



HAL
open science

Suivi en temps réel de l'effet de la TSA sur des sphéroïdes par spectroscopie diélectriques microondes entre 500MHz et 20GHz

Olivia Peytral-Rieu, Yuwei Li, David Dubuc, Katia Grenier

► To cite this version:

Olivia Peytral-Rieu, Yuwei Li, David Dubuc, Katia Grenier. Suivi en temps réel de l'effet de la TSA sur des sphéroïdes par spectroscopie diélectriques microondes entre 500MHz et 20GHz. XXIIIème Journées Nationales Microondes, Jun 2024, Antibes - Juan les Pins, France. hal-04773798

HAL Id: hal-04773798

<https://hal.science/hal-04773798v1>

Submitted on 8 Nov 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.

Suivi en temps réel de l'effet de la TSA sur des sphéroïdes par spectroscopie diélectriques microondes entre 500MHz et 20GHz

O. Peytral-Rieu¹, Y. Li¹, D. Dubuc¹ et K. Grenier¹

¹ LAAS-CNRS, 7 avenue du Colonel Roche, 31400 Toulouse
opeytral@laas.fr

Résumé – Afin de réduire la différence de résultats entre les tests en laboratoire et les résultats *in vivo*, les biologistes utilisent un modèle intermédiaire entre la culture en tapis cellulaire 2D et l'étude de tissus prélevé de patients : les sphéroïdes. L'étude non invasive, non destructive et sans marquage préalable de tel objet existent notamment en utilisant les ondes électromagnétiques de basse fréquence mais ne permettent pas de réaliser du suivi temps réel, ni de traverser la membrane cellulaire contrairement aux micro-ondes. Dans cet article un micro-dispositif fluide adapté à réaliser un suivi temps réel de sphéroïdes vivants soumis à un stress chimique, ici la trichostatine A, est présenté avec la caractérisation de l'effet différentes concentrations de 0.5 à 20GHz.

1. Introduction

Les sphéroïdes tridimensionnels multicellulaires (3D) sont reconnus comme des modèles biologiques intéressants pour l'évaluation préclinique des thérapies contre le cancer en raison de leurs caractéristiques proches des tumeurs *in vivo*. La spectroscopie diélectrique micro-ondes gagne en intérêt comme technique d'analyse cellulaire. En effet, par l'interaction des champs électromagnétiques avec les biomatériaux il est possible d'analyser les caractéristiques diélectriques de l'échantillon, de façon non invasive, non destructive, sans marquage préalable [1]–[3]. Dans la gamme de fréquences des microondes, les ondes électromagnétiques traversent la membrane plasmique des cellules, donnant accès à une caractérisation diélectrique intracellulaire. Ces caractérisations sont reliées à un état de bonne ou de mauvaise santé de l'échantillon, mais aussi permettent de détecter des cascades intracellulaires déclenchées à la suite d'un stress appliqué par exemple [4], [5].

Un capteur micro-ondes (HF) ayant été optimisé est utilisé ici, dans le cadre de l'évaluation en temps réel des réponses biologiques de sphéroïdes soumis à différentes concentrations d'un agent chimique. Le protocole a été développé spécifiquement pour cette application de façon à mesurer des sphéroïdes sous stress chimique pendant 1h30. Ce protocole a été utilisé dans le cadre de l'étude de l'effet de la trichostatine A (TSA) sur des cellules cancéreuses du foie de type hépatocarcinome. En effet, cette molécule avait été étudié dans le cadre de ses effets anticancéreux pour ce cancer grave et difficilement traité aujourd'hui [6].

2. Matériels & Méthodes

2.a. Matériels & Réactifs

La trichostatine A est acheté à la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le Gibco DMEM (haut en glucose, supplément GlutaMAX et pyruvate), le serum fœtal de veau (SVF) (HyClone), la solution de pen-strep (100X) (Gibco), la Trypsin-EDTA 0.05% (HyClone), le Phosphate Buffered Saline Gibco 1X (PBS) et l'HEPES 1M (Gibco) sont achetés de la société Thermo FisherScientific (Illkirch-Graffenstaden, France). La lignée cellulaire HepG2 (catalog number HB8065) est acheté à partir de l'American Type Cell Collection (ATCC) (LGC Standards, Molsheim, France).

