

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

ANNEE 2009

N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS

CHAMPAGNE-ARDENNE

MENTION : INGENIERIE DE LA SANTE

Spécialité : Biophysique

Soutenue publiquement le 05 Novembre 2009

par

Florence DRAUX

Née le 8 août 1983 à Libramont-Chevigny (BELGIQUE)

**ANALYSE DE LA CELLULE TUMORALE ET DE SON INTERACTION
AVEC UN AGENT ANTICANCEREUX : APPROCHE BIOPHOTONIQUE PAR
MICROSPECTROSCOPIES RAMAN ET INFRAROUGE**

Jury

Rapporteurs: Pr. Igor CHOURPA (Université de Tours)
Pr. Erik GOORMAGHTIGH (Université Libre de Bruxelles)

Examineurs: Pr. Michel MANFAIT (Université Reims Champagne-Ardenne)
Dr. Josep SULE-SUSO (Staffordshire Oncology Centre, UK)

Directeurs de thèse: Pr. Pierre JEANNESSON (Université Reims Champagne-Ardenne)
Dr. Ganesh D. SOCKALINGUM (Université Reims Champagne-Ardenne)

*"Never give in, never, never, never, never, in nothing great or small, large or petty,
never give in except to convictions of honour and good sense..."*

Sir W. Churchill, 1941

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Pr. Michel Manfait,

Je vous remercie très sincèrement pour m'avoir accueillie au sein de votre unité, tout d'abord pour mon stage d'ingénieur, puis pour mon DEA et enfin pour ces trois années de thèse. Votre soutien et votre compréhension ont été des atouts inestimables. Je voudrais également vous remercier pour m'avoir donné l'occasion de présenter mes travaux dans des congrès internationaux. Soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

A Monsieur le Pr. Igor Chourpa,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de me faire l'honneur de prendre connaissance de mon travail de thèse et d'en être rapporteur. Veuillez accepter mes sincères remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect.

A Monsieur le Pr. Erik Goormaghtigh,

Je n'aurais pas assez de mots pour exprimer toute ma reconnaissance. Mon passage dans votre unité à l'ULB m'a décidée à me lancer dans la recherche et vous avez tout mis en œuvre pour que je puisse suivre cette voie. Vous avez toujours été à mes côtés durant ces cinq années, et jusqu'au bout vous m'aurez soutenue en acceptant de lire mon travail et d'en être rapporteur. Un grand, très grand merci (comme on dit en Belgique).

A Monsieur le Dr. Josep Sulé-Suso,

Je vous adresse mes remerciements les plus respectueux pour avoir accepté d'examiner mon travail et surtout d'en être, en partie, à l'origine. Merci pour vos nombreux déplacements qui m'ont toujours apporté de précieux conseils et ouvert de nouvelles perspectives.

Remerciements

A Monsieur le Pr. Pierre Jeannesson,

Je tiens à vous remercier particulièrement pour toutes les réunions, paisibles et tumultueuses, qui ont jalonné ces cinq années. Ma thèse n'aurait pas le même goût sans nos discussions animées ! Vous m'avez soutenue dans les moments difficiles et ouvert les yeux sur le monde de la recherche en faisant toujours preuve de beaucoup de franchise, ce que j'ai particulièrement apprécié. Merci aussi pour votre humour et vos leçons de contrepétrie, ils me manqueront.

A Monsieur le Dr. Ganesh D. Sockalingum,

Je voudrais vous remercier pour avoir fait preuve de patience durant toute ma thèse, sans jamais douter de l'issue positive. Vous m'avez fait partager votre expérience, à travers de nombreuses discussions constructives souvent agrémentées de précieux conseils. Merci pour tout !

A Olivier,

Merci de m'avoir accueillie dans ton bureau et d'avoir supporté mes coups de gueule sans jamais te plaindre !

A Cyril,

Un grand merci pour ton aide dans le traitement des données. Malgré notre langage différent, on a pu tirer de bons résultats de toutes ces données ! Merci aussi pour ton écoute et ton soutien qui m'ont beaucoup aidée. Au fait, c'est quand tu veux pour des tuyaux soldes (Kookai) ou un avis médical !!!

A Abdel,

Je tiens particulièrement à te remercier d'avoir accepté de t'occuper de moi alors que rien ne t'y obligeait. Tu m'as soutenue et apporté tes lumières dans des moments de doute. Je n'oublierai jamais ce que tu as fait pour moi.

A Aurélie Trussardi et Hamid Morjani,

Merci pour votre aide et vos précieux conseils.

Remerciements

A Ali,

Ali, il me faudrait un livre entier pour t'écrire tous mes remerciements. Je vais donc en résumer l'essentiel, mais c'est sûr, je vais en oublier ! Tu m'as énormément apporté au niveau professionnel ; tu m'as transmis ton savoir et fait partager ton expérience, tu as répondu à toutes mes questions, tu m'as aidée à sortir des impasses, bref je te dois énormément. Mais surtout, je voudrais te remercier pour l'amitié sans faille qu'il y a entre nous. Ne change pas, tu seras un "Grand" de ce monde, j'en suis sûre.

A Manou,

Ces années de travail, pas toujours évidentes à surmonter, m'ont apportées une véritable amie, ayant une rare qualité, l'écoute !!! Merci pour tout Manou, pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton humour. ON Y EST ARRIVEE !!!

Merci aussi pour ces virées Kookai, ces nombreuses soirées avec Thomas et Maëlle, et pour m'avoir fait partager ton goût du champagne !!!

A mes parents et Gilles,

Promis je m'arrête là, les galères devraient se calmer de mon côté ! Un grand merci de m'avoir permis d'en arriver là. Comment vous remercier pour tout cela...

A Gaël,

Merci pour ton soutien sans faille, et bien plus encore...

A tous les étudiants que j'ai côtoyé et avec qui j'ai passé des moments inoubliables au labo ou en dehors. Merci Nadia, Franky, Sana, Cric, Mehdi, Fred, Aurore, ...

A toute l'équipe MÉDIAN, et particulièrement Karine pour ton amitié, ton aide, ton écoute et tout le reste. Merci aux filles du café qui se reconnaîtront !

A tous les autres ...

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX.....	4
AVANT-PROPOS.....	5
I. INTRODUCTION.....	8
I.1. CANCER DU POUMON	9
I.1.1. <i>Incidence des cancers : place du cancer du poumon</i>	9
I.1.2. <i>Principaux facteurs de risque de développer un cancer du poumon</i>	10
I.1.3. <i>Les différents types de cancer du poumon</i>	11
I.1.4. <i>Principaux agents anticancéreux utilisés dans le traitement du CBNPC.</i>	13
I.1.5. <i>Cancer du poumon et chimiothérapie : état de l'art</i>	17
I.1.6. <i>Choix du modèle expérimental pour l'étude de l'interaction cellule /</i> <i>médicament</i>	19
I.2. LA BIOPHOTONIQUE	22
I.2.1. <i>Principe de la spectroscopie vibrationnelle</i>	22
I.2.2. <i>Les spectroscopies vibrationnelles, de la population cellulaire à la cellule</i> <i>isolée</i>	30
I.2.3. <i>Applications des spectroscopies vibrationnelles à l'étude du cancer du</i> <i>poumon</i>	32

II.	APPROCHES METHODOLOGIQUES POUR L'ANALYSE CELLULAIRE	35
II.1.	SPECTROMETRIE INFRAROUGE AVEC UNE SOURCE CONVENTIONNELLE.....	36
II.1.1.	<i>Description du spectromètre IR-TF à haut débit</i>	36
II.1.2.	<i>Avantages et inconvénients de cette technique</i>	38
II.2.	MICROSPECTROMETRIE INFRAROUGE AVEC LA SOURCE SYNCHROTRON SOLEIL	
	38	
II.2.1.	<i>Qu'est-ce que SOLEIL ?</i>	39
II.2.2.	<i>Qu'est-ce qu'une source synchrotron ?</i>	39
II.2.3.	<i>Principe de fonctionnement d'une source synchrotron</i>	40
II.2.4.	<i>La ligne SMIS</i>	43
II.2.5.	<i>Avantages et inconvénients de cette technique</i>	45
II.3.	LA MICROSPECTROMETRIE RAMAN.....	46
II.3.1.	<i>Description du microspectromètre Raman</i>	46
II.3.2.	<i>Avantages et limites de la spectroscopie Raman</i>	49
II.4.	MODELE CELLULAIRE UTILISE ET SES METHODES D'ETUDE.....	50
II.4.1.	<i>Lignée cellulaire</i>	50
II.4.2.	<i>Conditions de culture</i>	51
II.4.3.	<i>Préparation de la gemcitabine</i>	52
II.4.4.	<i>Analyse morphologique</i>	52
II.4.5.	<i>Test au BrdU</i>	53
II.4.6.	<i>Extractions cellulaires d'ADN, ARN et protéines</i>	53
II.5.	ANALYSE DES DONNEES SPECTRALES RAMAN	55
II.5.1.	<i>Prétraitements des données spectrales Raman</i>	56
II.5.2.	<i>Analyse par classification hiérarchique</i>	61
II.5.3.	<i>Analyse par classification Kmeans</i>	63
II.5.4.	<i>Détermination de zones discriminantes</i>	65
II.5.5.	<i>Régression linéaire des spectres de références sur les données acquises</i> 66	
II.6.	ANALYSE DES DONNEES SPECTRALES INFRAROUGE	68
II.6.1.	<i>Prétraitements des données spectrales infrarouge</i>	68
II.6.2.	<i>Détermination de zones discriminantes</i>	70
II.6.3.	<i>Analyse par classification hiérarchique</i>	70

III.	RESULTATS ET DISCUSSION	71
III.1.	IMAGERIE SPECTRALE DE LA CELLULE VIVANTE ISOLEE PAR MICROSPECTROSCOPIE RAMAN	72
III.1.1.	<i>Préambule</i>	72
III.1.2.	<i>Draux et al. Analyst 2009</i>	76
III.2.	IMAGERIE SPECTRALE RAMAN DE LA CELLULE ISOLEE : IMPACT DE DIFFERENTES METHODES DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON.....	94
III.2.1.	<i>Préambule</i>	94
III.2.2.	<i>Article en cours de rédaction</i>	98
III.3.	APPROCHE DE L'INTERACTION CELLULE/MEDICAMENT PAR SPECTROSCOPIES INFRAROUGE ET RAMAN	118
III.3.1.	<i>Préambule</i>	118
III.3.2.	<i>Article accepté dans Analytical Bioanalytical Chemistry</i>	123
III.3.3.	<i>Article en préparation</i>	140
IV.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	156
V.	BIBLIOGRAPHIE.....	160
VI.	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	176
VII.	ANNEXE.....	180

LISTE DES ABREVIATIONS

- ACP : analyse en composantes principales
- ADN : acide désoxyriboNucléique
- ANOVA : analysis of variance
- Ara-C : cytosine arabinoside
- ARN : acide ribonucléique
- ATR : réflexion totale atténuée
- BEH : bulletin épidémiologique hebdomadaire
- BrdU : bromodeoxyuridine (5-bromo-2-deoxyuridine)
- BSS : blind source separation
- CaF₂ : calcium fluoride
- CCD : charged-couple device
- CBNPC : cancer du poumon non-à-petites cellules
- dCTP : désoxycytidine triphosphate
- dFdC : gemcitabine (2'2'-difluorodésoxycytidine)
- dFdCTP : difluorodésoxycytidine triphosphate
- dFdU : difluorodésoxyuridine
- dFdUMP : difluorodésoxyuridine monophosphate
- ECACC : european collection of cell cultures
- EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
- 5FdUMP : 5- fluoro désoxy uridine monophosphate
- 5FdUTP : 5- fluoro désoxy uridine triphosphate
- 5FUTP : 5- fluoro uridine triphosphate
- EGFR : epidermal growth factor receptor
- FT-IR : Fourier transform infrared
- HBSS : Hanks buffered saline solution
- HCA : hierarchical cluster analysis
- hENT1 : human equilibrative nucleoside transporter 1

Liste des abréviations

- HTS-XT : high-throughput-screening extension
- ICA : independent component analysis
- InVS : institut de veille sanitaire
- IR : infra-rouge
- MCT : mercury cadmium telluride
- MEM : modified Eagle's medium
- NCLS : non-negatively constrained least-squares
- PAF : paraformaldéhyde
- PBS : phosphate buffer solution
- Phe : phénylalanine
- QSP : quantité suffisante pour
- SERS : surface enhanced Raman spectroscopy
- SERRS : resonance surface Enhanced Raman spectroscopy
- SIRM : synchrotron FT-IR microscopy
- SMIS : spectroscopie et microscopie infrarouge avec synchrotron
- SNV : standard normal variate
- SOLEIL : source optimisée de lumière d'énergie intermédiaire du LURE
- SVF : sérum de veau fœtal
- TS : thymidylate synthétase
- Trp : tryptophane
- Tyr : tyrosine
- ZnSe : zinc selenide

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers les plus répandus dans le monde.	9
Figure 2 : Les différents stades du cancer du poumon non-à-petites cellules.	13
Figure 3 : Représentation schématique de la déoxycytidine.....	20
Figure 4 : Représentation schématique de la molécule de gemcitabine.	21
Figure 5 : Diagramme de Jablonski.	26
Figure 6 : Modes de vibration pour une molécule triatomique XAY coudée.....	28
Figure 7 : Histogramme représentant le nombre de publications spectroscopiques	30
Figure 8 : Photo représentant l'extension HTS-XT	36
Figure 9 : Photos représentant une plaque 96 puits	37
Figure 10 : Schéma simplifié montrant l'émission du rayonnement synchrotron.	39
Figure 11 : Schéma simplifié du principe de fonctionnement de la source synchrotron..	40
Figure 12 : Classification des différentes lignes de lumière.	41
Figure 13 : Lignes de lumière disponibles à SOLEIL	42
Figure 14 : Photo montrant l'anneau de stockage et les différentes lignes de lumière....	43
Figure 15 : Microscope Thermo Nicolet Nicplan.	44
Figure 16: Description du microspectromètre Raman.	46
Figure 17 : Microscope optique de type Olympus.....	49
Figure 18 : La lignée cellulaire Calu-1 en microscopie à contraste de phase.....	51
Figure 19 : Interface graphique de pré-traitements.....	56
Figure 20 : Exemple d'une acquisition du courant noir I_{cn}	57
Figure 21 : Exemple d'une acquisition de la réponse du détecteur I_d	57
Figure 22 : Exemple d'un dendrogramme obtenu après HCA.	62
Figure 23 : Interface graphique de pré-traitements et de régression linéaire.....	66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Evolution du traitement conventionnel..... 19

AVANT-PROPOS

Les cancers constituent la première cause de mortalité en France (BEH n°35-36, 18 Septembre 2007), ce qui est en grande partie dû à un diagnostic trop tardif et un taux élevé de rechute, en particulier dans le cas du cancer du poumon non-à-petites cellules. Dans ce contexte, un diagnostic précoce et l'étude des phases initiales du traitement chimiothérapeutique mis en œuvre sont des étapes primordiales. Elles permettraient, en effet, de déterminer si le traitement administré au patient est efficace ou même de détecter la présence ou non de mécanismes de résistance. Malgré l'apparition prometteuse de nouvelles molécules ciblant spécifiquement certaines protéines ou voies de signalisation, la majorité des cancers sont toujours traités par des médicaments cytotoxiques conventionnels. Ces agents anticancéreux sont utilisés avec un facteur de succès variable en fonction du type de cancer et de l'état d'évolution de la maladie, mais également en fonction de la résistance des cellules cancéreuses au traitement. L'acquisition d'un phénotype de résistance reste d'ailleurs un obstacle majeur dans la réussite de la chimiothérapie.

A l'heure actuelle, le diagnostic du cancer, souvent associé à un délai de plusieurs jours, dépend énormément de l'histopathologie qui nécessite une biopsie préparée et examinée par l'anatomopathologiste. De plus, l'histopathologie est subjective, car elle repose en grande partie sur une information morphologique, ce qui conduit à des désaccords entre cliniciens. Ainsi, la technique de diagnostic idéale serait non invasive, objective et fournirait un résultat rapide à "haut débit" et sans préparation préalable du tissu.

Les spectroscopies Raman et infrarouge présentent certains avantages potentiels pour l'aide à l'histopathologie dans l'identification et la classification de changements biochimiques subtils liés à la carcinogénèse. De nombreuses études viennent de démontrer le potentiel de ces approches biophotoniques pour fournir un résultat moléculaire non destructif, rapide et à haute résolution, sans nécessité de coloration (Kendall, 2009). L'histologie spectrale combinée à des techniques de chimiométrie peut

donc offrir une aide précieuse dans l'établissement d'un diagnostic plus objectif que celui habituellement obtenu par les techniques classiques d'histopathologie.

L'accès aux effets précoces d'un médicament anticancéreux rendrait possible l'adaptation du traitement de chaque patient, ou de mieux comprendre le mécanisme d'action du médicament utilisé. Le développement d'une méthode biophotonique permettrait, à terme, de disposer d'un nouvel outil clinique d'aide à la décision thérapeutique avec un bénéfice direct pour le patient. Ce domaine ne faisant l'objet que de peu de travaux, en particulier à l'échelle de la cellule isolée (Ling, 2002 ; Owen, 2006), il est nécessaire de valider et d'optimiser ces techniques sur cellules vivantes ou fixées, notamment dans le cadre de l'étude d'un médicament.

C'est dans ce cadre que se situe notre travail portant sur l'étude de phénomènes précoces du traitement chimiothérapeutique sur une lignée cellulaire de cancer de poumon non-à-petites cellules. L'approche de l'interaction cellule/faibles doses de médicament a été menée au moyen de spectroscopies vibrationnelles couplées à des analyses biologiques. Nous avons également évalué l'impact de différentes méthodes de préservation d'échantillon sur son profil spectral.

Dans l'introduction, nous décrirons les différentes formes de cancer de poumon, ainsi que notre modèle d'étude, à savoir la lignée cellulaire et l'agent thérapeutique utilisés. Après un bref rappel du principe des spectroscopies vibrationnelles, un état de l'art portant sur l'évolution de ces techniques physiques sera ensuite présenté, en partant de l'étude de populations cellulaires fixées jusqu'aux études à l'échelle de la cellule vivante isolée.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de mettre au point la technique de spectroscopie Raman pour une étude à l'échelle de la cellule vivante isolée. Une fois les paramètres d'acquisition fixés, les spectres de régions subcellulaires ont été enregistrés et discriminés. Nous avons également acquis une image spectrale de cellule vivante isolée. Ensuite, les effets de différents modes de préparation d'échantillon sur le profil spectral Raman de cellules ont été étudiés, et sur la distribution de macromolécules cellulaires.

Avant-propos

Dans le domaine de la pharmacologie spectrale, nous avons détecté les effets de faibles doses d'agent anticancéreux sur des cellules de cancer de poumon. Cette étude a été menée à plusieurs niveaux : à l'échelle de la population cellulaire par spectroscopie infrarouge à haut débit, à l'échelle de la cellule isolée grâce à une source synchrotron, et à l'échelle de la cellule vivante isolée par microspectroscopie Raman.

Dans la dernière partie de ce mémoire, nous récapitulerons les résultats obtenus lors de ce doctorat et aborderons les différentes perspectives qu'ouvre ce travail aux niveaux cellulaire, spectroscopique, et clinique.

I. INTRODUCTION

I.1. CANCER DU POUMON

I.1.1. Incidence des cancers : place du cancer du poumon

Environ 10 millions de personnes se voient diagnostiquer un cancer chaque année, et plus de 6 millions d'entre elles décèdent chaque année des suites de cette maladie; ce qui représente plus de 22 millions de personnes actuellement atteintes d'un cancer dans le monde.

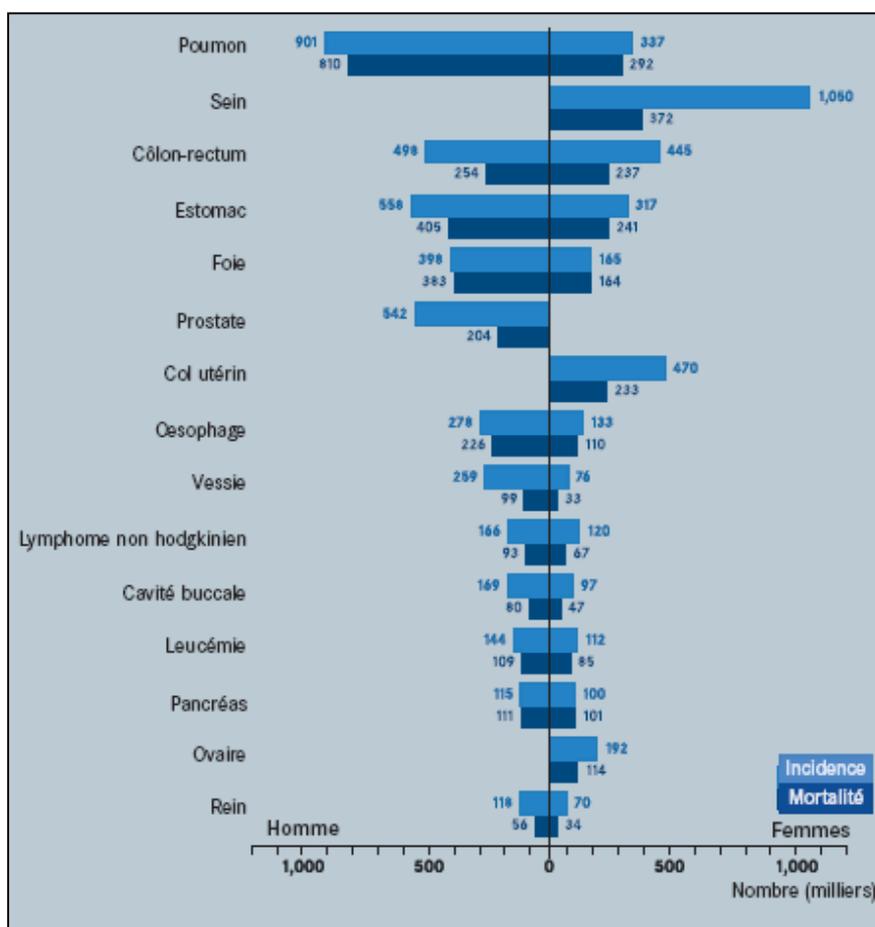


Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers les plus répandus dans le monde
(<http://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/wcrf-1.pdf>, [Consulté 09/09]).

