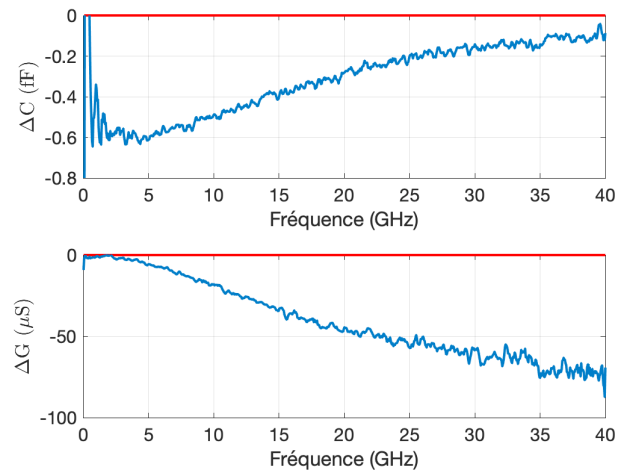


Figure 2. Spectres fréquentiels (40 MHz - 40 GHz) d'une cellule unique PC3-GFP (en bleu). Les contrastes capacitifs et conductifs sont obtenus en utilisant le milieu de culture RPMI comme référence (en rouge).

Les contrastes capacitifs et conductifs entre la cellule et le milieu RPMI de référence sont suffisamment importants pour permettre l'étude des propriétés diélectriques d'une cellule unique. En effet, à 5 GHz, $\Delta C \approx -0,6$ fF et à 30 GHz, $\Delta G \approx -58,6$ µS. Ces valeurs obtenues sont cohérentes avec des études SDHF menées sur cellules uniques [8], ce qui valide l'utilisation du capteur HF pour fournir une caractérisation diélectrique de cellules uniques.

La prochaine étape de notre étude consiste à évaluer si le capteur HF est adapté à l'application *in situ* de champs électriques pulsés afin d'électroporer des cellules uniques.

3.b. Démonstration de l'électroporation *in situ* d'une cellule unique avec le biocapteur HF

Pour électroporer les cellules, des impulsions électriques sont appliquées avec un générateur connecté à des électrodes en tungstène placées de part et d'autre du

guide d'onde coplanaire du biocapteur. La forme des impulsions électriques est vérifiée à l'aide d'un oscilloscope. Les impulsions délivrées consistent en un train de 8 impulsions de 5 ms de durée, à une fréquence de 1 Hz et d'amplitude variable. Le choix de ces paramètres est dû au fait qu'ils sont fréquemment utilisés pour les applications de transfert génique *in vitro* et *in vivo* [10]. Les impulsions électriques sont appliquées dans un tampon d'électroporation contenant de l'IP à une concentration finale de 100 μM . L'IP est en effet une molécule non perméante utilisée comme biomarqueur pour évaluer la perméabilisation des cellules. Une fois la membrane cellulaire endommagée, l'IP se lie aux doubles brins d'ADN, amplifiant alors son rendement quantique d'un facteur 20 à 30.

L'effet de l'application d'impulsions électriques de différents voltages (de 0 V à 7 V) est étudié afin de déterminer le seuil de perméabilisation.

La mise en place des électrodes et le suivi des marqueurs fluorescents sont effectués sous un microscope à fluorescence. Un pousse-seringue est utilisé pour maintenir un flux continu dans le canal microfluidique. Le banc de test est présenté sur la figure 3.

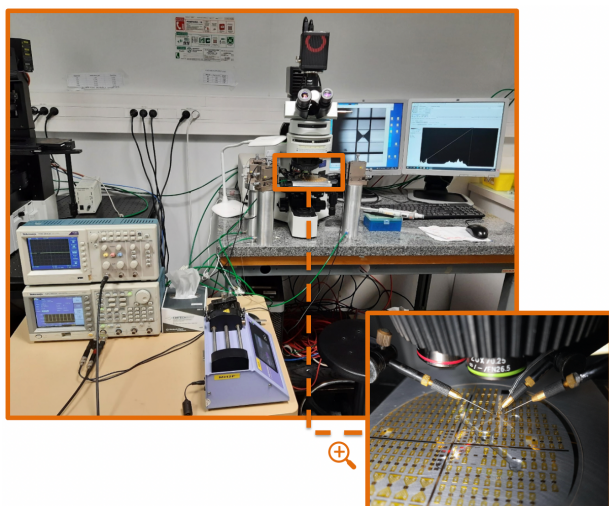


Figure 3. Banc de test pour mener des études EP *in situ*, composé d'un générateur, d'un oscilloscope, d'électrodes en tungstène, d'un pousse-seringue et d'un microscope à fluorescence.