2.b. Culture cellulaire

Des cellules hépatiques humaines (HepG2, passages 15-35) ont été mises en culture à 37°C/5% CO₂ dans du milieu DMEM complété avec 10% de SVF et 1% de solution pen-strep, avant de les préparer pour en former des sphéroïdes grâce à la procédure présentée dans [7].

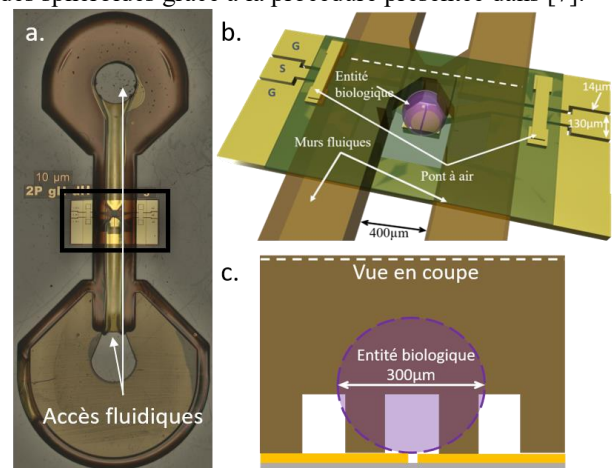


Figure 1. Micro-dispositif utilisé pour cette étude. a) Photo globale du dispositif, b) schéma de la zone spécifique du capteur avec le placement du sphéroïde, c) vue en coupe du piège fluide

2.c. Structure du micro-dispositif

La Figure 1 présente le biocapteur radiofréquences (RF) développé. Le positionnement des pointes RF est réalisé grâce à des guides d'ondes coplanaires détaillé dans [8].

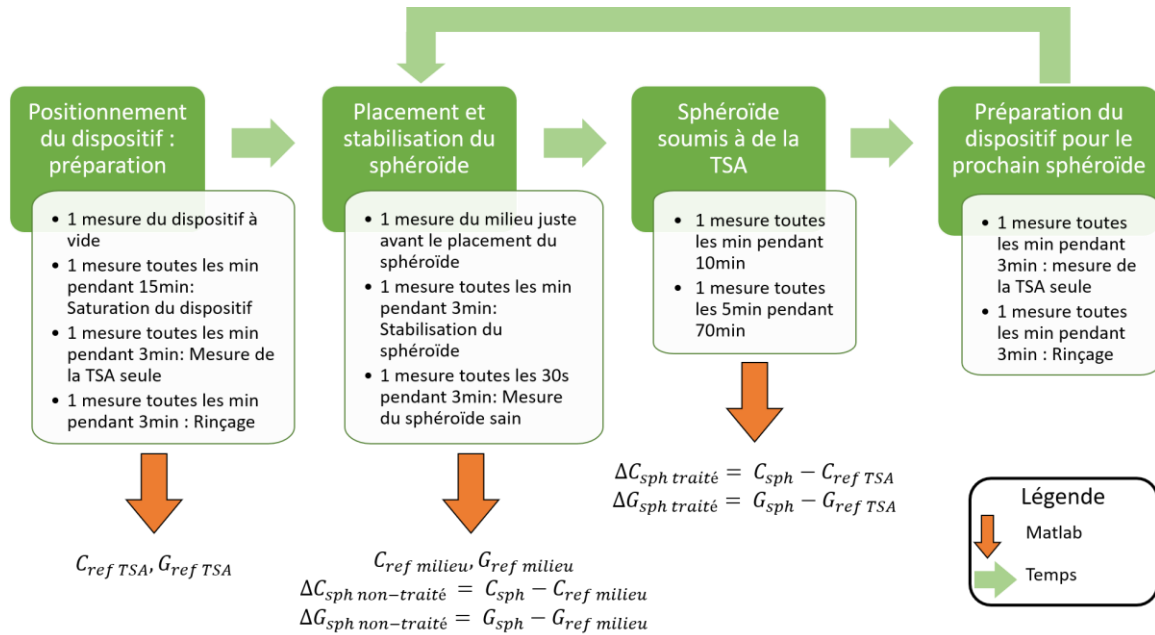


Figure 2. Diagramme temporel représentant le protocole de mesure en temps réel de sphéroïde traité avec de la TSA.