En 2007, pour la première fois en France, le cancer est la première cause de mortalité, d'après le Bulletin épidémiologique (BEH n°35-36, 18 Septembre 2007) de l'InVS. La

mortalité par cancer devance les maladies cardiovasculaires et les accidents, et est, à l'échelle mondiale, supérieure à celle du sida, de la tuberculose et du paludisme réunis (http://sante-medecine.commentcamarche.net/contents/tabac/01_le-tabac-des-statistiques-alarmanantes-qu-il-faut-connaître.php3, [Consulté 09/09]).

En 2000, en France, le cancer du poumon était, par sa fréquence, au 2ème rang chez l'homme et au 4ème rang chez la femme. Il est à l'origine de 7,6 % des décès masculins et 1,6 % des décès féminins, toutes causes confondues, et est au premier rang pour la mortalité par cancer avec plus de 27 000 décès en 2000. Le cancer du poumon devient un objet de préoccupation de plus en plus présent pour le milieu médical et le ministère de la santé. De nombreuses études sont donc en cours, notamment pour réaliser des projections des taux de mortalité et des nombres de décès pour la France, en s'appuyant sur les décès observés sur la période 1975-99. Les résultats d'une telle étude ont permis de prévoir que le taux de mortalité du cancer du poumon pour la France, devrait passer de 78,1 pour 100 000 en 2000-04 à 75,7 pour 100 000 en 2010-14 chez l'homme, soit une diminution de 3 % et de 14,1 pour 100 000 à 22,5 pour 100 000 chez la femme pour les mêmes périodes, soit un accroissement de 60 % (<http://www.invs.sante.fr.pdf>, [Consulté 09/09]).

1.1.2. Principaux facteurs de risque de développer un cancer du poumon

Le tabagisme, en particulier la fumée de cigarettes, est de loin la cause principale du cancer du poumon. Aux États-Unis, on estime que la fumée du tabac est responsable de 87% des cas de cancer du poumon (90% des hommes, 85% des femmes). Parmi les hommes qui fument, le risque cumulé le long de toute la vie de développer un cancer du poumon est de 17,2% et de 11,6% pour les femmes. Ce risque est significativement plus bas chez les non-fumeurs : 1,3% chez les hommes et 1,4% chez les femmes. La fumée de tabac contient plus de 60 cancérigènes connus, comprenant les radioisotopes de la chaîne de désintégration du radon, la nitrosamine et le benzopyrène. En outre, il semble que la nicotine diminue la réponse immunologique aux développements malins dans les tissus exposés.

Le tabagisme passif est une cause de cancer du poumon non négligeable chez les non-fumeurs. Des études faites aux États-Unis, Europe, Grande-Bretagne, Australie et France ont démontré de façon cohérente un accroissement significatif du risque relatif parmi les individus exposés passivement à la fumée. Une étude récente sur le courant de fumée secondaire (échappé directement de la cigarette par le bout incandescent) suggère qu'il est plus toxique que la fumée inhalée directement.

L'exposition au radon est la deuxième cause de cancer du poumon, après le tabagisme. Elle serait responsable de 13 % des décès par cancer du poumon, soit environ 3 350 chaque année en France. Le radon est un gaz incolore et inodore, engendré par la radioactivité du radium, qui provient lui-même de celle de l'uranium, que l'on trouve dans la croûte terrestre. La concentration en radon varie selon les lieux et la composition de leur sol et de leur sous-sol. Par exemple, dans des régions comme les Cornouailles (en Grande-Bretagne) ou la Bretagne (en France) dont le sous-sol est en granit, le radon est un problème majeur.

D'autres rayonnements ionisants (rayons X et gamma en particulier) peuvent induire des cancers dans la plupart des organes.

L'amiante peut provoquer une variété de maladies du poumon, dont le cancer. Il existe une synergie entre le tabagisme et l'amiante pour la survenue du cancer du poumon. En France, l'amiante est à l'origine de 2 000 à 3 000 cancers du poumon chaque année.

Certaines substances, dont les composants sont inhalés, peuvent également conduire à des cancers du poumon, en particulier les composés de chrome, de nickel, d'arsenic, et les oxydes de fer.

1.1.3. Les différents types de cancer du poumon

Il convient de distinguer les cancers primitifs, qui sont apparus en premier dans les poumons, des cancers secondaires, qui ont évolué dans une autre partie du corps et ont ensuite gagné les poumons. Ces derniers ne seront pas abordés. Parmi les cancers

Introduction

primitifs, l'examen des cellules cancéreuses (examen anatomopathologique sur biopsies) permet de distinguer :

- Les cancers épidermoïdes (35-40 %) ;
- Les adénocarcinomes (25-35 %) ;
- Les carcinomes à grandes cellules (10-15 %) ;
- Les carcinomes à petites cellules (20-25 %).

Ces quatre catégories représentent près de 95 % des cancers du poumon.

Les trois premières sont regroupées en "cancer bronchique non-à-petites cellules" (CBNPC) qui est une tumeur maligne primitive développée à partir de l'épithélium bronchique et qui constitue la majorité des cancers broncho-pulmonaires (75-80%). L'évolution de ces cancers peut être divisée en quatre étapes (figure 2):

- Le premier stade est un cancer très localisé, qui n'a pas envahi les ganglions lymphatiques ;
- Au second stade, le cancer s'est étendu aux ganglions lymphatiques de voisinage ;
- Pour le troisième stade, le cancer s'est étendu à des organes voisins de sa localisation initiale (paroi thoracique,...) ;
- Le quatrième stade représente une extension du cancer à un organe de localisation éloignée (métastase).

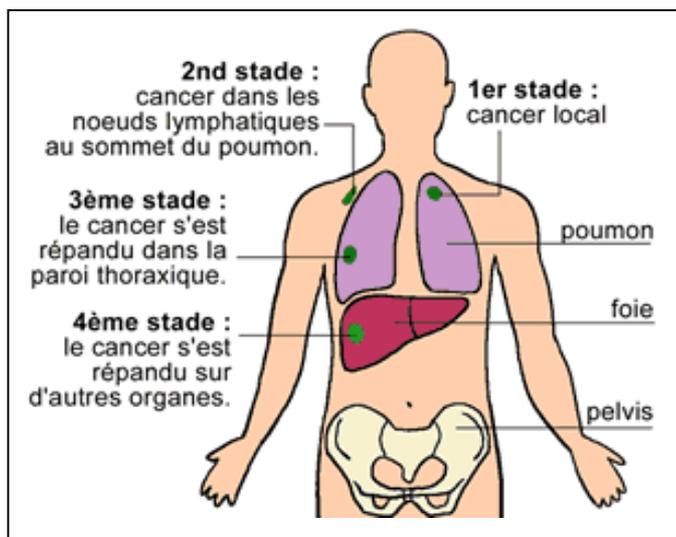


Figure 2 : Les différents stades du cancer du poumon non-à-petites cellules (http://www.doctissimo.fr/html/sante/principalespatho/sa_121_cancer_trait.htm, [Consulté 09/09]).

Le CBNPC se détecte et se traite plus facilement que le cancer à petites cellules, mais reste, malgré les avancées récentes dans les méthodes de diagnostic et de traitement, une pathologie de très mauvais pronostic. En effet, le diagnostic tardif effectué chez de nombreux patients et le taux élevé de rechute chez ceux diagnostiqués au stade précoce contribuent à la forte mortalité provoquée par ce cancer. Concernant son traitement, lorsque la tumeur est extirpable et le malade opérable, la chirurgie reste le traitement de référence. Pour les patients atteints d'un cancer avancé, la chimiothérapie représente une voie majeure de traitement.

Le cancer à petites cellules évolue, lui, beaucoup plus rapidement et est plus susceptible de s'étendre à d'autres organes.

Plus rares, les tumeurs carcinoïdes et les tumeurs muco-épidermoïdes représentent les 1 à 2 % restants.

1.1.4. Principaux agents anticancéreux utilisés dans le traitement du CBNPC

Les médicaments utilisés en chimiothérapie du CBNPC ont une action cytotoxique liée à leur interaction directe et/ou indirecte sur les structures de la cellule tumorale, telles que

l'ADN et le fuseau mitotique (<http://www.cnhim.org/Dossier%20du%20CNHIM%20-%20PDF/dossiers/DOSSIER%202001%20n%C2%B06.pdf>, [Consulté 09/09]).

1.1.4.1. Les alkylants

Les alkylants sont des dérivés organiques de synthèse possédant un groupement $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl}$. Cette structure commune leur confère un puissant caractère électrophile qui leur permet de former des liaisons covalentes avec l'ADN cellulaire. La plupart des dérivés étant bifonctionnels, ils peuvent former des ponts inter- et intrabrinns, ce qui empêche la transcription et la réplication des régions d'ADN concernées, pour aboutir à l'arrêt de la division cellulaire.

Ils sont répartis en trois sous-catégories:

➤ Moutardes à l'azote

Le cyclophosphamide et l'ifosfamide ne sont pas eux-mêmes réactifs ; ils devront être métabolisés (principalement au niveau hépatique) par différents enzymes en métabolites actifs.

➤ Organoplatines

Les composés commercialisés sont tous des dérivés du platine. L'hydrolyse de leurs groupements "partants" (deux chlores pour le cisplatine et deux fonctions carboxylates pour le carboplatine) aboutit à des dérivés bifonctionnels, les diaquoplatines, qui vont interagir avec les bases puriques de l'ADN, créant des ponts inter- ou intracaténares qui inhibent la réplication et la transcription de l'ADN.

➤ Les autres agents alkylants

Ces médicaments appartiennent à des familles chimiques différentes, dont celle des aziridines dans laquelle on retrouve la mitomycine C, pouvant être administrée dans le traitement du cancer du poumon. Bien que leur mécanisme d'action soit un peu différent de celui des moutardes azotées, ils sont considérés comme des alkylants interagissant directement par liaison chimique nucléophile.

1.1.4.2. Les anticancéreux agissant sur le fuseau mitotique

Ce type de médicament agit sur le fuseau mitotique, et particulièrement la tubuline. Cette protéine cytoplasmique existe sous deux formes : une forme dimérique et une forme polymérisée. Cette dernière joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires, parmi lesquelles la mitose.

➤ Les stabilisants du fuseau : les taxoïdes

Les dérivés des taxanes, tels que le docétaxel et le paclitaxel, stabilisent la forme polymérisée de la tubuline induisant ainsi un effet antimitotique. En effet, la fonctionnalité de la tubuline requiert l'équilibre dynamique existant entre sa forme dimérique et sa forme polymérisée.

➤ Les poisons du fuseau : Alcaloïdes de la pervenche ou Vinca-alcaloïdes

Les dérivés de la vinca, tels que la vinorelbine et la vindésine, inhibent la polymérisation de la tubuline, bloquant ainsi la division cellulaire.

1.1.4.3. Les agents intercalants et inhibiteurs de topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes qui provoquent des coupures provisoires au niveau de l'ADN, permettant de maintenir sa structure en évitant les phénomènes de surtension occasionnés par la réplication et la transcription. Elles peuvent également intervenir dans les phénomènes de réparation. Les inhibiteurs des topoisomérases empêchent donc la religation de l'ADN.

➤ Les anthracyclines

Les anthracyclines, telle que la doxorubicine, aussi appelée l'adriamycine, présentent une structure coplanaire qui leur permet de s'intercaler au sein de la double hélice d'ADN provoquant sa déformation et bloquant la transcription et la réplication. De plus, ces dérivés possèdent une affinité vis-à-vis de sites (différents de ceux des épipodophyllotoxines) sur les topoisomérases II qu'ils vont donc inhiber.

➤ Les épipodophyllotoxines

Ces médicaments, tels que l'étoposide, agissent en tant qu'inhibiteur de la topoisomérase II.

I.1.4.4. Les antimétabolites

Ces médicaments présentent une analogie structurale étroite avec les bases pyrimidiques ou puriques ou l'acide folique leur permettant d'inhiber des systèmes enzymatiques intervenant dans la synthèse des nucléotides. Dans le cas des antiprimidiques et antipuriques, il s'agit d'analogues de bases ou de nucléosides (pour la gemcitabine) qui seront transformés au niveau cellulaire en forme active : les nucléotides.

➤ Les antagonistes pyrimidiques

L'activité cytotoxique du 5-fluorouracile met en jeu trois de ses métabolites. Le 5-fluoro uridine triphosphate (5FUTP) et le 5-fluoro desoxy uridine triphosphate (5FdUTP) sont susceptibles d'être incorporés respectivement dans l'ARN et l'ADN. L'incorporation de l'ARN empêche la traduction de s'effectuer normalement et inhibe la synthèse protéique. L'incorporation dans l'ADN va s'accompagner d'une inhibition des polymérase et donc de la réplication. Le 5-fluoro desoxy uridine monophosphate (5FdUMP) inhibe la Thymidylate Synthétase (TS) entraînant un déficit cellulaire en desoxy thymidine monophosphate, constituant nécessaire à la synthèse de l'ADN.

La gemcitabine (2'2'-difluorodésoxycytidine, dFdC) est incorporée dans l'ADN sous sa forme triphosphorylée qui inhibe la réplication de l'ADN et par conséquent la division cellulaire. D'un point de vue moléculaire, il est supposé que cette incorporation altère la conformation du brin d'ADN en élongation, qui n'est alors plus reconnu comme substrat par l'ADN polymérase. Après insertion de la gemcitabine dans la chaîne polynucléotidique, un nucléotide additionnel s'ajoute au brin en réplication. Ce processus appelé « terminaison de chaîne par masquage » dans lequel la molécule de médicament est masquée par le nucléotide additionnel, protège la gemcitabine des enzymes d'excision lors de la réparation de l'ADN.

1.1.4.5. Protocoles couramment utilisés dans le traitement du CBNPC

Dans le traitement initial du CBNPC, le protocole chimiothérapeutique consiste en la combinaison d'un composé platine avec un deuxième médicament, le plus souvent la gemcitabine. Ainsi, on combine régulièrement le carboplatine et la gemcitabine, le cisplatine et la vinorelbine, ou encore le cisplatine et le paclitaxel.

En cas de récurrence, les médicaments utilisés sont alors le docetaxel ou l'erlotinib. Ce dernier est un agent antinéoplasique, inhibiteur de la tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique humain de type 1 (Epidermal Growth Factor Receptor ; EGFR). Dans des modèles non cliniques, l'inhibition de la phosphotyrosine de l'EGFR résulte en un arrêt de la prolifération et/ou à une mort cellulaire.

1.1.5. Cancer du poumon et chimiothérapie : état de l'art

Les travaux de recherche dans le domaine du cancer du poumon portent essentiellement sur la mise au point ou l'amélioration de l'efficacité des traitements basés sur la chimiothérapie. Par exemple, la réponse cellulaire aux médicaments antitumoraux peut être améliorée en rétablissant dans les cellules cancéreuses de poumon l'expression d'un gène suppresseur de tumeur (Andriani, 2006). D'autres études évaluent la cytotoxicité, l'effet sur la modulation du cycle cellulaire de ces médicaments vis-à-vis de différentes lignées cellulaires (Ewald, 2007 ; Giovannetti, 2007 ; Kirstein, 2007 ; Seol, 2007 ; Veltkamp, 2008), mais également les mécanismes de résistance au traitement (Bergman, 2002). Enfin, un effet synergique peut être induit par l'association de plusieurs anticancéreux, permettant ainsi de renforcer la réponse apoptotique des cellules cancéreuses (Carmichael, 1997 ; Edelman, 2001 ; Gahr, 2007 ; Giovannetti, 2005). La littérature traitant de la gemcitabine et des cellules cancéreuses comporte également beaucoup de revues sur sa pharmacologie cellulaire liée à son utilisation clinique (Giovannetti, 2006 ; Mini, 2006 ; Ueno, 2007).

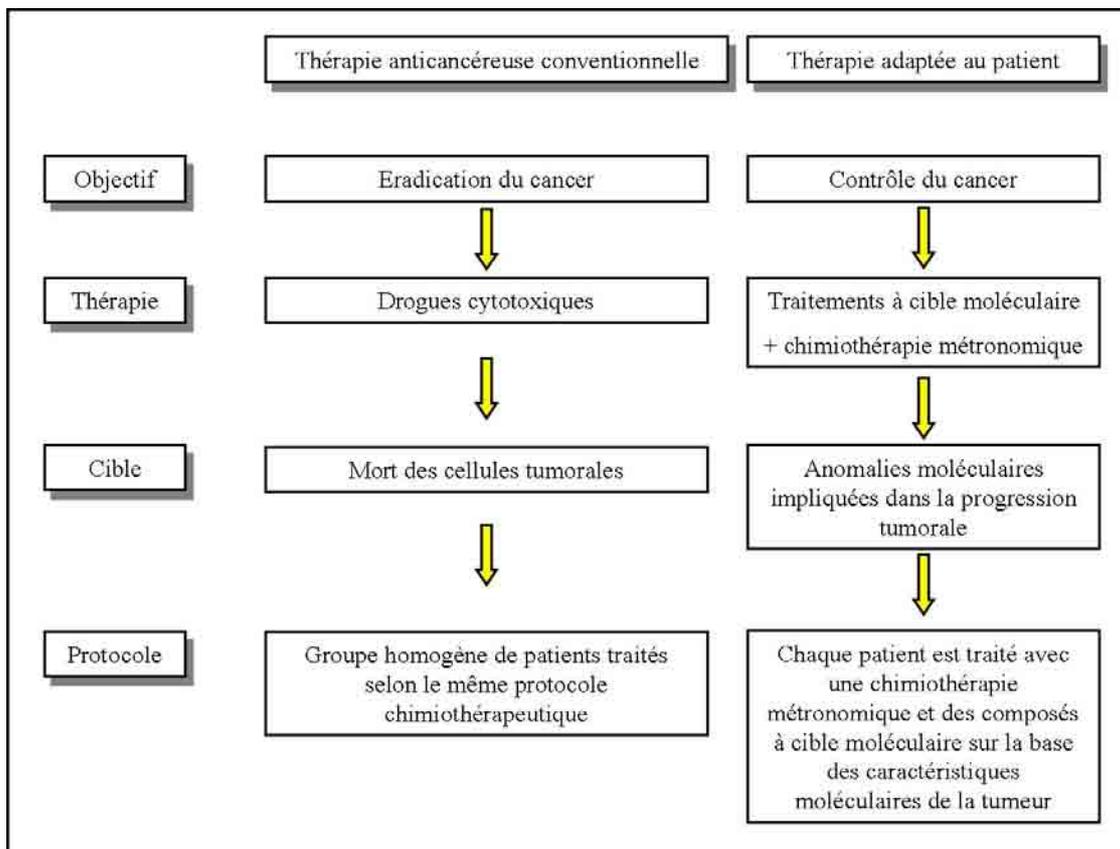
Au cours des 20 dernières années, les progrès dans la compréhension des caractéristiques moléculaires des cellules tumorales ont mis en évidence les limites des protocoles conventionnels de chimiothérapie. En effet, le but de la chimiothérapie, à savoir atteindre la suppression complète de la tumeur, est rarement atteint, et ce pour plusieurs raisons.

Introduction

Premièrement, la majorité des tumeurs solides sont le résultat d'anomalies génétiques multiples et peuvent contenir des sous-populations cellulaires hétérogènes présentant différentes propriétés cinétiques, angiogéniques, invasives et métastatiques. Deuxièmement, après des périodes variables de sensibilité, les cellules tumorales développent une résistance aux agents cytotoxiques. Troisièmement, la chimiothérapie conventionnelle est, en général, plus efficace vis-à-vis de tumeurs primaires que contre des métastases.

Ainsi, une nouvelle stratégie anticancéreuse est en cours de développement pour atteindre un contrôle thérapeutique à long terme, cette approche étant basée sur des traitements moléculaires adaptés pouvant agir sélectivement sur le phénotype malin (Gasparini, 2001).

Le nouveau concept de traitement de cancer consiste donc en une modification de la cible cellulaire (vers les cellules tumorales endothéliales), et un changement dans le protocole et la dose du médicament administrée. Ainsi, le traitement chimiothérapeutique ne vise plus l'éradication complète de la tumeur, mais plutôt sa diminution et le maintien de cette diminution aussi longtemps que possible. Cette nouvelle philosophie thérapeutique, nommée chimiothérapie métronomique, a fait l'objet de tests cliniques, notamment en essai de phases I et II pour certains agents anticancéreux, dont notamment certains administrés dans le traitement du cancer du poumon avec des résultats encourageants : le cyclophosphamide, la doxorubicine, la capécitabine, le thalidomide, le 5'-déoxy-5-fluoridine, l'étoposide, le paclitaxel, le méthotrexate et la prednisone (Scharovsky, 2009). Le tableau I présente l'évolution du protocole thérapeutique anticancéreux (Gasparini, 2001).

Tableau I : Evolution du traitement conventionnel vers la chimiothérapie métronomique.

1.1.6. Choix du modèle expérimental pour l'étude de l'interaction cellule / médicament

La lignée cellulaire Calu-1 utilisée dans cette étude est un modèle représentatif de cellules de cancer de poumon humain non-à-petites cellules (Edelman, 2001). Elle provient d'un homme Caucasien âgé de 47 ans, ayant développé un carcinome (cellule tumorale épithéliale) au niveau du poumon (grade III). Les patients à un stade tardif de ce type de cancer sont essentiellement traités par chimiothérapie et notamment par la gemcitabine (2'2'-difluorodésoxycytidine, dFdC) en combinaison avec un composé platine.

La gemcitabine est un analogue de la cytosine arabinoside (Ara-C) de laquelle elle diffère structurellement par ses substituants fluor en position 2' du cycle furanose (figure 3). Cette molécule, analogue de la cytidine le plus important depuis l'Ara-C, présente des

propriétés pharmacologiques distinctives et une activité antitumorale à large spectre. Au départ étudié comme agent antiviral, il a ensuite été développé en tant que médicament anticancéreux sur base de son impressionnante activité antitumorale *in vitro* et *in vivo*.

