

Continuous Cell Sorting by High Frequencies Dielectrophoresis

Thomas Provent¹⁺, Rémi Manczak¹, Sofiane Saada², Claire Dalmay¹, Barbara Bessette², Pierre Blondy¹, Gaëlle Begaud², Serge Battu², Marie Odile Jauberteau², Fabrice Lalloué², Arnaud Pothier¹

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

Summary – This paper demonstrates the use of Ultra-High Frequency Dielectrophoresis to sort populations of biological cells. The principal aim of this lab-on-chip cytometer is to sort in a continuous flow different types of cells in suspension based on their dielectrics properties. To achieve this objective, this cytometer combines hydrofluidics and repulsive dielectrophoresis forces. We also show the importance to apply at cells a proper electric field at a specific frequency range to produce different force intensities and associated trajectory deflections. The device efficiency will be illustrated with an example of mesenchymal cells sorting.

Key word: microfluidics, high frequency, dielectrophoresis, biologicals cells

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 souci de réduire les coûts et les temps de préparation préalables.

La Diélectrophorèse Ultra-Haute Fréquence (DEP-UHF) est justement l'une de ses techniques qui utilise des signaux de l'ordre de la dizaine à la centaine de MHz afin d'interagir avec les cellules et pouvoir analyser leurs propriétés biophysiques. Cette méthode ne nécessite aucun contact avec la cellule et se base sur les attributs électriques propres de la cellule comme critère de tri, ce qui ne nécessite aucun prétraitement ni marquage préalable et justifie son caractère « label-free ». D'ordinaire, les fréquences DEP utilisées appartiennent à la gamme du kHz, mais celles-ci se retrouvent limitées à analyser les caractéristiques de la cellule au voisinage de sa membrane, ce qui n'est pas le cas des ondes plus hautes fréquences, typiquement dans la gamme des MHz, qui peuvent pénétrer au sein de la cellule pour en sonder son contenu, permettant ainsi d'analyser ses spécificités intracellulaires [1].

Ce papier vise à développer une nouvelle génération de trieurs électromagnétiques de cellules biologiques comme le 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 détaillé 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 CYTOMETRE

Au sein du cytomètre proposé, les cellules sont mises en suspension dans un milieu liquide circulant dans des canaux microfluidiques (Figure 1). Les cellules sont guidées au centre du canal principal par le flux jusqu'aux électrodes qui génèrent un champ électrique, celles-ci sont ainsi soumises à deux phénomènes différents : au flux hydrodynamique et au champ électrique. Ainsi leur trajectoire résulte de l'effet de la combinaison des forces hydrodynamiques et DEP.

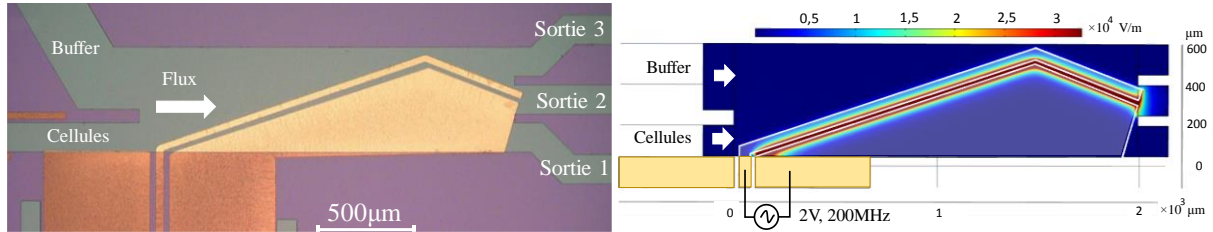


Fig.1. Vue de dessus de la zone de tri du cytomètre et plot du champ électrique associé.