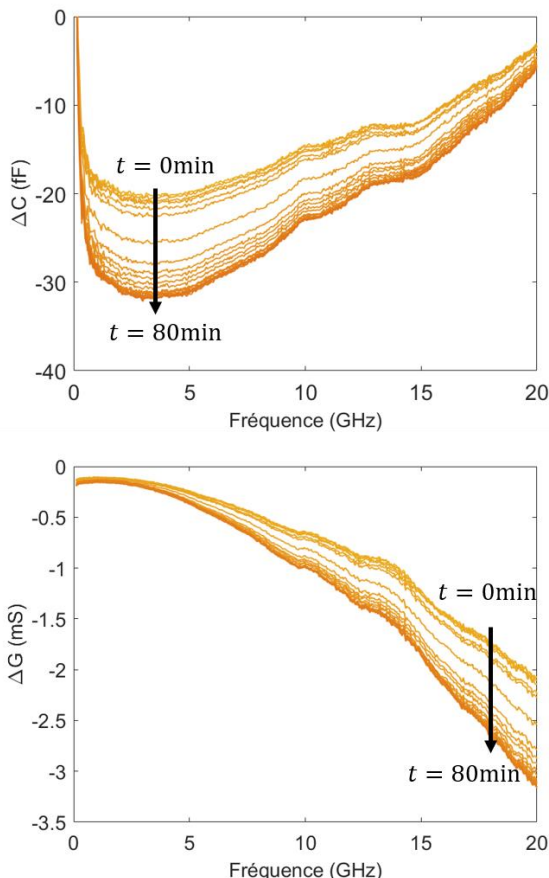


Figure 3 : Exemple de l'évolution temporelle des spectres des contrastes capacitifs et conductifs d'un sphéroïde soumis à une concentration de 0,3351µM de TSA

Le biocapteur est composé d'une ouverture capacitive de 10 µm de large au centre de la structure, visible sur la Figure 1 b). Le sphéroïde est positionné au-dessus de

l'ouverture capacitive grâce à un système fluïdique qui utilise un piège fluïdique sous forme de pont contenant trois canaux. Un central, et deux latéraux de façon à bloqué le sphéroïde directement sur le capteur, en son centre.

2.d. Mesures de sphéroïdes dans le dispositif et analyses des données

Lors de la caractérisation diélectrique expérimentale de 0.5 GHz à 20 GHz, le micro-capteur fabriqué est connecté à un Analyseur de Réseau Vectoriel grâce à deux pointes coplanaires et deux câbles coaxiaux. Une calibration de type Short-Open-Load-Thru (SOLT) est réalisée avant chaque expérience.

Le protocole expérimental développé et spécifique à l'analyse en temps réel de sphéroïdes est présenté à la Figure 2. La première étape permet d'obtenir la mesure de référence lors de mise en contact du sphéroïde avec l'agent thérapeutique, la TSA, mesure nécessaire au calcul de contraste réalisé pendant la phase 3. La deuxième phase permet de réaliser une première mesure du sphéroïde et de vérifier son « état de santé » lorsque mis dans le dispositif. La troisième phase correspond à la phase de test en temps réel lorsque le sphéroïde est mis en contact avec la drogue. Enfin, la dernière phase permet de préparer le dispositif pour le prochain sphéroïde.

L'analyse est réalisée à partir d'un programme élaboré sur le logiciel Matlab comme mentionné à la Figure 2. Ce code permet d'extraire à partir de la mesure de paramètres S des contrastes capacitif (ΔC) et conductif (ΔG) spécifique à l'échantillon d'étude (en supprimant l'influence des lignes d'accès CPW, ainsi que l'influence du milieu hôte dans lequel sont les sphéroïdes), ce code a déjà été décrit dans [9].

L'analyse des résultats obtenus se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, ne seront présentés dans cet article que les contrastes obtenus après l'ajout de TSA puisque

des contrastes n'ayant pas la même valeur de référence ne sont pas comparables. L'origine du temps est donc placée à la première valeur prise après ajout de TSA dans le dispositif. La Figure 3 montre un exemple d'une série de spectre en fonction de la fréquence, obtenu pour un sphéroïde traité avec une concentration de $0.3351\mu\text{M}$ (EC90). Afin de réaliser une étude de la cinétique observée il a été décidé de se concentrer sur une fréquence par paramètre, celle permettant la meilleure discrimination de chacune des courbes : 2GHz pour le contraste capacitif et 20GHz pour le contraste conductif.