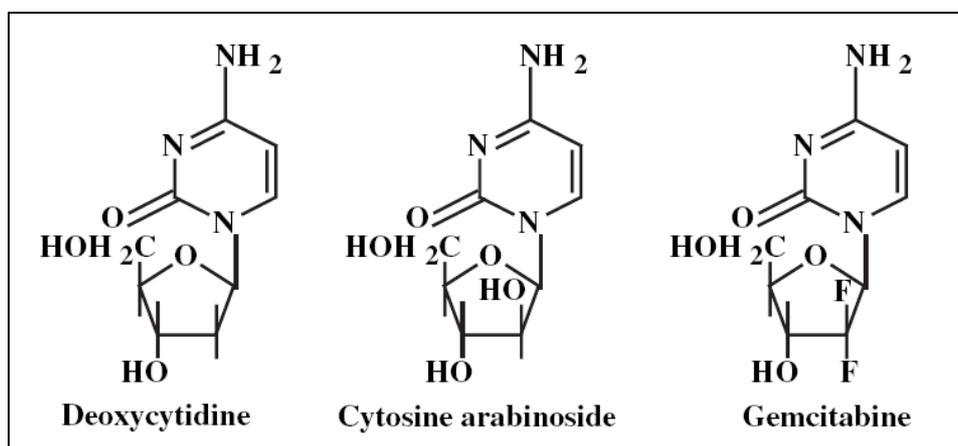


Figure 3 : Représentation schématique de la déoxycytidine, de l'Ara-C et de la gemcitabine (Mini, 2006).

De la même manière que pour l'Ara-C et d'autres analogues de nucléosides, le transport de la gemcitabine à travers la membrane cellulaire se fait grâce à un transporteur de nucléoside (hENT-1). La gemcitabine est activée par phosphorylation en ses métabolites mono-, di- et triphosphatés (figure 4). Cependant, 90% de la gemcitabine (dFdC) est désactivée par une déaminase en difluorodésoxyuridine (dFdU). De plus, une autre enzyme désactive ensuite la forme monophosphatée de la gemcitabine en difluorodésoxyuridine monophosphate (dFdUMP), puis en dFdU qui est finalement excrétée de la cellule (Mini, 2006).

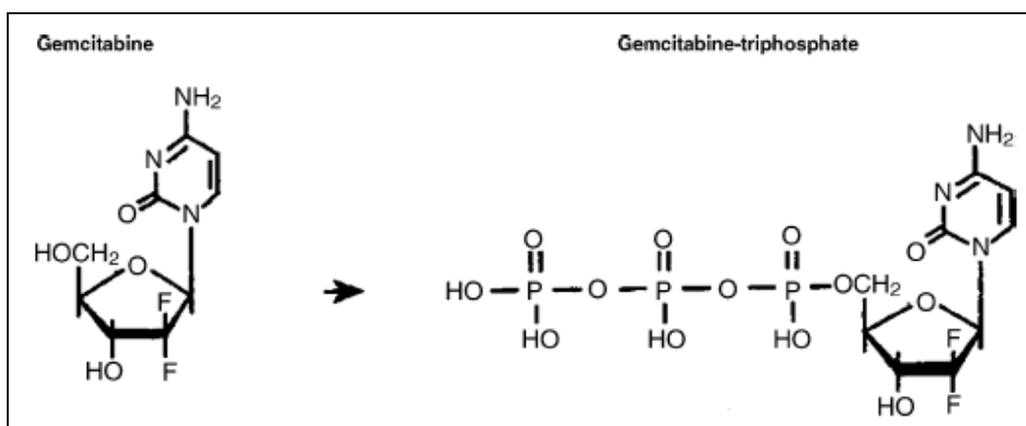


Figure 4 : Représentation schématique de la molécule de gemcitabine sous la forme de pro-drogue et de métabolite triphosphorylé (Sulé-Suso, 2005).

Tout comme l'Ara-C, la gemcitabine agit principalement en inhibant la synthèse d'ADN. Ses effets inhibiteurs ne sont cependant pas limités à la phase S du cycle cellulaire, car elle est également efficace sur cellules confluentes ou en phase exponentielle de croissance. Il existe des différences importantes entre l'Ara-C et la gemcitabine au niveau du mode d'incorporation dans l'ADN, de l'existence de sites d'actions supplémentaires, des propriétés cinétiques d'inhibition de croissance cellulaire et du spectre d'activité.

L'activité cytotoxique de la gemcitabine est le résultat de différentes actions sur la synthèse d'ADN : la difluorodésoxycytidine triphosphate (dFdCTP) entre en compétition avec la désoxycytidine triphosphate (dCTP) en tant que faible inhibiteur de l'ADN polymérase. L'incorporation de la dFdCTP dans l'ADN suivie de l'ajout d'un nucléotide supplémentaire, conduit à la terminaison de la polymérisation de l'ADN et la cassure du simple brin. Ce nucléotide supplémentaire peut jouer un rôle important en cachant la dFdCTP des enzymes de réparation de l'ADN, car la présence de la gemcitabine dans l'ADN le rend résistant aux mécanismes de réparation classique. Ces effets sur la synthèse de l'ADN représentent le mécanisme d'action principal de la gemcitabine et démontrent que l'incorporation de dFdCTP dans l'ADN est le point critique de l'induction d'apoptose.

De plus, selon la lignée cellulaire, la dFdCTP est également incorporée à l'ARN. Cette incorporation temps et dose-dépendante, conduit à l'inhibition de la synthèse de l'ARN. Il a d'ailleurs été observé que dans des lignées cellulaires tumorales humaines présentant

différents degrés de résistance à la gemcitabine, la sensibilité au médicament était liée à des différences d'incorporation dans l'ARN. Le rôle de cette incorporation dans l'ARN sur l'induction de cytotoxicité est cependant toujours mal expliqué.

Enfin, certains métabolites de la gemcitabine peuvent inhiber plusieurs enzymes (par exemple, la ribonucléotide réductase est inhibée par dFdCDP) et conduire au renforcement de l'action de la gemcitabine (Mini, 2006).

I.2. LA BIOPHOTONIQUE

La biophotonique est par définition l'application de l'optique et de la photonique à la biologie, dans le cadre de la recherche fondamentale, du diagnostic et de l'intervention biomédicale. C'est un domaine transdisciplinaire qui relève de la physique (optique, photonique), de la chimie (spectroscopie, chromophores, nanomatériaux), de la biologie, de la biochimie, de la médecine (ADN, protéines, cellules, tissus, organismes), de l'ingénierie (instrumentation) et de l'éthique (en médecine, biologie, environnement et recherche) (<http://www.biophotonique.ulaval.ca/>, [Consulté 09/09]).

1.2.1. Principe de la spectroscopie vibrationnelle

Lorsqu'une onde électromagnétique interagit avec les champs électriques et magnétiques des atomes ou des molécules, on observe différents phénomènes tels que l'absorption, la diffusion et l'émission de photons. Les spectroscopies optiques sont des techniques qui permettent de mesurer ces phénomènes d'interaction lumière / matière.

Parmi les spectroscopies optiques, on distingue les spectroscopies vibrationnelles d'absorption infrarouge et de diffusion Raman (figure 5). Basées sur des transitions entre des niveaux vibrationnels d'un état électronique, ces techniques consistent à déterminer les fréquences de vibration des liaisons entre atomes d'une molécule. Il est donc possible de déduire des informations sur la nature et la structure d'une molécule, sous forme libre ou liée à partir d'un spectre.

Voyons plus en détails le principe de ces spectroscopies vibrationnelles.

➤ Spectroscopie infrarouge

Si le faisceau lumineux incident a une énergie du même ordre de grandeur que l'énergie de vibration des atomes de la molécule, le rayonnement va être absorbé et on enregistrera une diminution de l'intensité réfléchié ou transmise. Le domaine d'énergie de vibration des molécules correspond au domaine de fréquence moyen-infrarouge entre 400 et 4000 cm^{-1} (longueur d'onde de 2,5 à 25 μm).

Le spectre infrarouge représente donc l'absorbance A (ou la transmittance T) en fonction de la longueur d'onde λ qui est traditionnellement exprimée sous la forme du nombre d'onde ν :

$$\nu = \frac{1}{\lambda} \text{ en cm}^{-1} \quad (\text{Équation 1})$$

avec λ en cm

La loi de Beer-Lambert permet d'avoir accès à l'aspect quantitatif de l'analyse. Lorsqu'une radiation monochromatique traverse un milieu, une partie de son énergie peut être absorbée. La loi de Beer-Lambert donne l'intensité résultante I en fonction de l'intensité initiale I_0 , de la concentration c du milieu en substance absorbante, de la longueur l du trajet optique dans le milieu absorbant et du coefficient d'extinction moléculaire ϵ dépendant de la substance absorbante.

$$I = I_0 \times e^{-\epsilon cl} \quad (\text{Équation 2})$$

De cette relation, on exprime l'absorption par le pourcentage de transmittance :

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (\text{Équation 3})$$

Ou par l'absorbance :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (\text{Équation 4})$$

La proportionnalité entre l'absorbance et la concentration permet d'utiliser les spectroscopies d'absorption comme méthode d'analyse quantitative tant que l'on reste dans la limite de la plage de linéarité conforme à la loi de Beer-Lambert.

➤ Spectroscopie de diffusion Raman

Lors de l'interaction des photons d'une source monochromatique (laser) avec les molécules d'un échantillon, 1 photon sur 10^4 est diffusé élastiquement par ces molécules (sans changement d'énergie). Ce phénomène constitue la diffusion Rayleigh. Occasionnellement, 1 photon est diffusé de manière inélastique (1 sur 10^8) avec une légère variation en énergie, correspondant à la diffusion Raman. Cette diffusion peut être de type Stokes, lorsque la fréquence de la lumière diffusée ($\nu_0 - \nu_v$) est plus petite que celle de la lumière incidente, ou de type anti-Stokes, lorsque la fréquence de la diffusion ($\nu_0 + \nu_v$) est plus élevée que celle de la lumière incidente (figure 5).

A une température donnée, la répartition en niveaux d'énergie d'une molécule obéit à la loi de distribution de Maxwell-Boltzmann. Ainsi, pour obtenir une diffusion anti-Stokes de type $n \rightarrow n-1$, il faut être en présence de molécules se trouvant dans un état d'énergie vibrationnel excité. Le rapport des intensités des raies Stokes et anti-Stokes s'écrit sous la forme :

$$\frac{I_{\text{anti-Stokes}}}{I_{\text{Stokes}}} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v}\right)^4 \exp\left(-\frac{h\nu_v}{kT}\right) \quad (\text{Équation 5})$$

Avec k la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$),

T la température,

ν_0 la fréquence de l'onde excitatrice,

ν_v la fréquence du mode vibrationnel excité.

Introduction

Ce rapport des intensités des deux diffusions Raman peut être utilisé pour déterminer la température d'un échantillon sans aucun contact matériel.

En pratique, on mesure la diffusion Raman Stokes, d'intensité plus élevée que la diffusion anti-Stokes à température ambiante. En effet, l'état de départ de l'effet Stokes est le plus peuplé en électrons, car c'est un état de moindre énergie et, par conséquent, plus stable.

L'intensité de l'effet Stokes entre les états moléculaires m et n est donnée par l'équation :

$$I_{\text{Stokes}} = K(\nu_0 - \nu_v)^4 I_0 \sum_{ij} |(a_{ij})_{mn}|^2 \quad (\text{Équation 6})$$

Avec a_{ij} : $(\partial\alpha_{ij}/\partial Q)$, dérivée du tenseur de la polarisabilité selon les coordonnées x et y .

Q : coordonnées normales de vibration

K : constante

ν_0 : fréquence de la radiation incidente

ν_v : fréquence du mode vibrationnel excité

I_0 : intensité de la radiation incidente

De cette formule mathématique, on retiendra que l'intensité de la diffusion Raman Stokes augmente avec l'intensité et la fréquence de l'onde incidente. En pratique, on est limité par une fréquence d'excitation maximale qui induit des phénomènes d'émission de fluorescence parasite masquant l'effet Raman.

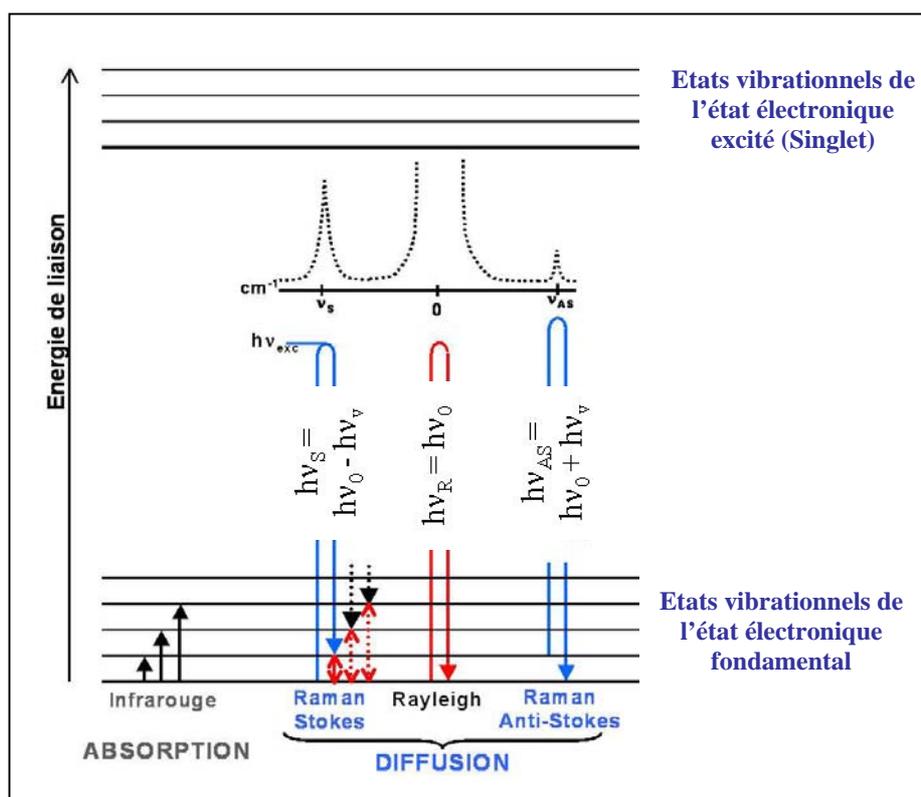


Figure 5 : Diagramme de Jablonski montrant les transitions impliquées dans les phénomènes d'absorption IR et de diffusion Raman.

1.2.1.1. Règles de sélection

Dans le diagramme énergétique de Jablonski (figure 5), l'énergie gagnée par la molécule est identique, qu'elle soit obtenue par effet Raman (stokes) ou par absorption infrarouge. Cela signifie que les fréquences IR et Raman caractérisant les niveaux de vibration sont identiques, mais avec des intensités différentes selon les règles de sélection basées sur les valeurs des dérivées du moment dipolaire ou de la polarisabilité des liaisons atomiques. En infrarouge, un mode de vibration est actif si la dérivée du moment dipolaire est non nulle, tandis qu'en Raman, il est actif si la dérivée de la polarisabilité est non nulle.

Ainsi, on peut déduire quelques règles importantes :

- Si la molécule possède un centre de symétrie, il n'existe aucune vibration commune au spectre infrarouge et au spectre Raman. Les vibrations symétriques

par rapport à ce centre seront actives en Raman mais inactives en infrarouge. C'est la règle de l'exclusion mutuelle.

- Certaines vibrations peuvent n'apparaissent ni en spectroscopie Raman, ni en spectroscopie infrarouge.
- Si la molécule possède au moins un axe de symétrie d'ordre supérieur à deux, des modes dégénérés apparaissent. Les modes de vibrations dégénérés sont alors confondus en une seule raie.
- Les vibrations totalement symétriques sont toujours actives en Raman. Les raies correspondantes sont polarisées et souvent très intenses. A titre d'exemple, on peut noter la respiration (pulsation) symétrique du cycle benzène à 992 cm^{-1} . Durant cette vibration, tous les atomes de carbone et d'hydrogène s'approchent ou s'éloignent en phase du centre du cycle. Les autres modes de vibration (antisymétriques ou dégénérés) lorsqu'ils sont actifs en Raman donnent des raies dépolarisées.

Ces règles de sélection ont été établies dans l'approximation harmonique. Or, dans les spectres réels, on observe parfois des bandes peu intenses correspondant à des harmoniques de fréquence $n\nu_v$ ou des combinaisons de fréquence $\nu_v + \nu'_v$.

1.2.1.2. Modes de vibration usuels

La figure 6 présente les modes de vibrations fréquemment rencontrés en spectroscopies vibrationnelles. On distingue les vibrations d'élongation et de déformation.

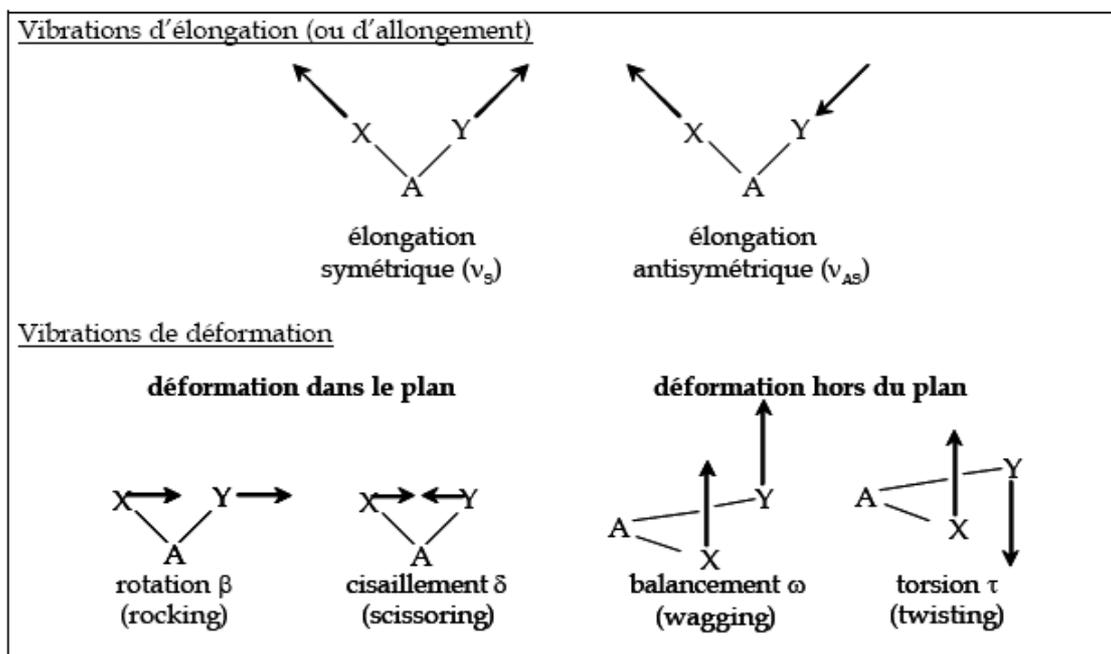


Figure 6 : Modes de vibration pour un groupement triatomique XAY coudé appartenant à une molécule.

1.2.1.3. Applications des spectroscopies vibrationnelles dans le domaine biomédical

Les spectroscopies vibrationnelles ont trouvé leur place dans de nombreuses applications, notamment dans l'étude de macromolécules biologiques. En effet, dans la littérature du début des années 1970, on trouve déjà des travaux portant sur la structure du squelette des acides nucléiques (Erfurth, 1972), sur la structure secondaire de l'ARN (Thomas, 1973), et sur des macromolécules cellulaires telles que les protéines et acides nucléiques (Peticolas, 1975).

Les études évoluent ensuite vers l'étude de l'interaction de ces macromolécules avec des agents anticancéreux (Dutta, 1986 ; Manfait, 1982), des substances cancérigènes (Neault, 1996 ; , 1997) et des molécules telles que la vitamine C (Neault, 1995) et l'aspirine (Neault, 1996). Puis dès le début des années 1980, la notion de cytologie spectrale apparaît notamment dans le cadre du diagnostic du cancer (Diem, 2004 ; Feofanov, 2000

; Griffin, 2004 ; Jeannesson, 1983 ; Lasch, 2002 ; Lasch, 2002 ; Ling, 2002 ; Liu, 1992 ; Moore, 1976 ; Yan, 2005 ; Yu, 2006).

Des méthodes plus récentes d'exaltation du signal, parmi lesquelles la technique SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy), ont permis de suivre la molécule d'intérêt et d'étudier par exemple, les interactions de ligands avec leurs cibles (Abdulaev, 1987 ; Breuzard, 2003 ; Chourpa, 1996 ; Graham, 2002 ; Murza, 2000). Dans le cadre du cancer, des nanoparticules marquées exaltant des signaux spécifiques de marqueurs malins ont été développées (Pal, 2006) et utilisées *in vivo* sur le petit animal (Keren, 2008 ; Qian, 2008) ou en tant que colorant moléculaire spécifique en histopathologie (Lutz, 2008 ; Sun, 2007). Dernièrement, des études portant sur de nouvelles méthodes de chimiothérapie ont montré qu'il est possible de cibler magnétiquement la chimiothérapie en associant le médicament à des nanoparticules SPION et de le libérer *in vitro* (Munnier, 2008).

Enfin, des sondes *in vivo* couplées à de modernes spectromètres Raman qui ne requièrent que quelques secondes pour mesurer un spectre, ont été considérées et utilisées comme des techniques en temps réel (Motz, 2005 ; Robichaux-Viehoever, 2007). Elles permettent ainsi l'acquisition d'une cartographie Raman à partir de tissus cervicaux (Krafft, 2007), allant même jusqu'à la possibilité d'enregistrer, en milieu clinique, des spectres *in vivo* sur des sujets humains subissant une bronchoscopie (Short, 2008), ou lors d'actes de chirurgie dans le cadre du cancer du sein afin de délimiter les pourtours de la tumeur (Motz, 2005). Il a même été possible d'analyser *in vivo* des lésions de la peau, telles que le carcinome cellulaire basal (Tfayli, 2006) ou de cibler des tissus profonds par spectroscopie Raman (Hart Prieto, 2005), offrant ainsi la possibilité de diagnostiquer *in vivo* des cancers apparaissant en profondeur dans le corps, tels que les cancers du sein ou de la prostate.

La spectroscopie IR-TF a elle aussi récemment montré son potentiel en tant qu'outil de chirurgie *in vivo* en temps réel, via l'application de fibre optique IR-TF en spectroscopie

ATR (Attenuated Total Reflectance), notamment pour la détection *in vivo* du cancer du colon (Li, 2005).