Une force de DEP agit sur la cellule parce que celle-ci se comporte comme une particule polarisée lorsqu'elle 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 [2] est donnée par la formule (1) :

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

Avec ϵ_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) :

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad (2)$$

Avec ϵ_m^* et ϵ_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, ϵ_p^* peut être exprimé par (3) :

$$\epsilon_p^* = \epsilon_{mem}^* \left[\frac{\left(\frac{r}{r-d}\right)^3 + 2\frac{\epsilon_{int}^* - \epsilon_{mem}^*}{\epsilon_{int}^* + 2\epsilon_{mem}^*}}{\left(\frac{r}{r-d}\right)^3 - \frac{\epsilon_{int}^* - \epsilon_{mem}^*}{\epsilon_{int}^* + 2\epsilon_{mem}^*}} \right] \quad (3)$$

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

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

Avec ϵ_x la permittivité absolue, σ_x est la conductivité et ω la fréquence angulaire du signal du champ électrique.

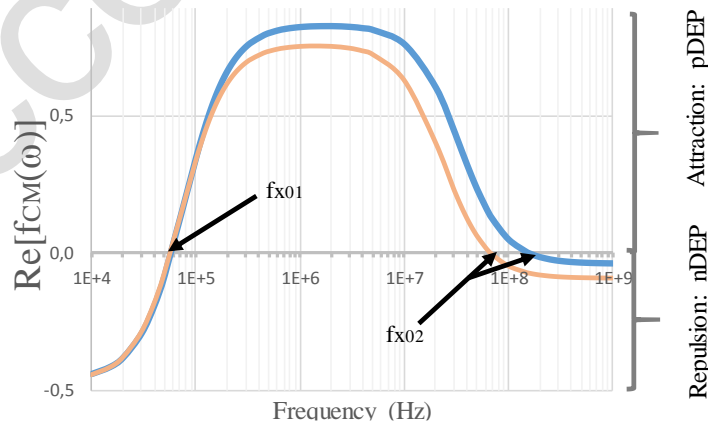


Fig.2. Exemple de tracé de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti pour deux cellules avec des caractéristiques électriques différentes.

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 f_{x01} et f_{x02} 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 $f_{x01} < f < f_{x02}$), 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 $f < f_{x01}$ ou $f > f_{x02}$), 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 f_{x02} .

La Figure 3 illustre l'impact d'un champ électrique généré par deux électrodes fines sur la trajectoire d'une cellule, celle-ci est guidée dans un canal microfluidique par un flux allant de gauche à droite. 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 (b)) ou nDEP voire pDEP faibles, les forces hydrodynamiques dominent et la cellule continuera à traverser le canal avec éventuellement une trajectoire légèrement modifiée [2]. En revanche, lorsque les intensités des forces DEP seront plus importantes, la trajectoire de la cellule sera déviée par le champ électrique : soit repoussée à une bonne distance en configuration nDEP (Figure 3(a)) ou attirée entre les électrodes en configuration pDEP (Figure 3(c)) ce qui mènera la cellule à modifier dans les deux cas sa trajectoire en suivant l'angle présenté par les électrodes vis-à-vis de sa trajectoire initiale.

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.