De plus, les sphéroïdes ne comportant pas exactement la même taille, afin de comparer les comparer entre eux au sein d'une même concentration testée, il a été décidé de ne pas représenter le contraste capacitif et conductif mais un contraste dit « cinétique » de ces deux mêmes paramètres, exprimés comme suit :

$$\Delta C_{\text{cinétique}} = \Delta C_{2\text{GHz}}(t) - \Delta C_{2\text{GHz}}(t = 0) \quad (2)$$

$$\Delta G_{\text{cinétique}} = \Delta G_{20\text{GHz}}(t) - \Delta G_{20\text{GHz}}(t = 0) \quad (3)$$

3. Résultats

Les résultats des mesures RF de chacune des conditions évaluées en fonction du temps sont présentés par les six graphiques (trois colonnes et deux lignes) de la Figure 4. Chaque colonne de la Figure 4 correspond à une concentration donnée : de la concentration la plus faible à gauche $0.335\mu\text{M}$ (EC90) à la plus forte à droite $335\mu\text{M}$ ($1000 \cdot \text{EC90}$). Chaque ligne correspond à un paramètre électrique, la ligne supérieure représente le contraste capacitif à 2 GHz et la ligne inférieure le contraste conductif à 20 GHz. Un sphéroïde contrôle a été mesuré dans son milieu de culture et est représenté en bleu sur tous les graphes. Il permet de mesurer la dérive dans le temps des mesures. Cette dérive de mesure du sphéroïde contrôle peut s'expliquer à cause d'une évolution de l'état biologique des sphéroïdes pendant les 1h30 de la mesure. En effet, l'intégralité du banc de test se situe dans une salle

d'expérimentation dont la température est maîtrisée aux alentours de 25°C , ce qui ne correspond pas aux meilleures conditions de maintien de cellules eucaryotes qui devraient être à 37°C avec 80% d'humidité et 5% CO_2 dans l'air qui les environnent.

Le contraste cinétique maximum en valeur absolu observé sur le sphéroïde contrôle permet de déterminer à partir de quand la variation du paramètre diélectrique est significative suivant le traitement chimique appliqué, ici la TSA. Grâce à cette définition nous pouvons déterminer le temps minimal à partir duquel notre dispositif est capable de mesurer cette différence significative liée à l'application d'un traitement chimique : il est quasi instantané pour toutes les concentrations de TSA. Dit autrement, l'influence de la TSA est observée dès les premières minutes d'exposition alors même que la plupart des études biologiques décrivant le mode d'action de la TSA sur des cellules de type HepG2 sont réalisées après au minimum 24h d'exposition [6], [10], [11]. Les études biologiques classiques ont été capables de prouver une influence de la TSA au plus tôt à 30min à cause de la difficulté de réaliser des études biologiques plus tôt [12]. Il a été prouvé que la TSA est un inhibiteur de l'histone désacétylase, enzyme permettant la modification des histones de l'ADN, modification essentielle pour le bon fonctionnement des cellules mammifères [10]. La TSA empêche ainsi la prolifération des cellules provoquant le déclenchement de l'apoptose. Ici nous démontrons la capacité de la spectroscopie diélectrique micro-ondes à mesurer une réaction biologique de façon très précoce contrairement à toutes les méthodes classiquement utilisées en biologie (PCR, microscopie, etc).

Les mesures présentées ne permettent pas de déterminer une influence de la concentration sur l'effet de l'agent chimique des sphéroïdes testés parce qu'il n'y a pas assez de sphéroïdes pour proposer une conclusion.