1.2.2. Les spectroscopies vibrationnelles, de la population cellulaire à la cellule isolée

Le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour l'étude d'échantillons biologiques a été largement reconnu durant ces dernières années (Diem, 2004). D'ailleurs, un relevé du nombre de publications spectroscopiques dans le domaine cellulaire, tant au niveau de populations cellulaires qu'à l'échelle de la cellule isolée, met en évidence une croissance importante de ce type de travaux durant les 10 dernières années.

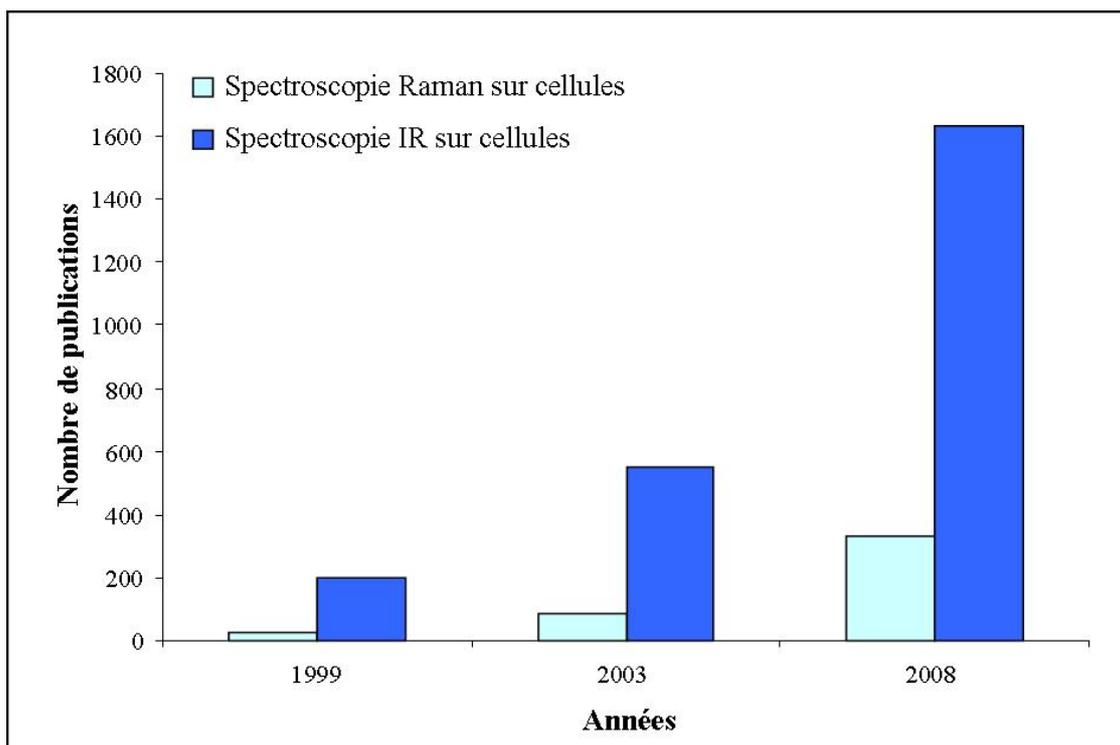


Figure 7 : Histogramme représentant le nombre de publications spectroscopiques dans le domaine cellulaire pour les années 1999, 2003 et 2008. En bleu clair, les études sur cellules par spectroscopie Raman, en bleu foncé les études sur cellules par spectroscopie IR (source PubMed pour les mots clés suivants : Raman spectroscopy cells et infrared spectroscopy cells).

Introduction

Il a ainsi été montré qu'il est possible de diagnostiquer par spectroscopie le cancer bronchique (Koljenovic, 2004 ; Yano, 2000), oral (Oliveira, 2006), du sein (Bitar, 2006), de l'œsophage (Shetty, 2006), du colon (Rigas, 1990 ; Wolthuis, 2008), de la prostate (Baker, 2009 ; Baker, 2008) et de la tête et du cou (Conti, 2009) à partir de tissus provenant de biopsies. Dans le cas des populations cellulaires, le cancer du poumon a pu être diagnostiqué à partir de cellules cancéreuses issues de fluides pleuraux de poumons de patients sains ou atteints d'un cancer du poumon (Wang, 1997). Des cellules provenant de patients sains, atteints de dysplasie ou d'un cancer du col de l'utérus ont également été étudiées et ont permis de mettre en évidence des changements structuraux dus à la carcinogénèse (Cohenford, 1998 ; Wong, 1991). Des variations de composition biochimique ont également été mises en évidence entre lignées cellulaires saines et cancéreuses, mais ne provenant pas de patients (Gaigneaux, 2004 ; Mourant, 2006 ; Mourant, 2005 ; Short, 2005 ; Short, 2006 ; Taleb, 2006).

Les mécanismes de résistance *in vitro* à différents médicaments anticancéreux ont pu être détectés par spectroscopies Raman et IR (Krishna, 2006 ; Murali Krishna, 2005). Cependant, ces résultats ont été obtenus à partir des lignées cellulaires HL60, MCF7 et MES-SA et non sur des cellules *in vivo*. De même, la réponse cellulaire vis-à-vis d'agents antitumoraux tels que la doxorubicine (Jeannesson, 1983), la gemcitabine (Draux, 2009), l'ouabain (Gasper, 2009) et l'étoposide (Liu, 2001) a pu être évaluée par spectroscopie.

En spectroscopie Raman sur cellule vivante isolée, la distinction entre cellules néoplastiques et cellules hématopoiétiques normales a été détectée (Chan, 2009), et un modèle diagnostique a été construit pour différencier cellules épithéliales cancéreuses de cellules normales (Chen, 2006 ; Yu, 2006).

Les spectroscopies vibrationnelles à l'échelle unicellulaire sont également beaucoup sollicitées pour évaluer la réponse cellulaire vis-à-vis des agents toxiques, tels que l'étoposide (Owen, 2006), le Triton X-100 (Notingher, 2004), le paclitaxel (Ling, 2002), un photosensibilisateur (Chio-Srichan, 2008) et le tétrachlorodibenzo-p-dioxin (Holman, 2000). D'autres travaux portent sur les changements biochimiques relatifs aux dynamiques du cycle cellulaire (Boydston-White, 2006 ; Notingher, 2003 ; Swain, 2008)

et de la mort cellulaire (Jamin, 2003 ; Notingher, 2003 ; Uzunbajakava, 2003 ; Verrier, 2004). Les spectroscopies vibrationnelles peuvent également être utilisées pour identifier et localiser les macromolécules, telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides, au sein des cellules isolées fixées (Uzunbajakava, 2003 ; Uzunbajakava, 2003 ; Xie, 2009) et vivantes (Jamin, 1998 ; Kuimova, 2009).

L'imagerie spectrale qui permet d'avoir accès à l'information cellulaire globale est maintenant de plus en plus utilisée notamment pour étudier des dynamiques spatiales intervenant dans les processus intercellulaires (Zhang, 2008), pour localiser précisément des compartiments cellulaires (Krafft C, 2003 ; Matthaus, 2007) ou encore pour l'identification et la distribution de macromolécules telles que les protéines et les lipides (Jamin, 1998 ; Uzunbajakava, 2003).

1.2.3. Applications des spectroscopies vibrationnelles à l'étude du cancer du poumon

La caractérisation de la composition biochimique de tissus bronchiques sains est essentielle pour comprendre les changements biochimiques accompagnant le développement du cancer. Elle permet par exemple, d'identifier des régions ayant une composition chimique différente et de les relier à la morphologie du tissu par cartographie Raman et coloration. Ainsi, la comparaison des images Raman avec les coupes histopathologiques a permis d'identifier des marqueurs spectraux spécifiques des différentes structures du tissu sain: mucus bronchique, épithélium, stroma, muscle lisse, tissu glandulaire et cartilage (Koljenovic, 2004). Il s'agit d'un travail préliminaire à des études futures portant sur la transformation cancéreuse d'épithélium bronchique.

Une autre étude Raman a montré qu'une approche diagnostique indirecte est possible chez les patients atteints d'un cancer du poumon via l'étude de leurs lymphocytes. En comparant les quantités intracellulaires en caroténoïdes dans les lymphocytes de patients atteints d'un cancer du poumon et de patients sains, il a en effet été établi qu'une

diminution significative de caroténoïdes indique un phénotype cancéreux (Bakker Schut, 1997).

Les spectroscopies peuvent également être utilisées à des fins diagnostiques. Ainsi, des données spectrales Raman et infrarouge issues de tissus bronchiques normaux et malins ont été comparées et ont révélé des changements moléculaires et cellulaires associés à la transformation maligne (Huang, 2003 ; Yano, 2000). Il est cependant important de tenir compte de l'état du tissu analysé ; une fixation au formaldéhyde pouvant empêcher l'utilisation des marqueurs diagnostiques (Huang, 2003). Des études spectroscopiques à l'échelle cellulaire ont également été menées pour détecter les cellules cancéreuses (Sule-Suso, 2004 ; Wang, 1997) et évaluer l'invasion tumorale (Yang, 2005). Ces travaux nous permettent d'envisager la possibilité d'évaluer la sensibilité de tumeurs de patients vis-à-vis d'un médicament avant de les soumettre inutilement à un traitement qui pourrait éventuellement se révéler inefficace.

Le cancer du poumon est habituellement fatal dès qu'il se métastase. Pour développer ces métastases, les cellules néoplasiques dégradent la membrane basale grâce à des protéases et pénètrent dans le stroma conjonctif pour atteindre le système vasculaire et lymphatique par un mécanisme d'intravasation. Ensuite, par un phénomène d'extravasation, elles quitteront les vaisseaux pour coloniser d'autres organes et y former des métastases. Récemment, l'étape de colonisation du stroma a pu être analysée par spectroscopie IR grâce à un modèle de matrice de collagène I. L'invasion de cette matrice par des cellules de cancer bronchique Calu-1 a été évaluée par IR-TF en suivant une bande caractéristique à 1080 cm^{-1} attribuée aux groupements phosphates (Yang, 2005). Ce type d'investigation pourrait servir de modèle d'étude du pouvoir invasif de cellules tumorales provenant de patients.

Enfin, sur le plan clinique, le développement des sondes fibre-optique couplées à un spectromètre Raman ont montré au cours de résultats préliminaires, qu'il est possible à partir d'une bronchoscopie, d'enregistrer des spectres de tissus pulmonaires de patients

Introduction

atteints de différentes pathologies telles que la dysplasie, le carcinome in situ ou un type tumoral spécifique comme le carcinome cellulaire épidermoïde (Short, 2008).

II. APPROCHES

METHODOLOGIQUES POUR

L'ANALYSE CELLULAIRE

II.1. SPECTROMETRIE INFRAROUGE AVEC UNE SOURCE CONVENTIONNELLE

Dans le cadre d'une étude portant sur les effets d'un agent anticancéreux, la gemcitabine, sur populations cellulaires traitées à des doses non cytotoxiques, nous avons utilisé un spectromètre IR avec source conventionnelle. Ce type d'appareil nous a permis d'acquérir des informations précoces sur la réponse cellulaire vis-à-vis du médicament.

II.1.1. Description du spectromètre IR-TF à haut débit

L'extension HTS-XT alliée au spectromètre IR-TF Tensor-27 (*Bruker Optik, Ettlingen, France*) permet à la spectroscopie IR-TF de scanner un échantillon à haut débit (figure 8).



Figure 8 : Photo représentant l'extension HTS-XT alliée au spectromètre IR-TF Tensor-27.

Les composants optiques constituant ce type d'appareillage sont les suivants :

- La source excitatrice fournie par un Global[®] émettant dans le moyen infrarouge (2,5 à 25 μ m).

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

- Le faisceau passe ensuite par une ouverture et éventuellement par une roue de filtre avant de traverser l'interféromètre Rocksolid.

Bref rappel du fonctionnement d'un interféromètre Rocksolid:

Le faisceau infrarouge entrant est divisé en deux par la séparatrice et le décalage de marche optique créé par le mouvement de la plateforme engendre des variations d'intensité arrivant sur le détecteur qui enregistre alors l'interférogramme. Associée à ce dispositif, une opération mathématique permet de représenter le spectre sous la forme de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde : la transformée de Fourier.

- Par un jeu de miroirs, le faisceau est ensuite dirigé vers la plaque 96 puits en silicium, sur lequel a été préalablement déposé l'échantillon à analyser.

Le dépôt des échantillons est présenté dans la partie "Experimental" dans l'article intitulé "IR spectroscopy evidences effect of non-cytotoxic doses of antitumor drug on cancer cells".

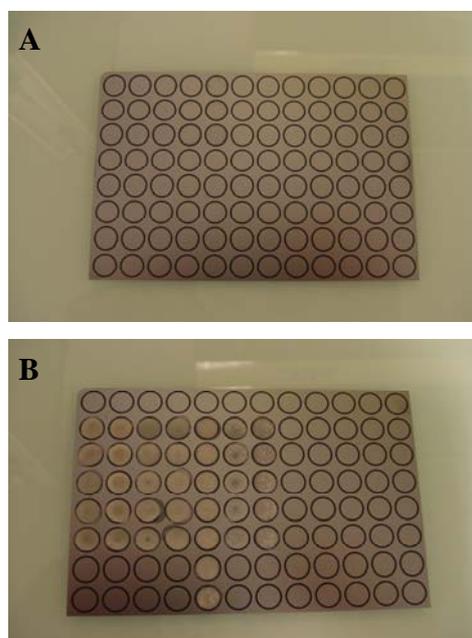


Figure 9 : Photos représentant une plaque 96 puits en silicium avant (A) et après dépôt (B).

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

- L'échantillon est traversé par le faisceau qui est ensuite envoyé vers le détecteur.

II.1.2. Avantages et inconvénients de cette technique

- Le principal avantage de cette approche est l'accès à une analyse à haut débit. En effet dans nos conditions expérimentales, ce dispositif offre la possibilité de mesurer 96 dépôts cellulaires en l'espace de 90 minutes seulement. Cette rapidité d'analyse nous a donc permis d'étudier, dans les mêmes conditions expérimentales, des populations cellulaires exposées à différentes doses de médicament pendant plusieurs temps d'exposition.

De plus, l'établissement du protocole d'analyse sur population cellulaire est simple et rapide.

Enfin, contrairement à la spectroscopie Raman, aucune calibration manuelle en fréquence n'est nécessaire, car le module contient un système d'auto-calibration interne basé sur la longueur d'onde d'un laser He/Ne.

- Le désavantage majeur de la spectroscopie IR réside dans la difficulté de travailler en milieu aqueux, et donc à l'échelle de la cellule vivante. Il faut en effet déshydrater les dépôts cellulaires afin d'éviter le signal parasite de l'eau. De plus, dans le cas où peu de cellules sont disponibles (par exemple, dans le cas de cellules issues de lavages bronchiques), on peut être confronté à une limite de cette technique, la qualité spectrale requérant un nombre assez élevé de cellules.

II.2. MICROSPECTROMETRIE INFRAROUGE AVEC LA SOURCE SYNCHROTRON SOLEIL

Le spectromètre IR à source conventionnelle n'est applicable que dans le cas de populations cellulaires. Ainsi, pour l'étude à l'échelle de la cellule isolée, nous avons utilisé la source synchrotron SOLEIL.

II.2.1. Qu'est-ce que SOLEIL ?

SOLEIL, acronyme de "Source Optimisée de Lumière d'Énergie Intermédiaire du LURE", est un centre de recherche implanté sur le Plateau de Saclay à Saint Aubin (Essonne). Plus concrètement, c'est un accélérateur de particules (des électrons) qui produit le rayonnement synchrotron, source de lumière extrêmement puissante qui permet d'explorer la matière inerte ou vivante.

II.2.2. Qu'est-ce qu'une source synchrotron ?

Le rayonnement synchrotron est une lumière émise par des électrons de très haute énergie (énergie nominale de SOLEIL de 2,75 GeV) tournant dans un anneau de stockage de 354 m de circonférence à une vitesse proche de celle de la lumière. Il apparaît tangentiellement à la trajectoire des électrons lorsque l'on courbe leur trajectoire avec un champ magnétique (figure 10).

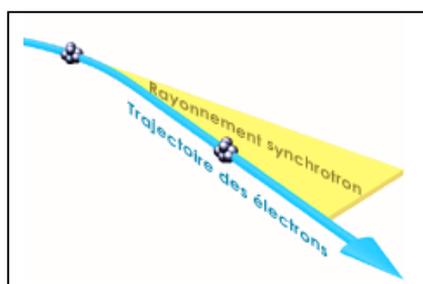


Figure 10 : Schéma simplifié montrant l'émission du rayonnement synchrotron (<http://www.synchrotron-soleil.fr/portal/page/portal/RessourcesPedagogiques/Soleil3Questions#CommentFonctionneSOLEIL>, [Consulté 09/09]).

II.2.3. Principe de fonctionnement d'une source synchrotron

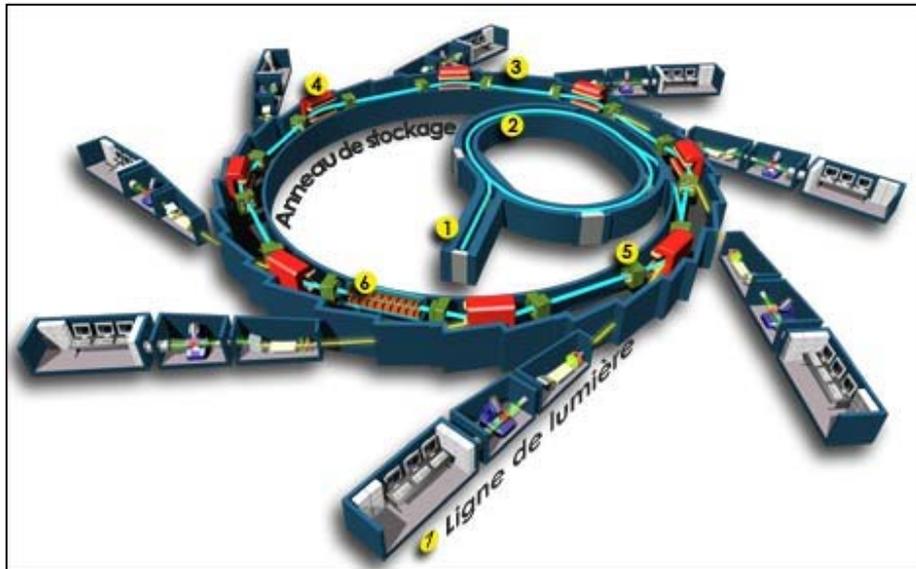


Figure 11 : Schéma simplifié du principe de fonctionnement de la source synchrotron SOLEIL (<http://www.synchrotron-soleil.fr/portal/page/portal/RessourcesPedagogiques/Soleil3Questions#CommentFonctionneSOLEIL>, [Consulté 09/09]).

1. Un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons est accéléré dans un accélérateur linéaire de 16 m de long où ils atteignent la vitesse de la lumière et un premier niveau d'énergie : 100 MeV.
2. Après cette première accélération, le faisceau d'électrons est dirigé vers un deuxième accélérateur circulaire qui porte leur énergie à la valeur de fonctionnement du synchrotron SOLEIL soit 2,75 GeV.
3. A ce niveau d'énergie, les électrons sont injectés dans l'anneau de stockage de 354 mètres de circonférence (soit 113 mètres de diamètre) et tournent pendant plusieurs heures.
4. Dans l'anneau de stockage, des dispositifs magnétiques dévient la trajectoire des électrons ou les font osciller. Les électrons perdent donc de l'énergie sous forme de lumière, c'est ce qu'on appelle "le rayonnement synchrotron".
5. L'énergie perdue par les électrons en émettant le rayonnement synchrotron est compensée par des cavités radiofréquences.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

6. Le rayonnement synchrotron est dirigé, sélectionné et conditionné par des systèmes optiques vers les stations expérimentales au niveau des lignes de lumière.

7. Chaque ligne de lumière constitue un véritable laboratoire pour préparer et analyser les échantillons à étudier, et traiter les informations recueillies. Les lignes de lumière sont classées selon leur gamme d'énergie (figure 12). Sur les 43 emplacements possibles sur SOLEIL, seules 24 lignes sont prévues dans la première phase (figure 13)

Pour les biologistes, ce type de radiation donne la possibilité de réaliser de l'imagerie rayon X, de la cristallographie et de la diffraction, et la spectroscopie rayon X, ...