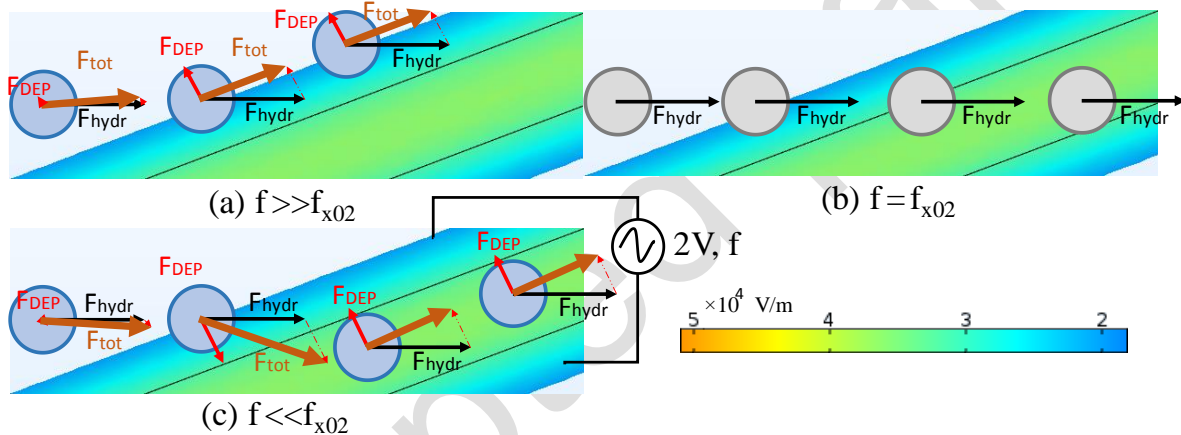


Fig. 3. Influence du champ électrique sur la trajectoire de la cellule vue de dessus.

C'est sur ce principe et sur une géométrie d'électrode particulière similaire à celle utilisée dans [3] qu'a été conçu le cytomètre présenté dans cet article. Comme le montre la Figure 1, le champ généré par deux électrodes de $2\mu\text{m}$ d'épaisseur disposées à 20° de la direction de déplacement des cellules permet d'agir suffisamment sur la trajectoire des cellules d'intérêt. En configuration forte nDEP, celles-ci sont repoussées et guidées jusqu'à la sortie 3 alors que pour de faibles forces elles seront collectées sur la sortie 2.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure 4 présente les différentes trajectoires que peuvent prendre une cellule en traversant le cytomètre suivant les différentes combinaisons de forces hydrodynamiques et DEP auxquelles elle peut être soumise. Nous constatons comme attendu que les cellules suivent le gap entre les électrodes jusqu'à la sortie 3 (Figure 1) en cas de forte répulsion (Figure 3 (a)). En cas d'une faible (Figure 3 (b)) ou très faible (Figure 3 (c)) interaction entre le champ et la cellule, nous observons peu, voir pas de déviation de la cellule dans le canal entraînant la cellule dans la sortie 1 ou 2 (Figure 1). Dans le cas d'une forte interaction pDEP (Figure 3 (d)), on pourrait s'attendre à ce que les cellules suivent le gap sur tout le long jusqu'à la sortie centrale, mais elles se retrouvent fortement attirées et même piégées par le champ ce qui peut entraver le bon fonctionnement du cytomètre à cause de la formation d'agglomérats de cellules.

La Figure 5 montre, dans le cas d'une densité de cellules plus importante, l'influence de la fréquence du signal (f_{DEP}) appliquée au cytomètre, sur l'efficacité du tri cellulaire résultant. En effet, l'hétérogénéité naturelle présente au sein d'une population cellulaire entraîne une forme de variabilité des caractéristiques biologiques qui se traduit par des différences de propriétés diélectriques et donc également de f_{x02} . Comme on peut s'en rendre compte ici, pour le cas de cellules mésenchymateuses, cette dispersion des valeurs de f_{x02} peut être mise à profit pour trier les

cellules aux propriétés différentes en ajustant le signal DEP entre 90 et 150 MHz. 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 (Figure 1), tandis que celles dont f_{x02} se situent proche de f_{DEP} ne sont pratiquement pas déviées et sont collectées à la sortie 2 (Figure 1). Pour des fréquences inférieures à 90MHz on observe que de nombreuses cellules ont un comportement pDEP et se retrouvent immobilisées, piégées par le champ. Une configuration défavorable à éviter car elle aboutit à la formation d'agglomérats de cellules perturbant le bon fonctionnement du cytomètre.