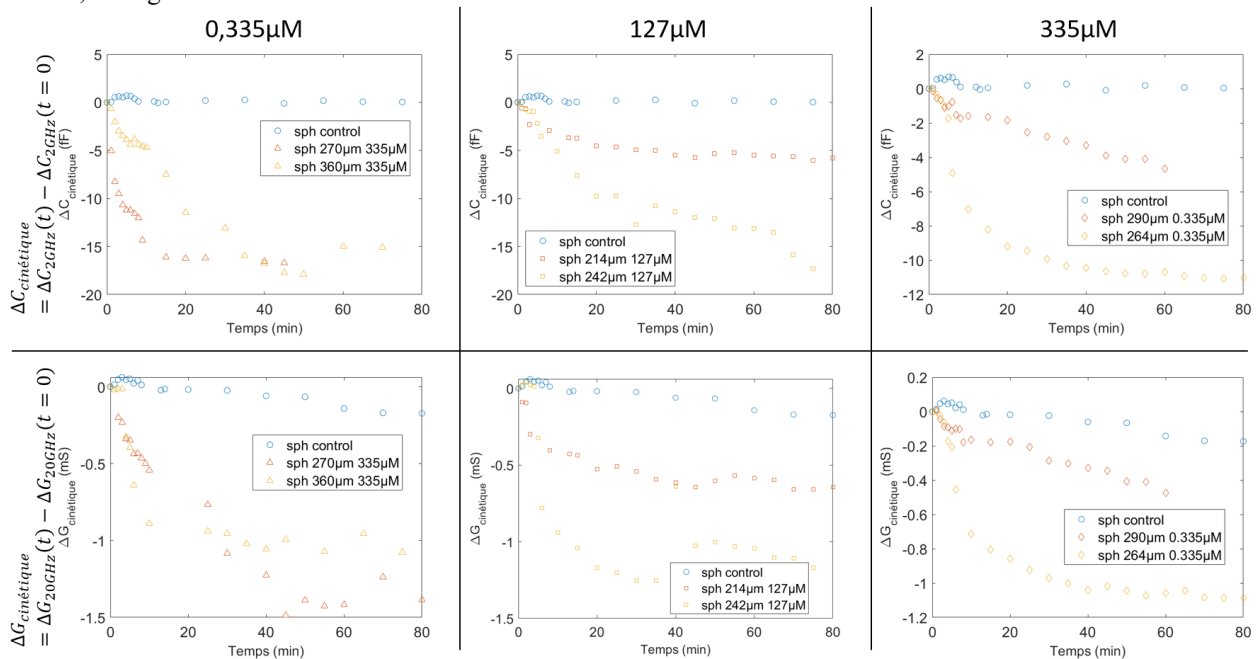


Figure 4. Résultats expérimentaux de $\Delta C_{\text{cinétique}}$ et de $\Delta G_{\text{cinétique}}$ en fonction de la concentration de TSA appliquée. Deux sphéroïdes différents ont été testés pour chaque condition de concentration.

Cependant on remarque qu'il y a deux réponses cinétiques différentes qu'il serait intéressant d'analyser quand le nombre d'échantillons seront plus importants : une au temps très courts et une aux temps longs. Au début de l'expérience les propriétés diélectriques chutent très vite avant d'atteindre une valeur stable plus grande en valeur absolue. Une étude de la pente à l'origine ainsi qu'une valeur à partir de 40min d'expérience en fonction de la concentration permettraient peut-être de dégager une corrélation entre ces paramètres et la concentration du traitement chimique utilisé ici la TSA. Une autre analyse qu'il serait intéressant d'aborder serait de regarder l'influence de la taille des sphéroïdes sur leur modification de propriétés diélectriques en fonction du temps.

Enfin, plusieurs hypothèses restent à étudier pour déterminer l'exacte raison des fortes modifications précoces observées en RF. Dans une étude antérieure, il a été montrée une corrélation entre une augmentation de contraste des paramètres diélectriques en valeur absolue et les premières étapes de l'apoptose à l'échelle de cellules en suspension [13], une telle corrélation reste à prouver à l'échelle de sphéroïdes (en 3D).

4. Conclusions

Le dispositif présenté associé à un protocole de test pour mesures RF en temps réels, montre la possibilité de différenciation précoce de différents traitements chimiques cytotoxiques sur des sphéroïdes HepG2 de 300 μm de diamètre. En effet, le suivi en temps réels peut être réaliser pendant 80 min d'exposition à un traitement chimique et une influence de celui-ci est significativement mesurable à partir des premières minutes. Ce résultat est d'autant plus intéressant que la plupart des études biologiques réalisées sur l'effet de la TSA sur des cellules de la lignée cellulaire HepG2 ne peuvent être mesurées qu'à partir de 30 min d'exposition.