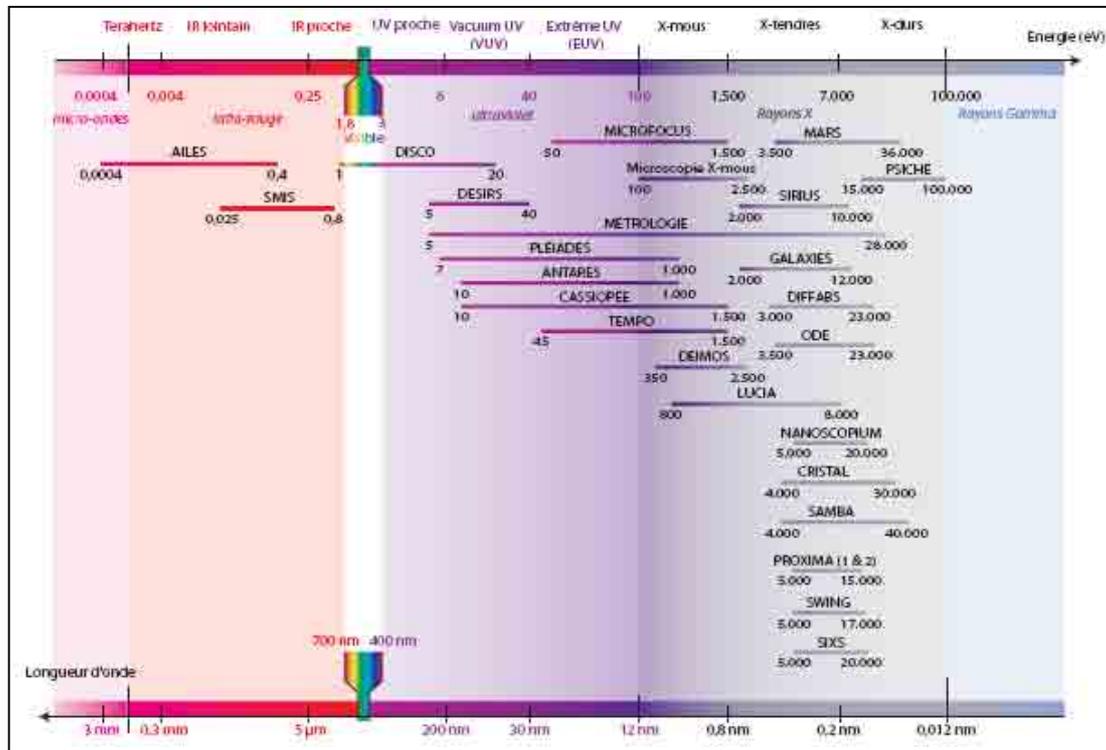


Figure 12 : Classification des différentes lignes de lumière selon la gamme d'énergie.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

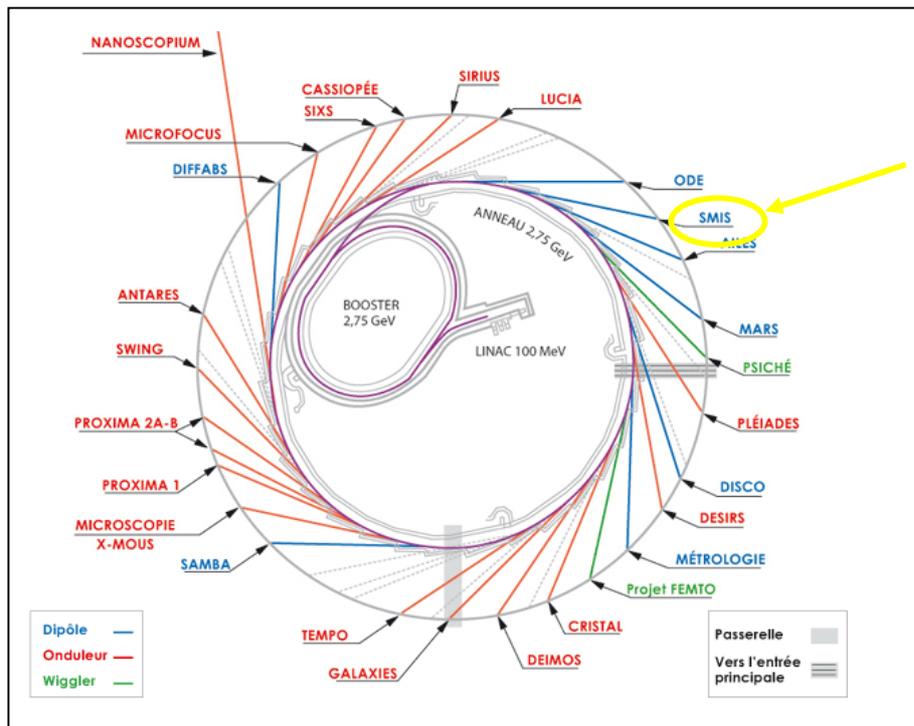


Figure 13 : Lignes de lumière disponibles à SOLEIL. Entouré d'un cercle jaune, l ligne infrarouge SMIS utilisée dans ce travail.

L'atout majeur de la source synchrotron est sa haute brillance. Elle est estimée à environ 1000 fois celle d'une source conventionnelle type Global[®], ce qui permet de diminuer les ouvertures de manière considérable et d'atteindre une résolution spatiale pouvant aller jusqu'à $3 \times 3 \mu\text{m}^2$, tout en conservant un signal de bonne qualité. Cette manipulation est également possible avec des systèmes de microspectrométrie IR équipée d'une source conventionnelle, mais celle-ci ne fournissant pas un rayonnement suffisamment brillant, le nombre de photons atteignant l'échantillon serait très faible, et le signal obtenu constitué de bruit uniquement. Ainsi, la limitation rencontrée par l'utilisation d'un spectromètre IR à source conventionnelle, à savoir la difficulté à travailler à l'échelle de la cellule isolée, peut être contournée par l'utilisation d'une source synchrotron. Plusieurs études ont d'ailleurs montré la possibilité d'enregistrer la signature spectrale de cellules vivantes (Moss, 2005) ou fixées (Gazi, 2005 ; Pijanka, 2009).



Figure 14 : Photo montrant l'anneau de stockage et les différentes lignes de lumière.

II.2.4. La ligne SMIS

Dans notre cas, nous avons utilisé la ligne SMIS qui allie la spectroscopie infrarouge à un microscope confocal, la combinaison produit ainsi des spectres de bonne qualité.

Le faisceau est réparti sur deux instruments grâce à une combinaison de miroirs plans et de miroirs toriques.

Pour l'enregistrement des spectres infrarouge, l'instrument utilisé est le Thermo Nicolet Magna 860 (Thermo Fischer, Courtaboeuf, France) couplé à un microscope Thermo Nicolet Nicplan (figure 15).

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

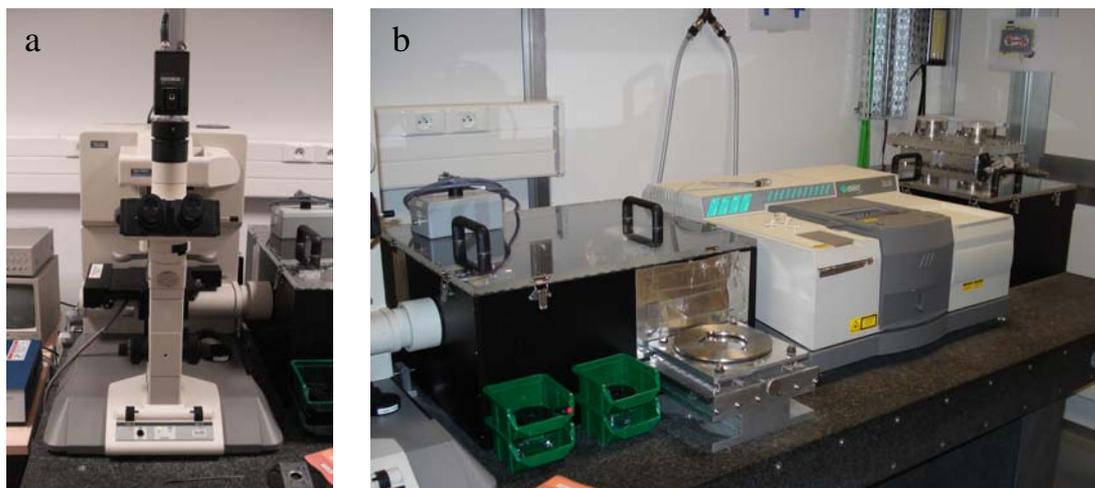


Figure 15 : a. Microscope Thermo Nicolet Nicplan, b. Spectromètre Thermo Nicolet Magna 860.

Ce microspectromètre est équipé d'objectifs refracromat (32X/ON 0,65 et 15X/ON 0,6) qui assurent la focalisation du faisceau sur l'échantillon et d'un détecteur de type MCT/A (Mercure Cadmium Telluride) ($250 \times 250 \mu\text{m}^2$) refroidi à l'azote liquide.

Le flux de photons sur l'échantillon est d'environ 4.8×10^{13} Phot/s/0.1% bw avant l'entrée dans l'interféromètre. La mesure des intensités des différentes longueurs d'onde transmises ou absorbées est réalisée avec un interféromètre (de Michelson) et d'un "beamsplitter" en KBr, le spectre résulte du calcul de la transformée de Fourier de l'interférogramme.

Le logiciel utilisé pour l'acquisition est Omnic software (version 7.3), il permet d'une part le réglage des paramètres d'acquisition, et d'autre part, le traitement des données (correction atmosphérique, normalisation, calcul des dérivées et reconstruction d'images spectrales).

Le dépôt des échantillons est présenté dans la partie "Experimental" de l'article intitulé "IR spectroscopy evidences effect of non-cytotoxic doses of antitumor drug on cancer cells".

II.2.5. Avantages et inconvénients de cette technique

- Il est indéniable que l'énorme avantage de la source synchrotron est qu'elle a permis une avancée importante dans l'acquisition d'informations biomoléculaires au niveau intra-cellulaire, avec un rapport signal/bruit jamais atteint à cette résolution. Plus important encore, elle a rendu possible l'acquisition d'images infrarouge à des résolutions subcellulaires. La résolution spatiale obtenue grâce à la haute brillance de la source et l'utilisation de la géométrie confocale, a permis d'atteindre la limite de diffraction ($\lambda/2$) (Dumas, 2007). Ainsi, la source synchrotron facilite l'étude d'organelles subcellulaires, mais également l'ensemble des cibles cellulaires d'intérêt.

De plus, la tendance actuelle en spectroscopie biomédicale est de pouvoir réaliser des études à l'échelle de la cellule isolée, et étudier une cellule vivante isolée soumise ou non à une perturbation extérieure serait encore mieux. A l'heure actuelle, acquérir des spectres infrarouge dans de telles conditions est possible uniquement avec l'utilisation d'une source synchrotron.

Enfin, les techniques de microscopies basée sur les rayons X peuvent facilement être ajoutées aux investigations cellulaires et tissulaires, étant donné que l'approche multimodale avec la combinaison de microsondes infrarouge, rayon X et Raman sur le même échantillon sera possible dans un futur proche.

- L'inconvénient majeur de la source synchrotron est qu'elle a un coût extrêmement élevé. Le budget de construction d'une source synchrotron avoisine plusieurs centaines de millions d'euros ! Par conséquent, l'accès aux lignes de lumière reste très compétitif car il repose sur des appels à projets au niveau international. De ce fait, le temps de faisceau alloué reste limité.

II.3. LA MICROSPECTROMETRIE RAMAN

II.3.1. Description du microspectromètre Raman

La figure 16 représente un schéma simplifié des systèmes optiques qui entrent dans la composition d'un microspectromètre Raman. Lors de nos expérimentations, nous avons utilisé un microspectromètre LabRam (Jobin Yvon Horiba, Lille, France) (figure 17).

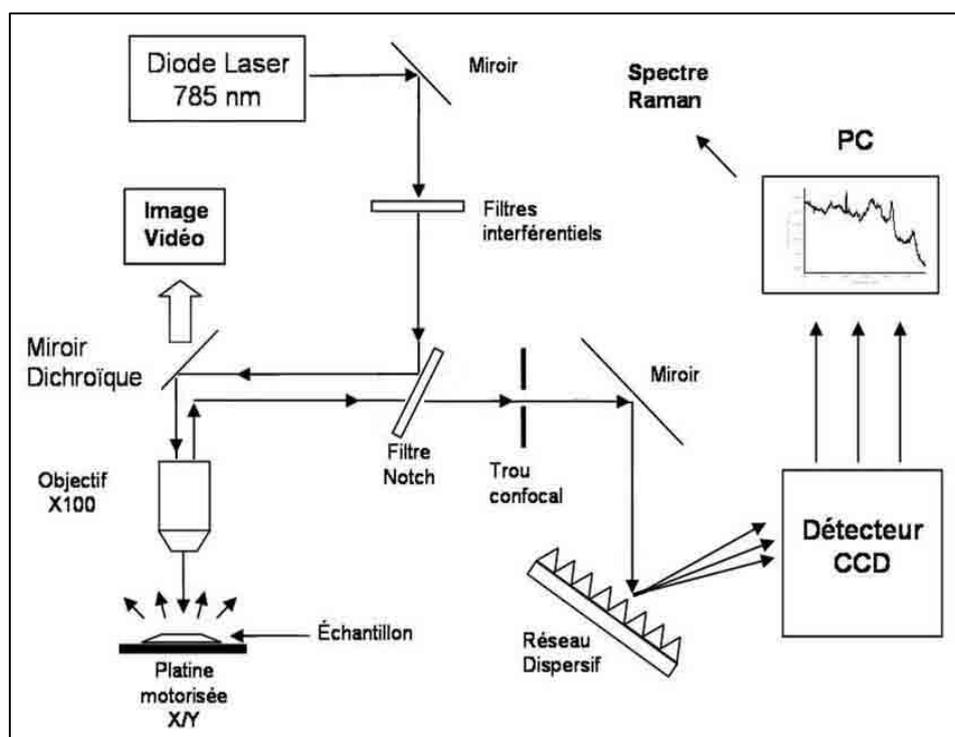


Figure 16: Description du microspectromètre Raman.

Les différents éléments qui constituent le système d'analyse sont les suivants :

- Un laser comme source excitatrice.

En spectroscopie Raman, le choix de la longueur d'onde d'excitation résulte d'un compromis : plus l'onde est énergétique (longueur d'onde courte ou fréquence élevée), plus la diffusion est intense. Cependant, plus on induit de transitions électroniques plus le

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

phénomène de fluorescence parasite sera élevé. L'intensité de diffusion est rappelée par la formule suivante établie dans le cadre du traitement quantique du phénomène :

$$I_{\text{Stokes}} = K' (v_0 - v_v)^4 \quad (\text{Équation 7})$$

Où v_0 : fréquence de l'onde excitatrice.

v_v : fréquence du mode vibrationnel excité

K' : constante dépendant de l'intensité du rayonnement incident et des variations de la dérivée de la polarisabilité de la liaison chimique.

Les photons énergétiques peuvent dégrader l'échantillon. Pour cette raison, nous avons opté pour une longueur d'onde d'excitatrice à 785 nm qui semble pouvoir donner un bon compromis entre l'intensité du signal et les phénomènes parasites.

- Le faisceau laser est focalisé sur l'échantillon au moyen d'un microscope optique de type Olympus BX40 équipé d'un objectif à immersion 100X (ouverture numérique =1)

Ce couplage entre le spectromètre et le microscope constitue une des caractéristiques importantes de la technique, car il permet d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre du micromètre. Cette résolution peut être divisée en deux composantes : la résolution axiale et la résolution latérale.

La valeur théorique de la résolution axiale est déterminée par l'équation suivante :

$$res_{axiale} = \frac{\lambda \cdot n}{(ON)^2} \quad (\text{Équation 8})$$

Où λ : longueur d'onde

n : indice de réfraction du milieu

ON : ouverture numérique de l'objectif

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

Tandis que la valeur théorique de la résolution latérale peut être calculée en utilisant l'équation suivante :

$$res_{lat} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{ON} \quad (\text{Équation 9})$$

- Un jeu de filtres atténuateurs (pas montré sur la figure 16) permet de réduire l'intensité du rayonnement incident, de manière à éviter toute dégradation photothermique de l'échantillon analysé.
- Un filtre Notch permettant d'une part d'éliminer la diffusion Rayleigh et d'autre part de transmettre la diffusion Raman.
- Le signal Raman est ensuite dirigé vers le spectromètre en passant au travers d'un trou confocal, ce qui permet de sélectionner le signal issu d'un volume donné de l'échantillon.

Pour nos acquisitions au niveau cellulaire, le trou confocal est ouvert à 150 μm , ce qui donne une résolution axiale estimée à 5 μm . La résolution latérale théorique est de 0,5 μm , mais dans nos expérimentations, elle a été évaluée à 2 μm .

- Le signal est ensuite focalisé sur la fente d'entrée du spectrographe. La largeur de la fente définit la résolution spectrale de l'appareil, mais lorsque l'ouverture de la fente est trop réduite, l'intensité du signal diminue également. Il faut donc un compromis entre la largeur de la fente et le rapport signal/bruit. Dans notre cas, la fente était fixée à 100 μm , ce qui permet d'avoir une résolution spectrale de 4 cm^{-1}
- Le signal obtenu atteint le système dispersif équipé d'un réseau de 950 traits/mm. Plus le nombre de traits par mm est élevé, plus la résolution spectrale est améliorée (équation 10). Dans nos conditions de mesure, la résolution spectrale était de 4 cm^{-1} .

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

La valeur théorique de la résolution spectrale peut être obtenue par l'équation suivante :

$$R=m.L.K \quad (\text{Équation 10})$$

- Où
- m = le nombre de traits au millimètre
 - L = la largeur éclairée du réseau (dépend de l'ouverture de la fente)
 - k = l'ordre du réseau

- Le spectre Raman est enregistré au moyen d'un détecteur multicanal CCD (Charged-Couple Device) de 1064x256 pixels. Ce système permet de mesurer simultanément l'intensité des différentes longueurs d'onde du spectre.
- L'échantillon à analyser est déplacé grâce à une platine motorisée. Celle-ci est indispensable pour l'enregistrement d'images spectrales constituées de spectres régulièrement espacés. Le pas de déplacement minimal est de 0,1 µm.



Figure 17 : a. microscope optique de type Olympus BX40, diode laser à 785 nm.

II.3.2. Avantages et limites de la spectroscopie Raman

- L'avantage majeur de la spectroscopie Raman est la faible diffusion de l'eau, ce qui en fait la technique vibrationnelle idéale pour l'analyse d'échantillons biologiques

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

ou en milieu aqueux. Elle permet donc l'analyse de tissus frais ou de cellules vivantes.

Il est également possible de réaliser des profils en épaisseur, par exemple pour analyser la pénétration de produits pharmaceutiques au travers d'une coupe de peau (Tfayli, 2007) ou des cellules évoluant au sein d'une matrice extracellulaire.

De plus, sa résolution spatiale de l'ordre du micromètre permet l'étude de cellules vivantes isolées, voire de compartiments subcellulaires, tels que le noyau, le cytoplasme, les membranes et les zones périnucléaires.

- Cette technique présente quelques inconvénients, tels qu'une calibration assez longue à effectuer quotidiennement, ainsi que la longueur des acquisitions spectrales (temps à optimiser dans le cas d'analyse de cellules vivantes, par exemple).

Il est également difficile, tout comme en spectroscopie infrarouge, de déterminer quel métabolite est responsable des changements causés au niveau du profil spectral.

Enfin, dans certaines situations, la spectroscopie Raman s'exerce difficilement en présence de phénomènes parasites comme la fluorescence ou encore la photodécomposition. Ces phénomènes se manifestent sous forme d'un fond large pouvant masquer l'information spectrale Raman, voire saturer le signal collecté.

II.4. MODELE CELLULAIRE UTILISE ET SES METHODES D'ETUDE

II.4.1. Lignée cellulaire

La souche Calu-1 est issue d'un carcinome pulmonaire de grade III d'un homme d'origine caucasienne, âgé de 47 ans. Ces cellules adhérentes au support (figure 18) ont été obtenues auprès de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures).

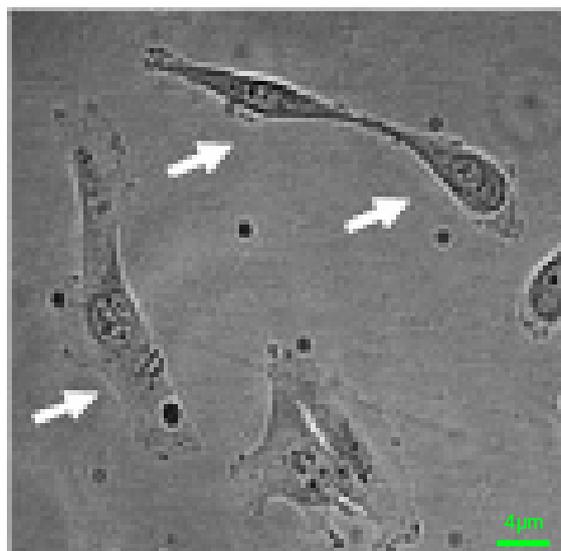


Figure 18 : La lignée cellulaire Calu-1 en microscopie à contraste de phase.

II.4.2. Conditions de culture

La lignée cellulaire Calu-1 est cultivée *in vitro* dans du milieu de culture liquide MEM Glutamax-I contenant des sels de Earle. Ce milieu nutritif est tamponné par du bicarbonate de sodium à un pH 7 et supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) préalablement décomplémenté 30 min à 56°C, 1% de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non-essentiels et 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen, Cergy Pontoise, Franc). Les cellules sont cultivées en monocouche jusqu'à 90% de confluence dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂ (Thermo Electron SA, Courtaboeuf, France). L'entretien est effectué pendant la phase exponentielle de croissance dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical (Thermo Electron SA, Courtaboeuf, France). Après le retrait du milieu de culture usagé, les cellules sont lavées dans un volume d'une solution tampon phosphate (Phosphate Buffer Solution ou PBS) puis décollées avec 1 ml de trypsine (Trypsine/EDTA (1×) dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺. Après incubation 37°C pendant 5 min, elles sont reprises dans 10 ml de milieu.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

L'évaluation de la concentration cellulaire est réalisée après homogénéisation et comptage à l'aide de lames Kova slide (Hycor Biomedical inc., CA, USA) en microscopie optique en contraste de phase. Des boîtes de culture de 75 cm² sont ensuite ensemencées à la densité de 5×10^4 cellules/ml dans un volume de 30 ml.

La viabilité des cellules est évaluée par la méthode d'exclusion au bleu Trypan 0,4 %. Ce colorant vital traverse facilement la membrane plasmique des cellules mortes et colore ainsi le cytoplasme en bleu, alors que les cellules vivantes gardent leur aspect translucide. Les cellules sont régulièrement testées pour la présence de mycoplasmes par des méthodes de PCR.

II.4.3. Préparation de la gemcitabine

La gemcitabine (Gemzar[®]) (figure 3) n'est disponible que sous forme de poudre. Elle est reconstituée sous forme liquide avec du sérum physiologique (0.9% NaCl) à une concentration de 100 mM de manière à appliquer notre étude aux mêmes conditions que celles utilisées en intraveineuse chez les patients atteints d'un cancer du poumon.

Les dilutions sont effectuées dans des tubes en verre afin d'éviter toute adsorption de la molécule au plastique et avec du milieu de culture MEM Glutamax-I contenant des sels de Earle non-supplémenté pour éviter toute agrégation de la molécule aux protéines contenues dans le sérum de veau foetal.

II.4.4. Analyse morphologique

Les cellules Calu-1 ont été ensemencées sur différents substrats optiques à 25×10^3 cellules/ml et laissées à adhérer pendant 24 h à 37°C. Ensuite, la morphologie cellulaire a été analysée en utilisant un microscope Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Germany) équipé d'un objectif 20X. Le microscope était piloté via le logiciel Metamorph (Roper Scientific, Evry, France) et les images enregistrées avec une caméra CCD (Charged-Couple Device ; CoolsnapHQ, Roper Scientific). Le rapport entre le nombre de cellules restées rondes et celles étant étalées et adhérentes a pu être déterminé pour chaque support optique testé.