La solution cellulaire est préalablement marquée à la Calcéine AM (1 mM). Il s'agit d'une molécule perméable utilisée comme biomarqueur pour déterminer la viabilité des cellules et permettre ainsi la sélection de cellules vivantes dans le capteur HF. Une fois qu'une seule cellule est piégée dans le microdispositif, l'entrée fluide du capteur HF est alimentée en tampon d'électroporation avec de l'IP (100 μM). Des impulsions électriques sont ensuite appliquées. Pour évaluer leur impact sur les cellules, l'absorption d'IP et la fuite de Calcéine AM sont visualisées en temps réel en utilisant les filtres M-cherry et GFP, respectivement, d'un microscope à fluorescence. L'intensité de fluorescence de l'IP et de la Calcéine AM est mesurée avant et après EP à l'aide du logiciel ImageJ.

Des champs électriques de différentes amplitudes sont appliqués sur des cellules individuelles PC3-GFP. Un

exemple du comportement cellulaire après l'application d'impulsions de 4,5 V d'amplitude est présenté sur la figure 4. Nous pouvons observer l'incorporation d'IP directement après l'application des impulsions, ainsi qu'une diminution de l'intensité de la fluorescence de la Calcéine AM. Ces deux phénomènes observés confirment que la cellule a été électroporée dans ces conditions.

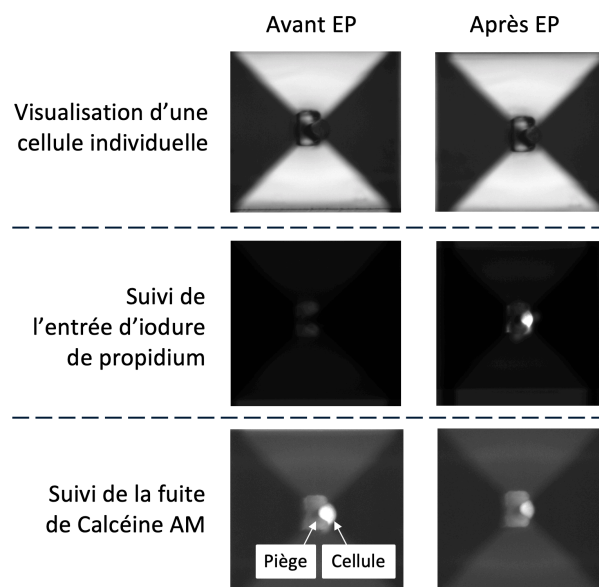


Figure 4. Suivi de l'EP *in situ* d'une cellule PC3-GFP avec des biomarqueurs fluorescents. L'EP consiste en un train de 8 impulsions de 5 ms de durée, de 4,5 V d'amplitude à une fréquence de 1 Hz.

L'intensité du champ électrique étant un paramètre essentiel dans le déclenchement de l'EP, une étude de l'impact de la tension (comprise entre 0 V et 7 V) sur la perméabilisation est menée (voir figure 5).

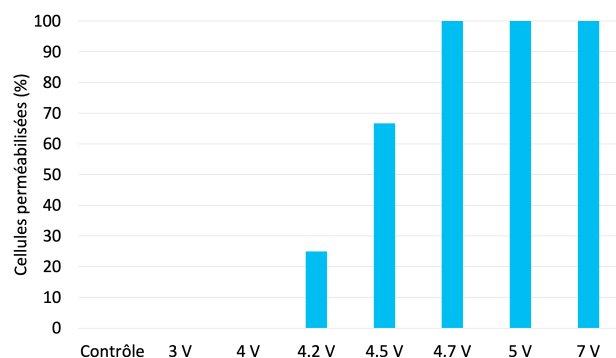


Figure 5. Pourcentage de cellules perméabilisées après l'application de 8 impulsions de 5 ms de durée à une fréquence de 1 Hz. Pour chaque condition de tension testée, au moins 3 cellules sont étudiées.

Nous observons que des tensions supérieures à 4,2 V doivent être appliquées pour déclencher l'EP des cellules (i.e., le seuil de perméabilisation se situe autour de 4,2 V). Ces résultats sont cohérents avec les études qui évaluent l'impact de l'EP à l'échelle macroscopique avec des champs électriques de l'ordre de quelques kV/cm [11].