Ces résultats sont donc très prometteurs pour le criblage ultérieur de médicaments grâce à la spectroscopie diélectrique microondes sur sphéroïdes de façon non-invasive, non destructive et sans marquage préalable.

5. Remerciements

Ce travail a été en partie réalisé grâce à la plateforme de micro et nanotechnologie du LAAS-CNRS, membre du réseau RENATECH.

Références

- [1] T. Gerasimenko *et al.*, « Impedance Spectroscopy as a Tool for Monitoring Performance in 3D Models of Epithelial Tissues », *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 474, janv. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2019.00474.
- [2] P. Mehrotra, B. Chatterjee, et S. Sen, « EM-Wave Biosensors: A Review of RF, Microwave, mm-Wave and Optical Sensing », *Sensors*, vol. 19, n° 5, p. 1013, févr. 2019, doi: 10.3390/s19051013.
- [3] H. P. Schwan, « Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions », in *Advances in Biological and Medical Physics*, vol. 5, Elsevier, 1957, p. 147-209. doi: 10.1016/B978-1-4832-3111-2.50008-0.
- [4] A. Tamra, D. Dubuc, M.-P. Rols, et K. Grenier, « Microwave Monitoring of Single Cell Monocytes Subjected to Electroporation », *IEEE Trans. Microw. THEORY Tech.*, p. 8.
- [5] K. Grenier, F. Artis, M. Poupot, J.-J. Fournie, et D. Dubuc, « Label-free discrimination of human lymphoma cell sub-populations with microwave dielectric spectroscopy », in *2018 IEEE/MTT-S International Microwave Symposium - IMS*, Philadelphia, PA: IEEE, juin 2018, p. 907-910. doi: 10.1109/MWSYM.2018.8439472.
- [6] Q.-Q. Shi *et al.*, « Effect of Trichostatin A on Anti HepG2 Liver Carcinoma Cells: Inhibition of HDAC Activity and Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling », *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, n° 18, p. 7849-7855, oct. 2014, doi: 10.7314/APJCP.2014.15.18.7849.
- [7] O. Peytral-Rieu, D. Dubuc, et K. Grenier, « RF sensor dedicated to the dielectric characterization of spheroids between 500MHz and 20GHz », *Int. J. Microw. Wirel. Technol.*, 2023.
- [8] O. Peytral-Rieu, D. Dubuc, et K. Grenier, « Microwave-Based Sensor for the Non-Invasive and Real Time Analysis of 3D Biological Microtissues: Microfluidic Improvement and Sensitivity Study », *IEEE Trans. Microw. THEORY Tech.*, 2023.
- [9] O. Peytral-Rieu, K. Grenier, et D. Dubuc, « Microwave Sensor Dedicated to the Determination of the Dielectric Properties of 3D Biological Models from 500MHz to 20GHz », in *2021 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, Atlanta, GA: IEEE, juin 2021, p. 4.
- [10] M. Sanaei, F. Kavooosi, A. Roustazadeh, et F. Golestan, « Effect of Genistein in Comparison with Trichostatin A on Reactivation of DNMTs Genes in Hepatocellular Carcinoma », *J. Clin. Transl. Hepatol.*, vol. 6, n° 2, p. 1-6, mars 2018, doi: 10.14218/JCTH.2018.00002.
- [11] S. Shin, M. Kim, S.-J. LEE, K.-S. Park, et C. H. Lee, « Trichostatin A Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Enhanced NK Cell-mediated Killing by Regulating Immune-related Genes », *Cancer Genomics Proteomics*, vol. 14, n° 5, sept. 2017, doi: 10.21873/cgp.20045.
- [12] D. Carlisi *et al.*, « Histone deacetylase inhibitors induce in human hepatoma HepG2 cells acetylation of p53 and histones in correlation with apoptotic effects », *Int. J. Oncol.*, janv. 2008, doi: 10.3892/ijo.32.1.177.
- [13] G. Poiroux *et al.*, « Label-free detection of mitochondrial activity with microwave dielectric spectroscopy », *Int. J. Biotechnol. Bioeng.*, 2020.