II.4.5. Test au BrdU

Ce test a été utilisé pour évaluer d'une part la prolifération des cellules sur les différents substrats optiques, et d'autre part la cytotoxicité de différentes doses de gemcitabine. Le protocole expérimental pour ces deux expérimentations étant similaire, nous ne l'expliquerons qu'une seule fois. Tout d'abord, les cellules Calu-1 sont ensemencées sur les différents substrats à 50×10^3 cellules/ml et laissées à adhérer 24 h à 37°C. Puis, elles sont incubées pendant 2 h avec 10 mM de BrdU (Invitrogen), fixées pendant 20 min à l'éthanol 70% glacé et dénaturées 20 min avec un tampon HCl 2 M + 0.5% Triton X-100. Les résidus acides sont ensuite neutralisés avec une solution 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ à pH 8.5 pendant 2 min. Enfin, l'anticorps anti-BrdU est ajouté à raison d'une dilution au 1/20^{ème} pendant 20 min à l'abri de la lumière. Les cellules marquées au BrdU sont révélées par fluorescence via une excitation à 488 nm. Les résultats sont exprimés en cellules BrdU-positives en utilisant un microscope inversé Axiovert200M piloté via le logiciel Metamorph.

II.4.6. Extractions cellulaires d'ADN, ARN et protéines

II.4.6.1. Extraction de l'ADN

Pour cette extraction, nous avons utilisé le Mini Kit QIAamp® DNA (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fournisseur et les données de la littérature (El-Khoury, 2007). Une suspension cellulaire de 5×10^6 cellules est préparée dans 200 µl de PBS. Dans un eppendorf de 1,5 ml contenant 20 µl de Protéase QIAGEN, les 200 µl d'échantillon et 200 µL de tampon AL sont insérés. Le mélange est homogénéisé pendant 15 sec et laissé à incuber à 56°C pendant 10 min. Après une brève centrifugation, 200 µl d'éthanol (96-100%) sont ajoutés aux tubes qui sont de nouveau homogénéisés et centrifugés brièvement. Le contenu des tubes est ensuite transféré dans les colonnes QIAamp Spin préalablement placées dans des tubes de récupérations. Après centrifugation à 6000 g (8000 rpm) pendant 1 min, les colonnes sont placées dans un nouveau tube de récupération et le filtrat du tube de récupération précédent est jeté. 500 µl de tampon AW1 sont ajoutés dans les colonnes qui sont de nouveau centrifugées à 600

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

g (8000 rpm) pendant 1 min. 500 µl de tampon AW2 sont ajoutés dans les colonnes placées dans un nouveau tube de récupération. Après centrifugation pendant 3 min à 20 000 g (14 000 rpm) 200 µl de tampon AE ou d'eau distillée sont ajoutés et le tout est laissé à incuber à température ambiante (15-25°C) pendant 1 min, puis centrifugé pendant 1 min à 6000 g (8000 rpm). Le filtrat obtenu contient l'ADN extrait de l'échantillon de suspension cellulaire.

II.4.6.2. Extraction des ARN totaux

La technique du Trizol (Invitrogen) utilisée pour cette extraction est basée sur la solubilité différentielle des molécules (acides nucléiques/contaminants) entre deux phases non miscibles, selon un protocole préalablement utilisé (Trussardi-Régnier). Le Trizol, mélange de thiocyanate de guanidine et de phénol, est un agent rapide et utile dans l'utilisation simultanée de l'ARN, de l'ADN et des protéines. Il dissout l'ADN, l'ARN et les protéines et forme une solution monophasée. Après addition de chloroforme et centrifugation, le mélange est séparé en 3 phases :

- Une phase aqueuse contenant l'ARN,
- Une interphase blanche contenant l'ADN,
- Une phase organique contenant les protéines.

Le culot cellulaire est préparé avec 1 à 2×10^6 cellules lavées au PBS froid. Il est ensuite repris dans 1ml de Trizol, laissé à incuber 5 min à 4°C et centrifugé pendant 15 min à 12 000 g. La phase supérieure contenant les ARN est récupérée et transférée dans un nouveau tube. 500 µl d'isopropanol sont ajoutés afin de faire précipiter les ARN et le mélange est laissé à incuber entre 30 min et une nuit à 4°C. Après centrifugation pendant 10 min à 12 000 g, le surnageant est éliminé et le précipité lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. Après centrifugation pendant 5 min à 12 000 g, le culot est séché et repris dans de l'eau UltraPure DNase/RNase free.

II.4.6.3. Extraction des protéines totales

Un culot cellulaire de 4×10^6 cellules préalablement lavé au PBS froid est repris dans 100 µl de tampon de lyse (Tris 10mM, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, H₂O QSP 100ml) et agité

vigoureusement par des aller-retours avec une pipette. Le lysat cellulaire est centrifugé pendant 10 min à 10 000 rpm, la fraction soluble, qui contient les protéines totales, est récupérée.

II.5. ANALYSE DES DONNEES SPECTRALES RAMAN

Les spectres Raman acquis sont constitués d'informations spectrales sur la composition moléculaire de l'échantillon analysé et de divers bruits d'origines instrumentale, optique et biologique. Des pré-traitements mathématiques sont donc appliqués à ces spectres afin d'extraire la partie signal des spectres et éliminer la partie bruit. De plus, les différences spectrales existantes entre des structures biologiques différentes peuvent être très subtiles. Des méthodes puissantes d'analyse statistique des données doivent donc être mises en œuvre afin d'interpréter ces données fortement corrélées.

Les logiciels d'analyse spectrale tels que CytoSpec sont généralement dédiés à l'analyse d'images spectrales Infrarouge. A ma connaissance, seul le logiciel Labspec permet une analyse basique des spectres Raman. Devant ce constat, un logiciel opérant sous Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts) a été spécialement développé au sein du laboratoire afin de proposer une interface graphique simple et complète de pré-traitements et d'analyse des données Raman. Cette interface de travail est représentée sur la figure 18.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

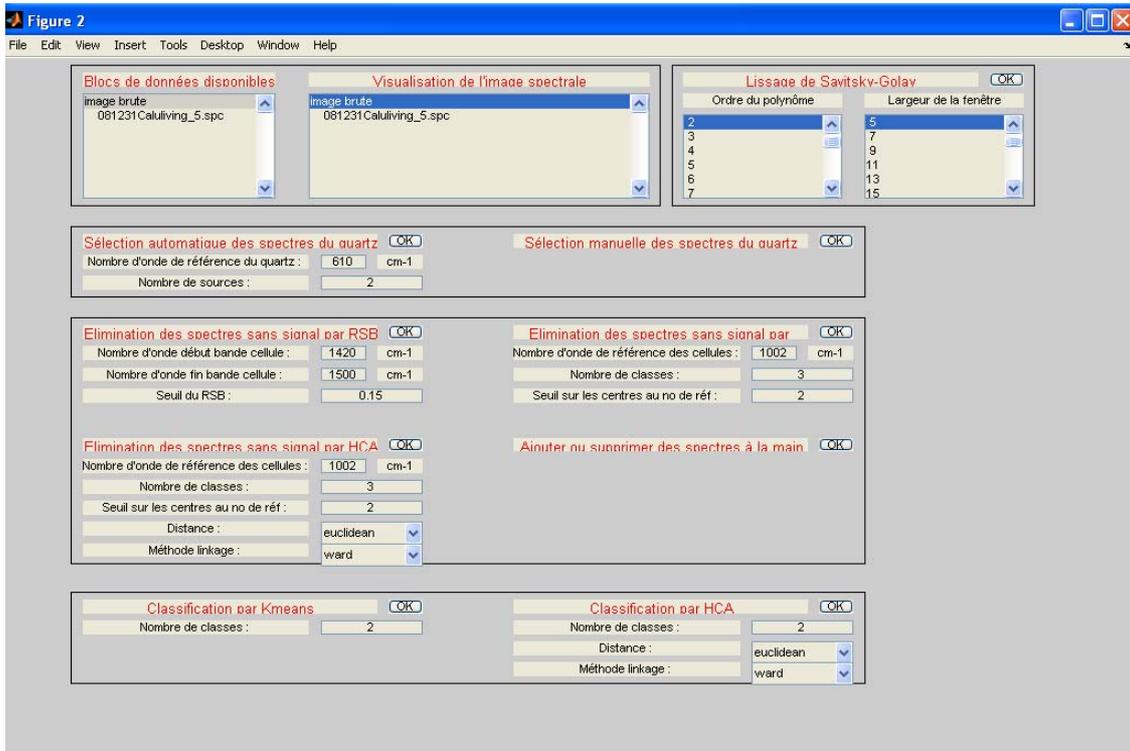


Figure 19 : Interface graphique de pré-traitements de d'analyse des images spectrales Raman.

II.5.1. Prétraitements des données spectrales Raman

Dans un premier temps, les données spectrales Raman sont corrigées du courant noir I_{cn} et de la réponse du détecteur I_d afin de réduire l'influence de la réponse de l'instrument. A cette fin, une acquisition à vide du détecteur est enregistrée afin d'obtenir I_{cn} . De même, la réponse du détecteur I_d est obtenue en enregistrant sur le CCD la réponse de l'instrumentation à une lumière blanche mimant un corps noir. Ces deux signaux, dont un exemple est présenté sur les figures 19 et 20, sont acquis dans les mêmes conditions expérimentales que les spectres Raman enregistrés sur l'échantillon analysé.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

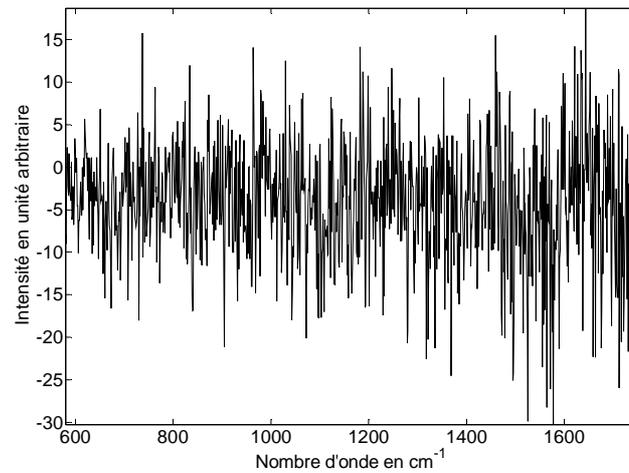


Figure 20 : Exemple d'une acquisition du courant noir I_{cn} .

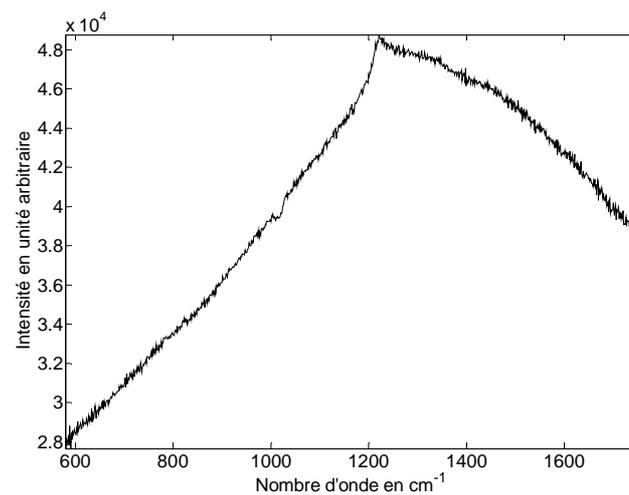


Figure 21 : Exemple d'une acquisition de la réponse du détecteur I_d .

Puis la correction est réalisée mathématiquement sur chaque spectre enregistré I par la formule suivante :

$$I_1 = (I - I_{cn}) ./ (I_d - I_{cn}) \quad (\text{Équation 11})$$

où I_1 représente le spectre I corrigé du courant noir et de la lumière blanche, et $./$ est l'opérateur de division terme à terme (Gobinet, 2009).

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

Les spectres I_1 corrigés sont ensuite recalés en nombre d'onde afin de compenser les shifts dus à la dérive de l'appareil. Pour ce faire, les spectres Raman de composés de référence (1,4bis (2-méthylstyryl) benzène et du naphthalène) sont enregistrés à chaque manipulation. La position des principaux pics est relevée et comparée aux données connues afin de pouvoir déterminer les décalages spectraux. Ceux-ci n'étant pas linéaires en fonction des nombres d'onde, une courbe d'extrapolation est construite à l'aide d'un polynôme d'ordre 3. Puis chaque nombre d'onde d'acquisition est recalé à partir de cette courbe d'extrapolation. L'ordre 3 du polynôme a été choisi de façon empirique après plusieurs essais. A la fin de cette procédure, les spectres I_2 sont obtenus.

Les déformations dues à l'instrumentation ayant été corrigées, il reste à corriger les spectres du bruit de mesure. Un lissage de Savitzky-Golay (Savitzky, 1964) a été choisi, car il est simple d'utilisation, efficace et largement utilisé par la communauté de la spectroscopie Raman. Ce lissage est basé sur une fenêtre, de taille fixe spécifiée par l'utilisateur, qui glisse sur le spectre. A l'intérieur de cette fenêtre, les données sont interpolées par un polynôme dont l'ordre est choisi par l'utilisateur. Les coefficients du polynôme sont estimés de façon à passer au mieux (au sens des moindres carrés) par les points de mesure. Puis l'intensité du point milieu de cette fenêtre est remplacée par la valeur du polynôme en ce point. Et cette procédure est répétée après décalage de la fenêtre. Le lissage de Savitzky-Golay est appliqué sur tous les spectres I_2 pour donner des spectres lissés I_3 .

L'efficacité du lissage augmente avec la taille de la fenêtre mais diminue avec l'augmentation du degré du polynôme. Une taille de fenêtre trop grande associée à un ordre de polynôme trop petit peut gommer des caractéristiques spectrales importantes. Un compromis judicieux doit donc être fait entre la taille de la fenêtre et l'ordre du polynôme. Dans ce qui suit, un ordre de polynôme égal à 2 et une taille de fenêtre égal à 19 ont été choisis après plusieurs essais pour leur efficacité à "débruiter" sans éliminer de structures spectrales informatives.

Les acquisitions Raman ont été réalisées sur des échantillons déposés sur des supports en quartz. Or, le quartz possède une signature spectrale qu'il faut soustraire afin de ne

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

conserver que l'information spectrale de l'échantillon analysé. Pour réaliser cette opération de soustraction, il est donc nécessaire de disposer de spectres de référence du quartz. Les images Raman ayant été acquises sur des cellules ayant une forme sphérique, les bords de ces images ne sont donc généralement constitués que de quartz. Afin de disposer d'une méthode robuste et rapide de sélection de spectres de référence du quartz sur les images spectrales enregistrées, un algorithme automatique de sélection a été développé.

Chaque spectre acquis peut être vu comme une superposition de la contribution du quartz et de la contribution de l'échantillon. Le but de l'algorithme est de déterminer les points d'acquisition dont la contribution de l'échantillon est nulle. Or le spectre Raman du quartz est constitué de bandes larges, tandis que le spectre de l'échantillon est constitué de bandes Raman étroites. De plus, les bandes du quartz et de l'échantillon sont relativement bien séparées. Les spectres du quartz et de l'échantillon peuvent donc être supposés statistiquement indépendants. Grâce à cette hypothèse, des méthodes de séparation aveugle de sources (blind source separation (BSS)) (Choi, 2005), de type analyse en composantes indépendantes (independent component analysis (ICA)) (Cardoso, 1993 ; Hyvarinen, 2001), ont pu être mises en œuvre sur les images spectrales acquises afin d'extraire les deux sources qui composent chaque spectre acquis, à savoir une estimation du spectre du quartz et une estimation du spectre de l'échantillon. L'algorithme détecte automatiquement quelle source estime le spectre du quartz. Les concentrations relatives du quartz et de l'échantillon sont estimées au même moment. A noter que les spectres dont la concentration en quartz est très forte et la concentration en l'échantillon très faible sont donc considérés comme des spectres de référence du quartz de l'image spectrale considérée. Ce nombre de spectres de référence peut varier d'une image à l'autre. Soit $I_{R1}, I_{R2}, \dots, I_{RN}$, les N spectres de référence sélectionnés du quartz.

Il est à noter également que la source qui estime le spectre du quartz n'est pas considérée comme un spectre "pur" du quartz, car l'indépendance statistique supposée entre le spectre du quartz et le spectre de l'échantillon n'est pas totale. Ainsi des erreurs d'estimation sont inévitables et pourraient perturber la suite de la procédure d'élimination de la contribution du quartz.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

Une fois ces spectres de référence du quartz I_{R1} , I_{R2} , ..., I_{RN} sélectionnés de façon automatique, leur contribution en chaque spectre acquis est estimée grâce à une régression par moindres carrés contraints à la non-négativité (non-negatively constrained least-squares (NCLS)) (Kwan, 2006). Chaque spectre acquis est ainsi modélisé linéairement selon l'équation ci-dessous:

$$I_B = a_1 I_{R1} + a_2 I_{R2} + \dots + a_N I_{RN} + b_0 + b_1 \Lambda + b_2 \Lambda^2 + b_3 \Lambda^3 + b_4 \Lambda^4 + e \quad (\text{Équation 12})$$

Où les coefficients a_1 , a_2 , ..., a_N sont les concentrations des spectres de référence du quartz au point d'acquisition considéré,
le vecteur Λ représente le vecteur des nombres d'onde d'acquisition,
les coefficients b_0 , b_1 , b_2 , b_3 et b_4 sont les coefficients du polynôme d'ordre 4 en Λ ,
 e représente l'erreur de modélisation.

En fait, l'ensemble $b_0 + b_1 \Lambda + b_2 \Lambda^2 + b_3 \Lambda^3 + b_4 \Lambda^4$ permet de modéliser les fluctuations du fond de fluorescence d'un point d'acquisition à un autre. Les coefficients a_i et b_j sont déterminés par la méthode des moindres carrés avec pour contrainte que les coefficients a_i soient positifs ou nuls. A la fin de la procédure, le spectre corrigé de la contribution du quartz est représenté par $I_4 = e$.

Comme décrit précédemment, certains pixels de l'image Raman sont constitués uniquement de quartz. Ainsi, après avoir soustrait la contribution du quartz de ces spectres, il ne reste que du bruit. Il est donc indispensable d'éliminer ces spectres de bruit de toute analyse ultérieure, afin de ne pas fausser les résultats.

Une méthode d'élimination automatique de ces spectres sans signal a été appliquée. Elle est basée sur un concept assez simple : l'aire intégrée d'une bande Raman caractéristique spécifiée par l'utilisateur (dans cette étude, la bande 1420-1500 cm^{-1}) est calculée pour tous les spectres I_4 . Les spectres dont l'aire est inférieure à un seuil fixé par l'utilisateur (dans cette étude, 0.15) sont considérés comme trop faibles et sont donc écartés de l'étude.

Enfin, de manière à accorder la même importance à tous les spectres conservés et donc de ne pas réaliser une analyse dépendante basée sur l'intensité des spectres, une normalisation centrée réduite (Standard Normal Variate (SNV)) (Barnes, 1989), est appliquée sur les spectres I_4 conservés. Cette méthode soustrait la moyenne de ce spectre, puis le normalise par son écart-type. Un spectre ainsi normalisé possède donc une moyenne nulle et un écart-type égal à 1.

II.5.2. Analyse par classification hiérarchique

La classification hiérarchique (Hierarchical Cluster Analysis (HCA)) (Ward, 1963), est une méthode mathématique de classification non-supervisée qui permet de grouper des spectres selon leur ressemblance statistique. Ainsi, par cette méthode, des spectres enregistrés sur une même structure biologique seront regroupés ensemble, car ils exhiberont des spectres similaires. Par contre, des spectres enregistrés sur des structures biologiques différentes seront classés dans des groupes différents, puisque leurs spectres présenteront des différences. Cette méthode de classification est très puissante, car elle permet de classer en aveugle des spectres présentant des différences spectrales très fines issues de structures biologiques différentes. Dans la majeure partie de nos résultats, la classification hiérarchique a été préférée à d'autres méthodes de classification non-supervisée, telle que les K-means (MacQueen, 1967), car elle est indépendante de l'initialisation de l'algorithme. Les inconvénients majeurs de cette méthode, qui sont le temps de calcul et les ressources mémoire, n'ont pas été des facteurs limitants dans ces analyses, car les images spectrales acquises dans cette étude sont constituées de peu de spectres.

Trois paramètres doivent être choisis par l'utilisateur de la HCA : le type de distance mesurée entre deux spectres, la méthode de regroupement des spectres et le nombre de groupes (ou clusters). Dans cette étude, la distance euclidienne et la méthode de regroupement de Ward ont été respectivement choisies, car elles sont les plus efficaces et

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

les plus populaires. Le nombre de groupes a quant à lui été fixé de façon empirique après plusieurs essais successifs.

Après convergence de l'algorithme de HCA, un entier compris entre 1 et le nombre de groupes est affecté à chaque spectre. Cet entier correspond au groupe auquel est affecté le spectre. Un spectre ayant un entier égal à 1 est affecté au groupe 1, un spectre ayant un entier égal à 2 appartient au groupe 2, etc. Ainsi, tous les spectres ayant le même numéro de groupe appartiennent au même groupe et sont donc très similaires. Chaque groupe peut ainsi être affecté à une structure biologique spécifique. En sortie de l'algorithme, un dendrogramme est dessiné. Il s'agit d'un arbre hiérarchique sur lequel est schématisé sous forme de branches le regroupement successif des spectres en classes en fonction du degré de similarité. Un exemple de dendrogramme est donné sur la figure suivante :

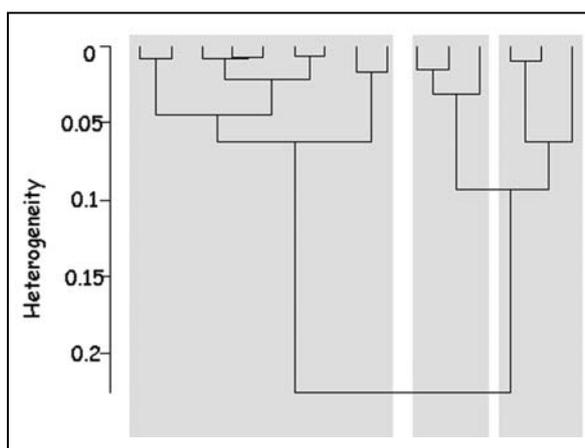


Figure 22 : Exemple d'un dendrogramme obtenu après HCA.