4. Conclusion

Ce papier vise à établir l'utilisation possible d'un biocapteur HF adapté à la caractérisation diélectrique de cellules uniques pour l'application *in situ* de stimuli électriques.

Des analyses SDHF sur une cellule PC3-GFP vivante sont réalisées et démontrées. Avec le même microdispositif, l'EP *in situ* de cellules individuelles est ensuite effectuée. Le comportement cellulaire est étudié à l'aide de biomarqueurs fluorescents. En étudiant l'incorporation d'IP dans la cellule et la fuite de Calceïne AM, la perméabilisation cellulaire à l'échelle de la cellule unique est évaluée. Une fois que l'EP d'une cellule unique dans le biocapteur HF est démontrée, une étude est menée afin d'évaluer l'impact de la tension sur la perméabilisation cellulaire en appliquant des amplitudes variant de 0 à 7 V. Ceci nous permet de déterminer le seuil de perméabilisation spécifique aux conditions d'EP et à la lignée cellulaire. Ce seuil correspond ici à 4,2 V.

Cette étude valide donc l'utilisation possible d'un biocapteur HF pour l'EP de cellules individuelles. Le biocapteur peut ainsi être utilisé pour l'application de stimuli ainsi que pour de la détection HF, ce qui ouvre la voie à des études SDHF de l'impact de l'EP *in situ* sur des cellules uniques, dans le but de mieux comprendre le phénomène d'EP.

5. Remerciements

Ce travail a été en partie réalisé grâce à la plateforme de micro et nanotechnologie du LAAS-CNRS, membre du réseau RENATECH et à un financement de l'Université Fédérale de Toulouse.

Références

- [1] F. Artis et al., "Microwaving biological cells: Intracellular analysis with microwave dielectric spectroscopy," *IEEE Microw. Mag.*, vol. 16, no. 4, pp. 87–96, 2015, doi: 10.1109/MMM.2015.2393997.
- [2] K. Grenier et al., "Recent advances in microwave-based dielectric spectroscopy at the cellular level for cancer investigations," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 61, no. 5, pp. 2023–2030, 2013, doi: 10.1109/TMTT.2013.2255885.
- [3] M. Cemazar and G. Sersa, "Recent Advances in Electrochemotherapy," *Bioelectricity*, vol. 1, no. 4, pp. 204–213, 2019, doi: 10.1089/bioe.2019.0028.
- [4] L. C. Heller and R. Heller, "Electroporation Gene Therapy Preclinical and Clinical Trials for Melanoma," *Curr. Gene Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 312–317, 2010, doi: 10.2174/156652310791823489.
- [5] M. Cemazar et al., "Efficacy and safety of electrochemotherapy combined with peritumoral IL-12 gene electrotransfer of canine mast cell tumours," *Vet. Comp. Oncol.*, vol. 15, no. 2, pp. 641–654, 2017, doi: 10.1111/vco.12208.
- [6] H. Li, X. Ma, X. Du, L. Li, X. Cheng, and J. C. M. Hwang, "Correlation between optical fluorescence and microwave transmission during single-cell electroporation," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 66, no. 8, pp. 2223–2230, 2019, doi: 10.1109/TBME.2018.2885781.

10.1109/TBME.2018.2885781.

- [7] A. Tamra, A. Zedek, M.-P. Rols, D. Dubuc, and K. Grenier, "Single Cell Microwave Biosensor for Monitoring Cellular Response to Electrochemotherapy," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 69, no. 11, pp. 3407–3414, Nov. 2022, doi: 10.1109/TBME.2022.3170267.
- [8] A. Tamra, M. Deburghgraeve, D. Dubuc, M.-P. Rols, and K. Grenier, "Microwave dielectric spectroscopy for single cell irreversible electroporation monitoring," in *2016 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, 2016, pp. 1–4, doi: 10.1109/MWSYM.2016.7540429.
- [9] 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," *IEEE MTT-S Int. Microw. Symp. Dig.*, pp. 29–32, 2013, doi: 10.1109/MWSYM.2013.6697740.
- [10] M.-P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, and J. Teissie, "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma," *Nat. Biotechnol.*, vol. 16, no. 2, pp. 168–171, 1998, doi: 10.1038/nbt0298-168.
- [11] T. Potočník, D. Miklavčič, and A. Maček Lebar, "Effect of electroporation and recovery medium pH on cell membrane permeabilization, cell survival and gene transfer efficiency in vitro," *Bioelectrochemistry*, vol. 130, pp. 2–12, 2019, doi: 10.1016/j.bioelechem.2019.107342.