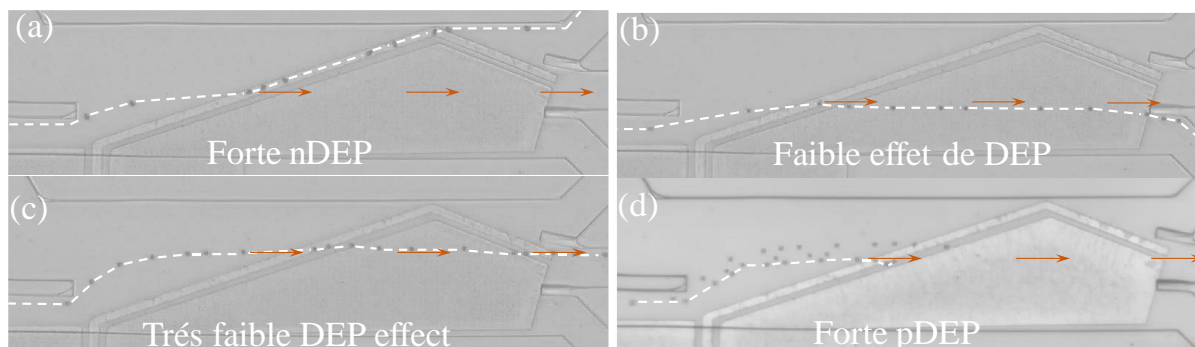


Fig. 4. Superposition d'images montrant la trajectoire de la cellule sous l'influence du champ E. Les flèches orange présentent la trajectoire initiale en l'absence de champ électrique.

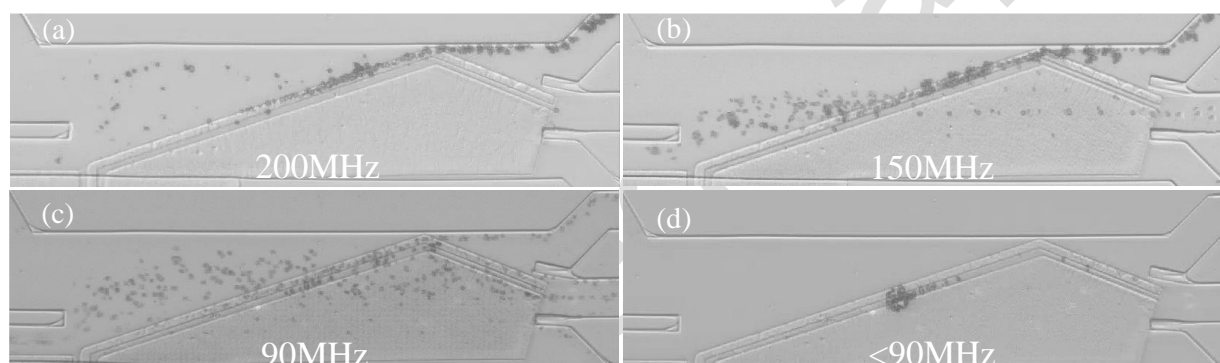


Fig. 5. Influence de la fréquence de DEP sur les sous populations de MSC.

On peut ainsi s'apercevoir qu'il n'est pas intéressant de travailler à des fréquences trop inférieures à f_{x02} afin de limiter les phénomènes de piégeage des cellules. On pourrait aussi éventuellement jouer sur la puissance du signal et la vitesse du flux afin de limiter ces problématiques. On voit également qu'un équilibre est à trouver pour choisir judicieusement la fréquence de tri utilisée.

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. D'autres expériences sont actuellement en cours afin de démontrer sa capacité à trier différents types cellulaires, à partir d'un mélange de cellules, avec une validation par microscopie à fluorescence.

REFERENCES

- [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] L.WU *et al.* "Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells" Biofluidics 6, 0141113, 2012.
- [3] K. Khoshmanesh et al "Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems" BIOS Vol 26, pp 1800-1814, 2011.
- [4] H.S. Moon et al. "Continuous microfluidic airborne bacteria separation using dielectrophoresis" TRANSDUCERS 2009, pp 2038-2041.