Lorsque le jeu de données analysé est composé d'un nombre important de spectres (dans le cas d'images spectrales, par exemple), la visualisation des résultats sous forme de dendrogramme peut s'avérer difficile. Il est alors plus simple dans ce cas de couper le dendrogramme au nombre de classes souhaitées. Si C classes sont souhaitées, alors le dendrogramme est coupé au degré de similarité pour lequel seules C branches sont présentes. Tous les spectres qui sont reliés à la $i^{\text{ème}}$ branche sont affectés à la $i^{\text{ème}}$ classe. Ainsi, pour des images spectrales, une représentation visuelle simple et informative des résultats peut être obtenue en affectant une couleur différente à chaque groupe. Des

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

images pseudo-couleur où chaque couleur symbolise une classe sont alors générées, ce qui permet une visualisation des résultats et une interprétation simplifiée.

Une autre sortie de l'algorithme fournit les centroïdes des classes encore appelés centres de classe ou individus moyens des classes. Chaque centroïde représente le spectre moyen d'une classe et fournit donc les informations spectrales moyennes d'une classe. Les centres de classes peuvent être comparés afin d'étudier les différences spectrales moyennes qui existent entre classes et donc entre structures biologiques.

II.5.3. Analyse par classification Kmeans

Tout comme la HCA, la méthode des Kmeans (MacQueen, 1967) est une méthode de classification non-supervisée. Cependant, contrairement à la HCA, cette technique n'est pas hiérarchique, c'est-à-dire qu'elle ne regroupe pas à chaque itération les deux objets les plus similaires. La méthode des Kmeans cherche à minimiser la somme intra-classe des distances entre les spectres d'une classe et son centroïde.

Pour simplifier l'explication de cette méthode, supposons que N spectres doivent être classés en C classes. Dans sa version classique, l'algorithme des Kmeans débute par une initialisation aléatoire des centroïdes des classes, c'est-à-dire que l'algorithme choisit au hasard C spectres qui modélisent les C centroïdes. Dans la seconde étape, les distances euclidiennes entre le premier spectre et tous les centroïdes sont calculées. Le premier spectre est affecté à la classe dont le centroïde lui est le plus proche. Puis cette opération est répétée pour chacun des $N-1$ spectres acquis restants. A la fin de cette seconde étape, une classe est affectée à chaque spectre. Dans la troisième étape, le centroïde de la première classe est recalculé comme la moyenne de tous les spectres qui ont été affectés à la première classe. Cette opération est répétée pour les $C-1$ centroïdes restants. Puis l'algorithme répète les seconde et troisième étapes jusqu'à ce que plus aucun point ne change de classe d'une itération à une autre.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

En sortie, l'algorithme des Kmeans fournit une partition des spectres analysés, c'est-à-dire que chaque spectre est affecté à une classe unique. Tout comme pour la HCA, cette partition peut être visuellement représentée par une image pseudo-couleur où chaque couleur correspond à une classe précise. De plus, les centroïdes des classes sont accessibles.

A la différence de la HCA, la méthode des Kmeans est dépendante de l'initialisation, c'est-à-dire que si l'algorithme est lancé plusieurs fois, alors les spectres aléatoirement sélectionnés comme des centroïdes au début de l'algorithme seront différents d'un lancement à l'autre, et donc l'algorithme pourra converger vers des solutions différentes, donc des partitions différentes. L'algorithme des Kmeans converge vers un minimum local de sa fonction objectif (la somme intra-classe des distances entre les spectres d'une classe et son centroïde) et non un minimum global.

Afin de dépasser ce problème, deux solutions différentes existent. La première consiste à lancer l'algorithme des Kmeans plusieurs fois. La partition la plus fréquente sera considérée comme la solution optimale. Mais dans certain cas, en particulier lorsque des classes sont composées de peu d'objets par rapport à d'autres classes et qu'elles sont à proximité de classes plus grosses, la majorité des partitions estimées convergeront vers un minimum local. C'est pourquoi une deuxième solution consiste à forcer l'initialisation des centroïdes afin d'assurer la convergence de l'algorithme vers la solution optimale.

Dans la majorité des cas, l'algorithme des Kmeans initialisé aléatoirement converge vers une solution très proche de celle de la HCA. C'est pourquoi la HCA, qui est indépendante de l'initialisation, est en général privilégiée lorsque la taille du jeu de données à traiter est petite, ce qui est le cas pour les travaux exposés dans ce mémoire.

La méthode des Kmeans est préférée à la HCA lorsque le jeu de données à analyser est de grande taille afin de réduire les temps de calculs, ou lorsqu'une initialisation forcée est nécessaire pour obtenir une solution optimale. Cette dernière explication justifie l'utilisation de la technique des Kmeans dans l'article intitulé "Raman spectral imaging

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

of single living cancer cells a preliminary study". En effet, la HCA et la méthode des Kmeans initialisée aléatoirement ont donné des résultats similaires mais mauvais sur l'image spectrale présentée dans cet article. C'est pourquoi les centroïdes des Kmeans ont été initialisés par des spectres spécifiques des structures biologiques à mettre en évidence.

II.5.4. Détermination de zones discriminantes

Lorsque les différences spectrales entre les divers phénomènes ou les diverses structures biologiques à mettre en évidence par l'analyse spectrale Raman sont très fines, l'utilisation de l'ensemble de la gamme spectrale enregistrée peut s'avérer être un handicap pour les méthodes d'analyse multivariée, telle que la classification hiérarchique. En effet, les intensités enregistrées à certains nombres d'onde peuvent résulter du bruit de mesure. Si peu de nombres d'onde sont discriminants entre les structures biologiques à étudier, la classification se fera majoritairement sur le bruit, entraînant ainsi des résultats complètement erronés et inexploitable. C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser une sélection des nombres d'onde les plus discriminants entre les structures biologiques étudiées.

Dans ce travail, le test de Kruskal-Wallis, réalisé sous Matlab, a été utilisé pour deux raisons. Tout d'abord, ce test étant non-paramétrique, aucune distribution de probabilité n'est supposée pour les intensités de chaque nombre d'onde. Ensuite, il peut être appliqué sur plus de deux groupes de données. Ce test nécessite cependant la connaissance *a priori* de l'affectation de chaque spectre à une structure biologique donnée. Pour chaque nombre d'onde, une valeur de p est générée, quantifiant l'appartenance des groupes à une même population. Si p est grand, tous les groupes appartiennent à la même population pour le nombre d'onde considéré, c'est-à-dire que cette longueur d'onde n'est pas discriminante entre les groupes. Si p est petit, au moins deux groupes appartiennent à des populations différentes pour le nombre d'onde considéré, c'est-à-dire que cette longueur d'onde est discriminante pour au moins deux groupes. A la suite de ce test, il suffit donc

de ne conserver que les nombres d'onde pour lesquels la valeur de p est inférieure à un seuil qui est généralement fixé à 0,05 dans le biomédical.

II.5.5. Régression linéaire des spectres de références sur les données acquises

Lorsque les spectres de références des constituants chimiques de l'échantillon analysé sont disponibles, il est intéressant de réaliser une régression linéaire de ces spectres de références sur les spectres acquis afin de pouvoir estimer la contribution de ces spectres de références en chaque point d'acquisition. A cette fin, une nouvelle interface graphique présentée sur la figure 19 a été développée à partir de celle présentée sur la figure 23.

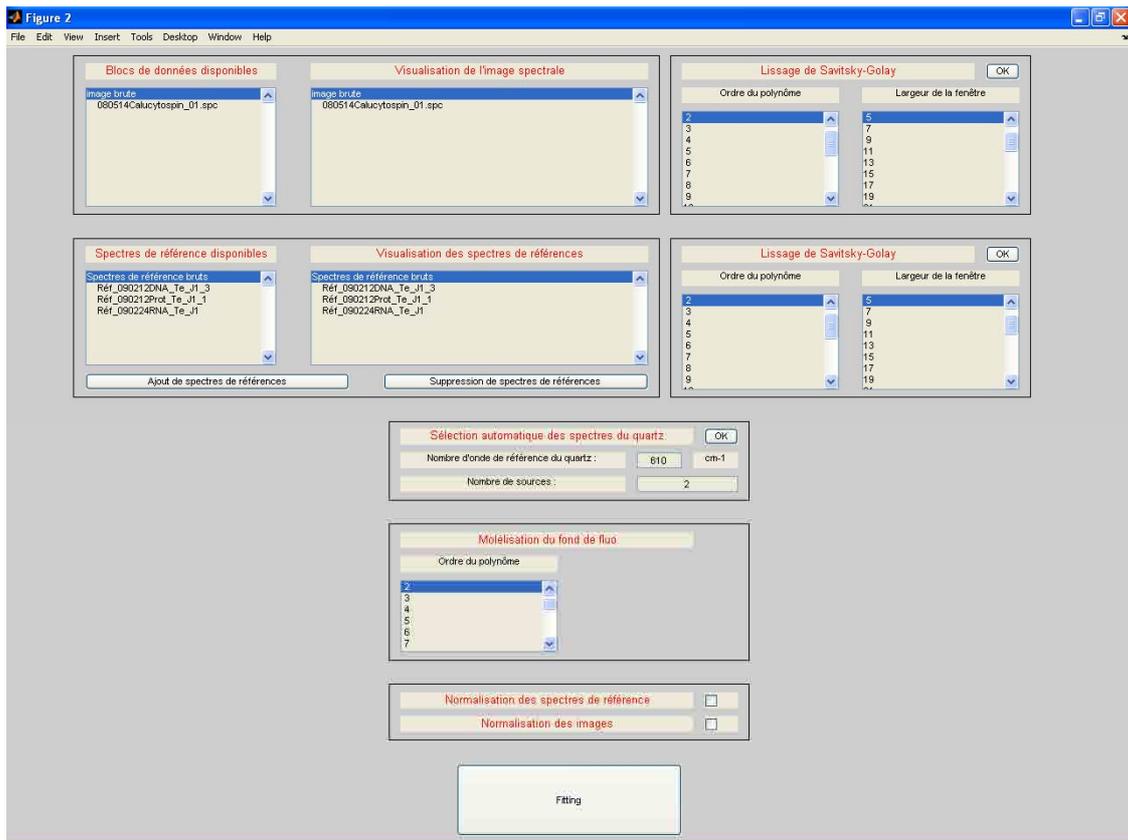


Figure 23 : Interface graphique de pré-traitements et de régression linéaire de spectres de référence sur des images Raman.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

En particulier, un module permettant de télécharger des spectres de référence a été ajouté. L'utilisateur peut donc réaliser la régression avec autant de spectres qu'il le désire et avec n'importe quels spectres. Tout comme dans l'interface de la figure 19, les images spectrales sont corrigées du courant noir et de la lumière blanche, recalées en nombre d'onde, et lissées par un filtre de Savitzky-Golay. Puis ces spectres sont normalisés par un centrage et une réduction (moyenne nulle et écart-type unité).

De plus, les images spectrales étant toujours acquises sur des échantillons déposés sur du quartz, un spectre de référence du quartz doit être estimé à partir de l'image spectrale. Pour cela, la même procédure automatique que celle décrite dans la sous-section précédente est appliquée. Cependant, les spectres de référence du quartz obtenus à la fin de cette procédure sont moyennés ensemble pour ne donner finalement qu'un seul spectre de référence du quartz.

L'utilisateur peut également choisir l'ordre du polynôme qui va être utilisé pour modéliser les variations du fond de fluorescence.

Au final, chaque spectre acquis va être modélisé par une somme linéaire de spectres de référence et de fluorescence pondérés par leur concentration. Ce modèle est similaire à l'équation 8 et s'écrit :

$$I_3 = a_1 I_{R1} + a_2 I_{R2} + \dots + a_N I_{RN} + b_0 + b_1 \Lambda + b_2 \Lambda^2 + \dots + b_p \Lambda^p + e \quad (\text{Équation 13})$$

Où I_{R1} est le spectre de référence du quartz,

I_{R2}, \dots, I_{RN} sont les spectres de référence chargés par l'utilisateur,

a_1, a_2, \dots, a_N sont les concentrations des spectres de référence,

b_0, b_1, \dots, b_p sont les coefficients du polynôme d'ordre P en Λ ,

Λ et e sont identiques à ceux de l'équation 16

Les coefficients a_i et b_j sont estimés par la même méthode de moindres carrés contraints à la non-négativité déjà décrite dans la sous-section précédente. Cette fois-ci, ce sont ces

coefficients qui sont informatifs puisqu'ils représentent la concentration de chaque référence en chaque point d'acquisition. Des images en pseudo-couleur peuvent être reconstruites à partir de chaque coefficient a_i et b_j , et permettent d'étudier la distribution de chaque référence au sein de l'échantillon.

II.6. ANALYSE DES DONNEES SPECTRALES INFRAROUGE

Tout comme les spectres Raman, les spectres IR nécessitent l'application de prétraitements numériques pour corriger les spectres de diverses distorsions et bruits, mais également une analyse par classification hiérarchique pour exploiter les faibles différences spectrales existant entre les diverses structures biologiques des échantillons analysés. Cependant, des logiciels complets ont été développés pour l'analyse d'images spectrales IR, contrairement aux images spectrales Raman. Le plus célèbre est sûrement le logiciel OPUS (Bruker Optik GmbH) qui a été utilisé (version 5.5) en partie dans ce travail pour réaliser le prétraitement des spectres et la classification hiérarchique.

II.6.1. Prétraitements des données spectrales infrarouge

Avant d'appliquer des prétraitements, la gamme spectrale originale s'étalant de 400 à 4000 cm^{-1} a été réduite à la gamme 871 - 4000 cm^{-1} , car la zone 400 - 870 cm^{-1} n'est pas informative des phénomènes étudiés.

Les spectres IR ont ensuite été corrigés de la contribution de la ligne de base en utilisant 64 points et la méthode élastique du logiciel OPUS. Cette méthode considère les minima entre les pics comme des points de la ligne de base. Après soustraction de la ligne de base estimée, ces points ont des intensités forcées à 0.

Approches méthodologiques pour l'analyse cellulaire

Afin d'uniformiser les intensités des spectres et s'affranchir de la variabilité de l'épaisseur de l'échantillon analysé, les spectres sont également normalisés vectoriellement sur toute la gamme spectrale.

Considérons un spectre composé de N intensités enregistrées aux nombres d'onde ν_1, \dots, ν_N :

$$\mathbf{s} = [s(\nu_1), s(\nu_2), \dots, s(\nu_N)] \quad (\text{Équation 14})$$

La normalisation vectorielle appliquée sur ce spectre s'exprime mathématiquement par :

$$s_{norm}(\nu_i) = \frac{s(\nu_i) - \bar{s}}{\sqrt{\sum_{j=1}^N (s(\nu_j) - \bar{s})^2}} \quad (\text{Équation 15})$$

Où $\bar{s} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N s(\nu_k)$ est la moyenne du spectre.

Un spectre vectoriellement normalisé voit donc sa moyenne réduite à 0 et son écart-type à 1. La moyenne des spectres normalisés étant fixée à zéro, la valeur minimale des spectres est négative. Pour faciliter l'interprétation des spectres, il est préférable de ramener leur intensité minimale égale à 0. C'est pourquoi une correction d'offset est utilisée. Pour chaque spectre, sa valeur minimale lui est retranchée de toutes ses intensités comme suit :

$$s_{corroff}(\nu_i) = s_{norm}(\nu_i) - \min(s_{norm}) \quad (\text{Équation 16})$$

Où $\min(s_{norm})$ représente la valeur minimale du spectre normalisé s_{norm} .

Une dérivée seconde avec lissage sur 13 points est appliquée aux spectres IR afin d'augmenter le contraste entre pics voisins tout en éliminant le bruit de mesure amplifié par la dérivée seconde. La méthode de Savitzky-Golay (Savitzky, 1964) a été utilisée pour réaliser cette opération.

II.6.2. Détermination de zones discriminantes

De la même manière que pour les données Raman (paragraphe II.5.4.), un test de Kruskal-Wallis a été appliqué sur les données IR afin de déterminer les régions spectrales discriminantes au sein des données spectrales acquises ($p=0,05$). Ce test a été réalisé sous Matlab, car OPUS ne propose pas cette option.

II.6.3. Analyse par classification hiérarchique

Cette méthode est exactement la même que celle décrite pour les spectres Raman (paragraphe II.5.2.). Une distance euclidienne et la méthode de Ward ont été choisies comme paramètre de cette méthode. Les seules différences par rapport à l'application de cette méthode aux spectres Raman sont que le logiciel OPUS a été utilisé pour réaliser cette étape, et qu'aucun nombre de classes n'a besoin d'être spécifié. De plus, les données infrarouge n'étant constituées que de spectres individuels et non d'images spectrales, le résultat obtenu était donc représenté par un dendrogramme.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. IMAGERIE SPECTRALE DE LA CELLULE VIVANTE ISOLEE PAR MICROSPECTROSCOPIE RAMAN

III.1.1. Préambule

Contexte

La microspectroscopie Raman est une technique qui permet d'analyser les compartiments subcellulaires et fournit une empreinte spectrale unique directement reliée à la composition moléculaire de l'échantillon étudié. Elle peut être non invasive et non destructive selon l'énergie des photons de la longueur d'onde excitatrice. L'état de l'art développé dans la partie "Introduction" met bien en évidence le fait que la majorité des travaux de spectroscopie ont été effectués sur des échantillons séchés ou fixés chimiquement et non à l'échelle de la cellule vivante isolée. Cependant, l'analyse Raman de cellules vivantes est la méthode idéale en spectroscopie biomédicale pour obtenir des informations biochimiques qui reflètent l'état biologique naturel de l'échantillon étudié. Ainsi, dans le cadre d'une étude à l'échelle de la cellule vivante, les conditions d'acquisition des données spectrales Raman ont été déterminées de manière à préserver l'intégrité et les fonctions cellulaires, telles que l'adhésion et les capacités de prolifération.

L'accès à une information moléculaire globale et localisée précisément au sein de la cellule permettrait une meilleure appréciation de processus cellulaires. Dans cette optique, l'imagerie spectrale Raman présente un potentiel non négligeable développé dans la partie "Introduction" de ce travail. Ainsi, de la même façon qu'il est possible de réaliser de l'histopathologie spectrale, on peut aborder l'imagerie de la cellule pour caractériser les événements cellulaires (Zhang, 2008), visualiser la distribution mitochondriale (Matthaus, 2007) ou différencier des lignées cancéreuses et saines à partir de la distribution des protéines (Uzunbajakava, 2003).

Résultats et discussion

Objectifs de l'étude

Dans un premier temps, notre objectif a été de déterminer les paramètres d'acquisition les plus adaptés à l'étude de cellules Calu-1 vivantes et isolées par microspectroscopie Raman. Dans ce but, différents substrats optiques et temps d'acquisition ont été testés afin d'établir les conditions qui permettent aux cellules de rester vivantes, adhérentes et de se diviser. La longueur d'onde excitatrice choisie est un laser à 785 nm afin de préserver la cellule. Ces paramètres fixés, des données spectrales issues de cellules vivantes isolées ont été enregistrées et comparées pour identifier des différences au niveau de la composition biochimique du compartiment cellulaire analysé.

Dans un second temps, des images spectrales de cellules vivantes ont été enregistrées et reconstruites afin mettre en évidence la distribution de ces macromolécules au sein de la cellule.

Résultats

Dans cette étude, nous avons utilisé une approche biophotonique pour étudier des cellules vivantes isolées. Pour cette étude, nous avons utilisé les cellules adhérentes de cancer de poumon non-à-petites cellules, Calu-1.

Le plastique n'étant pas adapté à la spectroscopie Raman, la première étape était de sélectionner un substrat optique qui permette les mesures spectrales dans des conditions n'altérant ni la morphologie, ni la croissance cellulaire. La figure 1 qui présente la morphologie des cellules Calu-1 en croissance sur plastique, quartz, CaF₂ et ZnSe, met en évidence une morphologie bipolaire classique conservée sur les substrats optiques de quartz et de CaF₂. Cette morphologie est également conservée sur le ZnSe, mais dans une moindre mesure, car on relève moins de 15% des cellules étalées sur ZnSe contre 95 à 100% sur plastique, quartz ou CaF₂. L'effet de ces substrats optiques sur la croissance cellulaire a ensuite été évalué par un test au BrdU. La figure 2 montre que le pourcentage de cellules en prolifération sur plastique, quartz et CaF₂ est respectivement de 55%, 47% et 35%. Ces résultats démontrent que le substrat optique se rapprochant le plus du plastique et respectant le mieux l'intégrité cellulaire est le quartz.

Différents temps d'acquisition des mesures spectrales ont également été testés et ont révélé que 2 accumulations de 10 secondes était le meilleur compromis entre survie

Résultats et discussion

cellulaire et rapport signal/bruit. Le quartz et le CaF₂ ont été testés pour l'analyse Raman sur cellules vivantes. Les résultats présentés dans la figure 3 montrent qu'il est possible d'enregistrer des informations spectrales sur les deux supports et que ceux-ci induisent peu d'interférence dans le signal enregistré.

En prenant en compte les résultats obtenus pour la qualité de l'information spectrale, mais aussi pour la croissance et la morphologie cellulaire, le quartz apparaît comme le substrat optique le plus approprié pour l'étude de cellules vivantes isolées par microspectroscopie Raman.

Une fois les paramètres d'acquisition fixés, des spectres Raman ont été enregistrés à partir du noyau et du cytoplasme de ces cellules et ont révélé des différences pouvant être attribuées aux bases nucléiques, aux lipides et aux protéines (figure 4). Il a été possible d'évaluer la contribution des acides nucléiques dans le spectre issu du noyau et d'établir, par comparaison à un spectre d'ADN de thymus de veau, la présence d'ADN de type B à partir de plusieurs informations spectrales caractéristiques ($I_{670}/I_{680} < 1$, bande intense à 750 cm^{-1} , présence des pics à 834 cm^{-1} et à 1094 cm^{-1}) (figure 5). Etant donné que les macromolécules majeures constituant le cytoplasme, et particulièrement les réseaux membranaires et organelles, sont les lipides, leur contribution dans le spectre de cytoplasme a été considérée et comparée à un spectre de phospholipide, la phosphatidylcholine (figure 6). Concernant les protéines, aucune attribution à une région cellulaire particulière n'a pu être effectuée, les protéines étant réparties dans tous les compartiments cellulaires.

En prenant en considération toutes ces différences, une analyse en cluster a été effectuée de manière à discriminer les spectres issus des deux compartiments cellulaires étudiés, le noyau et le cytoplasme. La classification hiérarchique ascendante représentée dans la figure 7 confirme bien que les différences observées entre les deux groupes de données sont suffisamment discriminantes pour les différencier.

La microspectroscopie Raman permet donc de détecter et d'identifier, à l'échelle de la cellule vivante isolée, les composants moléculaires spécifiques tels que les acides nucléiques, les lipides et les protéines.

Résultats et discussion

De plus, l'image spectrale Raman d'une cellule vivante isolée a été reconstruite et a permis de mettre en évidence la distribution de ces composants moléculaires (figure 8). La figure 8a montre l'image visible de la cellule Calu-1 en croissance sur un support en quartz après acquisition de l'image spectrale. L'image spectrale brute (figure 8b) inclut les contributions spectrales issues de la cellule, mais aussi du substrat optique et du milieu. Ainsi, chaque pixel a été prétraité pour s'affranchir de ces contributions. Ensuite, une analyse en cluster à 5 classes par les K-means a été appliquée à chaque spectre. L'image spectrale a ensuite été reconstruite sur base de ces classes (figure 8c). Une distinction claire entre noyau et cytoplasme est visible, notamment par des pixels d'une couleur différente (brun) correspondant à une autre classe spectrale, pouvant être reliée à la zone périnuléaire.

Enfin, de manière à mettre en évidence la distribution des acides nucléiques, lipides et protéines au sein de la cellule, l'image spectrale a été reconstruite sur la base des modèles identifiés précédemment. Les résultats présentés en figures 8d à f corroborent la présence de ces molécules au sein de la cellule : les acides nucléiques dans le noyau lui-même délimité par une autre classe de pixel, les lipides majoritairement localisés dans le cytoplasme et les protéines attribuées à aucune région cellulaire spécifique.

Conclusion

Cette étude démontre la faisabilité d'analyser avec une résolution micrométrique les compartiments de cellules cancéreuses vivantes isolées par microspectroscopie Raman. L'imagerie spectrale Raman à l'échelle de la cellule vivante isolée présente un réel potentiel pour cibler des processus cellulaires tels que l'apoptose, la croissance, la différenciation cellulaire ou évaluer l'interaction cellule/médicament. Cette approche biophotonique de la cellule vivante isolée s'avère intéressante pour des situations cliniques où très peu de cellules sont disponibles pour l'examen cytologique.

En prenant en compte la réponse de cellules issues du patient, un traitement personnalisé pourra être envisagé avec tous les bénéfices possibles pour le patient.

III.1.2. Draux et al. Analyst 2009

PAPER

www.rsc.org/analyst | Analyst

Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary studyFlorence Draux,^a Pierre Jeannesson,^a Abdelilah Beljebbar,^a Ali Tfayli,^a Nicolas Fourre,^a Michel Manfait,^a Josep Sulé-Suso^b and Ganesh D. Sockalingum^{*a}

Received 22nd July 2008, Accepted 10th November 2008

First published as an Advance Article on the web 2nd December 2008

DOI: 10.1039/b812610k

Raman microspectroscopy allows probing subcellular compartments and provides a unique spectral fingerprint indicative of endogenous molecular composition. Although several spectroscopic cell studies have been reported on fixed samples, only few attempts concern single growing cells. Here, we have tested different optical substrates that would best preserve cell integrity and allow direct measurement of Raman spectra at the single living cell level. Calu-1 lung cancer cells were used as a model and their morphology and growth were assessed on Raman substrates like quartz, calcium fluoride, and zinc selenide. Data show that quartz was the most appropriate taking into consideration both cell morphology and proliferation rate (47% on quartz vs. 55% of BrdU-positive cells on conventional plastic). Using quartz, 40 cells were analysed and Raman spectra were collected from nuclei and cytoplasm using a 785 nm laser excitation of 30 mW at the sample, in the spectral range of 580–1750 cm⁻¹, and an acquisition time of 2 × 10 sec/spectrum. Discriminant spectral information related to nucleus and cytoplasm were extracted by multivariate statistical methods and attributed to nucleic acids, lipids, and proteins. Finally, Raman spectral imaging was performed to show the distribution of these components within the cell.

^aUnité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6237, UFR de Pharmacie, IFR53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France. E-mail: ganesh.sockalingum@univ-reims.fr; Fax: +33 326913550; Tel: +33 326913553

^bStaffordshire Oncology Centre, University Hospital of North Staffordshire and Keele University, Stoke on Trent, UK

Introduction

Vibrational spectroscopy provides molecular level information on the investigated sample and can be widely used for qualitative and quantitative analytical studies. It has emerged as an analytical tool for the biochemical characterization of biological systems due to several advantages such as being non-invasive, non-destructive, and can provide high spatially resolved images without the use of dyes or molecular probes. It requires minimal sample preparation and is sensitive to structural and conformational changes. Raman spectroscopy is one such technique and it measures the inelastic low energy light scattering that is emitted when an incident monochromatic light interacts with the sample. The change in energy correlates with the excitation of a vibrational mode in the molecule, or a part of a molecule, vibrate. Thus, a Raman spectrum represents a chemical fingerprint of the molecular composition of the sample. This spectroscopy presents several advantages over its counterpart Fourier Transform InfraRed (FT-IR) spectroscopy. Firstly, water has only a weak Raman spectrum, therefore, many functional groups can be observed in aqueous media and spectral information can be recorded from living systems. Secondly, in the case of biological samples, Raman spectra often exhibit a number of rather sharp bands, whereas infrared spectra of cells and tissue often show broader spectral features. Thirdly, Raman microscopy offers a higher spatial resolution (~4-5 microns) that cannot be reached even by using synchrotron IR sources¹. In addition, synchrotron based IR measurements on single cells require cell drying and often encounters the problem of Mie scattering that affects the baselines of FT-IR spectra². The optical and/or physical effects encountered in FT-IR spectra are circumvented in the Raman approach. Raman spectroscopy has been mostly used on formalin fixed, paraffin embedded or cryopreserved tissue sections from biopsies for cancer diagnosis³⁻⁸. Fixed or living cell populations were studied for cancer diagnosis^{9, 10}, for detection of multidrug resistance¹¹ or for the response to antitumor agent¹². Single cells studies were also made on fixed or living cells for cancer diagnosis¹³, for the study of the distribution of several components inside the cell¹⁴, for the cell response to antitumor agents^{15, 16}, or for distinguishing different stages of the cell cycle^{17, 18}. Finally, several works have reported Raman mapping on single fixed cells¹⁹⁻²¹.

The aims of this preliminary work were to apply micro-Raman spectroscopy as a non-invasive and non-destructive tool for probing single living lung cancer cells while preserving cell integrity and functions, such as adhesion and proliferating capacities. Therefore, we have first determined the best conditions to study living Calu-1 cells with Raman microspectroscopy by testing different optical substrates and accumulation times. Using this single living cell approach, we have attempted to highlight the differences in the biochemical and molecular composition between the cytoplasmic and nuclear cell compartments. Spectral data were compared in order to identify spectral signatures of main macromolecules such as nucleic acids, lipids, and proteins. Based on these signatures, Raman maps of a single living cancer cell were produced using multivariate statistical approaches. We believe that Raman spectral imaging at the single living cell level represents a potential avenue for probing cellular processes such as apoptosis, cell growth and differentiation or drug-cell interactions. It is therefore essential to have access to a more localised subcellular than bulk molecular information for a better and direct appraisal of such processes.

Experimental

Cell line

The non-small cell lung cancer cell line (Calu-1) was purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and cultured in Minimum essential Medium with Earle salts and Glutamax I (MEM; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum, 1% sodium pyruvate, 1% on essential amino-acids and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen) according to the provider's instructions. Culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. Cells were routinely passaged before reaching confluence using 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen) and screened for the presence of mycoplasma using PCR methods.

Optical substrates

Plastic Petri dishes were used as control (\varnothing 35 mm; Dutscher, Brumath, France). The Raman optical substrates were quartz (\varnothing 22 mm x 1.25 mm; Hellma, Paris, France), calcium fluoride (CaF_2) (\varnothing 25 mm x 2 mm; Crystan LTD, Poole, UK) and zinc selenide (ZnSe) (\varnothing 13 mm x 1 mm; Crystal GmbH, Berlin, Germany).

Morphological analysis

Calu-1 cells were plated on the different substrates at 25×10^3 cells/ml. They were allowed to adhere to substrates for 24 h at 37°C . Then, cell morphology was analysed using an Axiovert 200M microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 20X objective. The microscope was driven by the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France) and images were recorded with a charge-coupled device camera (CoolsnapHQ, Roper Scientific). It was also possible to score the number of cells that were still rounded and the number that have spread and flattened on the different tested optical substrates.

Cell proliferation

Cell proliferation was studied using a BrdU assay (Invitrogen). Calu-1 cells were plated on the different substrates at 50×10^3 cells/ml and were allowed to adhere for 24 h at 37°C . Then, cells were incubated for 1 h with $10 \mu\text{M}$ of BrdU. They were fixed for 20 min with iced ethanol 70% and denatured for 20 min with a buffer (HCl 2M + 0.5% Triton X-100). The acid residues were then neutralized with a 0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ solution at pH 8.5 for 2 min. Finally, the anti-BrdU antibody was added for 20 min. The results are expressed as BrdU – positive cells using an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss). The microscope was driven by the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France) and images were recorded with a charge-coupled device camera (CoolsnapHQ, Roper Scientific).

Raman microspectrometer

Raman spectral acquisitions were performed with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille, France). The excitation source was a diode laser (Toptica Photonics,

Résultats et discussion

Germany) generating 300 mW single mode line at 785 nm. The microspectrometer was equipped with an Olympus microscope and all measurements were recorded using a 100X water immersion objective (Olympus LUMPLFL100XW, NA = 1, Japan). The nominal spot size at the sample was assessed to 4 μm and the power of the laser beam focused on the sample was ~ 30 mW. Light scattered by the cell was collected through the same objective. Rayleigh elastic scattering was rejected by a Notch filter which reduces its intensity by a factor of 10^6 . A confocal pinhole rejects signals from out-of-focus regions of the sample. A multichannel CCD device (1024 x 256 pixels) was used to detect the Raman Stokes signal dispersed with a 4 cm^{-1} spectral resolution by a holographic grating.

Raman reference spectra of DNA and lipids

These reference spectra were obtained from solutions of calf thymus DNA (4.4 mg/ml in 10^{-2} M NaClO_4 , pH 6.9) and phosphatidylcholine (99%) deposited on a quartz slide and dried. Both reference compounds were purchased from Sigma, St Quentin Fallavier, France.

Acquisition of Raman spectra from single living cancer cells

Raman spectra of single living Calu-1 cells in exponential phase growth were measured from different optical substrates (ZnSe , CaF_2 , quartz) seeded at 50×10^3 cells/ml and incubated overnight at 37°C to allow cell attachment. Prior to Raman measurements, the substrates were washed and immersed in a Petri dish containing saline at 20°C . Two spectra were acquired per cell, one from the nucleus and one from the cytoplasm. Micro-Raman spectra were recorded in the 580 to 1750 cm^{-1} range. Different acquisition times were tested: 2 accumulations of 1, 2, 5, 10, 15, 20 and 30 seconds. The confocal pinhole was adjusted at $150\text{ }\mu\text{m}$. For Raman spectral imaging, isolated single cells were raster-scanned with a $2\text{ }\mu\text{m}$ step and an acquisition time of 2×10 sec for each point. All spectral acquisitions were carried out using the Labspec 4.18 software (Horiba Jobin Yvon).

Data pre-processing and image analysis

Spectral pre-processing and analysis were performed using homemade software that operates in the Matlab environment (The Mathworks, Inc., Natick, Massachusetts). In order to reduce the influence of the instrument response, Raman spectra were first corrected for dark current, detector response, and the contribution from the substrate and/or the culture medium. Secondly, all pixel spectra were baseline corrected using an automatic polynomial function and vector normalised on the whole spectral range.

Before calculating the difference spectra, the mean spectra corresponding to cell compartments were vector-normalized. A multiplicative factor of 0.8 was used so that the differences appear as positive peaks.

Hierarchical cluster analysis (HCA)²² was used to classify spectral data. HCA aims at clustering the data according to their degree of similarity and is based on the calculation of the Euclidean distance between spectra. The entire spectral window (580-1750 cm^{-1}) was used and the outcome is visualized as a dendrogram regrouping the spectra in clusters according to a heterogeneity scale.

Results and discussion

Raman spectroscopy has emerged as a non-destructive analytical tool for the biochemical characterization of biological systems. The combination of spatial resolution and chemical information content provides, via the use of chemometric methods, label-free high fidelity spectral images indicative of endogenous molecular composition. In this study we aim at using this biophotonic approach to investigate single living cells and to acquire and compare Raman spectra from nuclear and cytoplasmic regions. Since plastic, the conventional culture substrate, is not appropriate for Raman spectroscopy, the first step was to select the optical substrate that allows Raman spectral measurements in physiological conditions without altering cellular morphology and growth. To this end, we used the human lung cancer cell line Calu-1 as a cellular model. As shown in figure 1, Calu-1 cells grown on plastic, adopt the classical bipolar shape (white arrows) often observed with epithelial cancer cells in culture. This morphology was conserved with quartz and CaF_2 , but to a lesser extent with ZnSe substrate, indicating a weak cell

Résultats et discussion

adherence on this substrate: less than 15% of spread cells with ZnSe versus 95 to 100% with plastic, quartz or CaF₂.

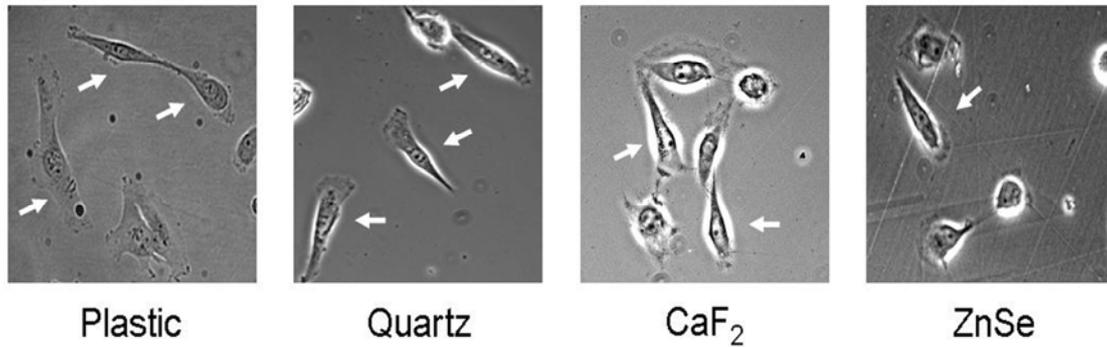


Figure 1: Effect of Raman optical substrates on Calu-1 cell morphology. Cells were seeded at 25×10^3 cells/ml, incubated overnight at 37°C, and cell morphology assessed on plastic (control) and conventional Raman optical substrates (quartz, CaF₂ and ZnSe). White arrows show well spreaded cells with classical bipolar shape.

Then, the effect of these optical substrates on cell growth was investigated using the BrdU assay that evaluates the cells passing the S-phase of the mitosis²³. Figure 2 shows that the percentage of proliferating cells on plastic, quartz, and CaF₂ is respectively 55%, 47% and 35%. Taken together, these results demonstrate that the optical substrate which best respects cell integrity is quartz, as it preserves both cell morphology and proliferation. This observation is crucial for Raman measurements on isolated living cells.

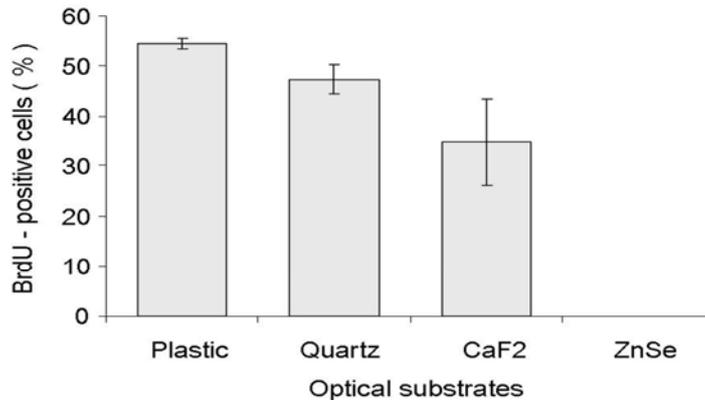


Figure 2: Effect of Raman optical substrates on Calu-1 cell proliferation. Cells were seeded at 25×10^3 cells/ml, incubated overnight at 37°C, and proliferating cells were evaluated on plastic (control) and conventional Raman substrates using the BrdU assay.

In order to avoid laser cell damages, it is also important to consider the spectral measurement times. Thus, several acquisition times were tested (1, 2, 5, 10, 15, 20 and 30 sec) at a constant laser power of 30 mW at the sample. We found that 2 accumulations of 10 sec were the best for both cell survival and signal to noise ratio (data not shown). Indeed, cell viability was not affected and this was verified by the Trypan blue exclusion test performed just after point measurements or spectral image acquisition.

Then, quartz and CaF₂ substrates were tested for Raman analysis. ZnSe and plastic Petri dishes were discarded since ZnSe is quite toxic to cells and plastic has a very high Raman signal that masks the entire cell spectrum (data not shown). Data in figure 3a show that it was possible to record spectra from the nucleus of single living cells on both substrates. Raman signal was comparable for both tested substrates, in terms of signal/noise ratio and the quality of the spectral information. This is confirmed using HCA where spectra are grouped according to their degree of similarity. Figure 3b shows that there is no distinct separation between the two sets of single cell spectra recorded on quartz and CaF₂. These results indicate that there is no interference from either substrate. Thus, it was possible to remove the Raman contribution of both optical substrates and to retrieve the pure signal of the single cancer cell. Quartz and CaF₂ substrates gave detailed and high quality spectra and can be considered as equally adequate for Raman measurements. However, taking into account that quartz substrate does not perturb cell growth and

morphology, it appears as the most appropriate substrate for the study of single living cells with Raman microspectroscopy. Henceforth, for all our measurements, the experimental conditions were: 30 mW of laser power ($\lambda = 785$ nm), 2 times 10 sec of acquisition time and spectral range $580 - 1750$ cm^{-1} .

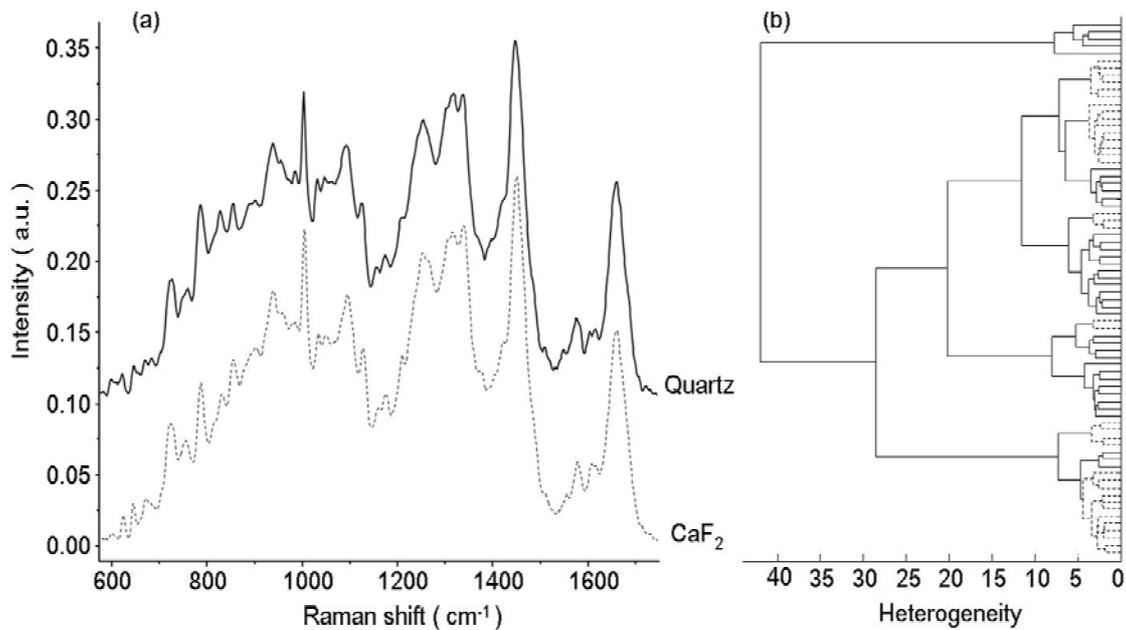


Figure 3: Raman spectra of single living Calu-1 cells growing on quartz and CaF_2 substrates. Cells were seeded at 25×10^3 cells/ml and incubated overnight at 37°C . (a) Mean Raman spectra of individual cell nuclei and (b) Dendrogram obtained by hierarchical cluster analysis of Raman spectra of Calu-1 cells acquired on quartz (full line) and CaF_2 (dotted line) ($n=17$ cells/substrate). This tree-like diagram allows visualising the interspectral distances. Experimental conditions: acquisition time of 2×10 sec per spectrum, laser power of 30 mW at sample.

In a second step, we have recorded and compared spectra from the nucleus and the cytoplasm of 17 individual living Calu-1 cells. The mean spectra are shown in figure 4 where several spectral differences can be observed. First of all, the differences that could be attributed to the nucleic acid bases (full vertical lines in figure 4): 786 cm^{-1} (C and T), 1255 cm^{-1} (A), 1322 cm^{-1} (G), 1342 and 1580 cm^{-1} (A and G), but also to their sugar-phosphate backbone (1098 cm^{-1}). Our assignments have been performed using previously reported data on cell populations¹⁰, single fixed cells²¹, single living cells^{13, 15, 18}, tissues⁴, and synthetic or isolated biomolecules^{24, 25}.

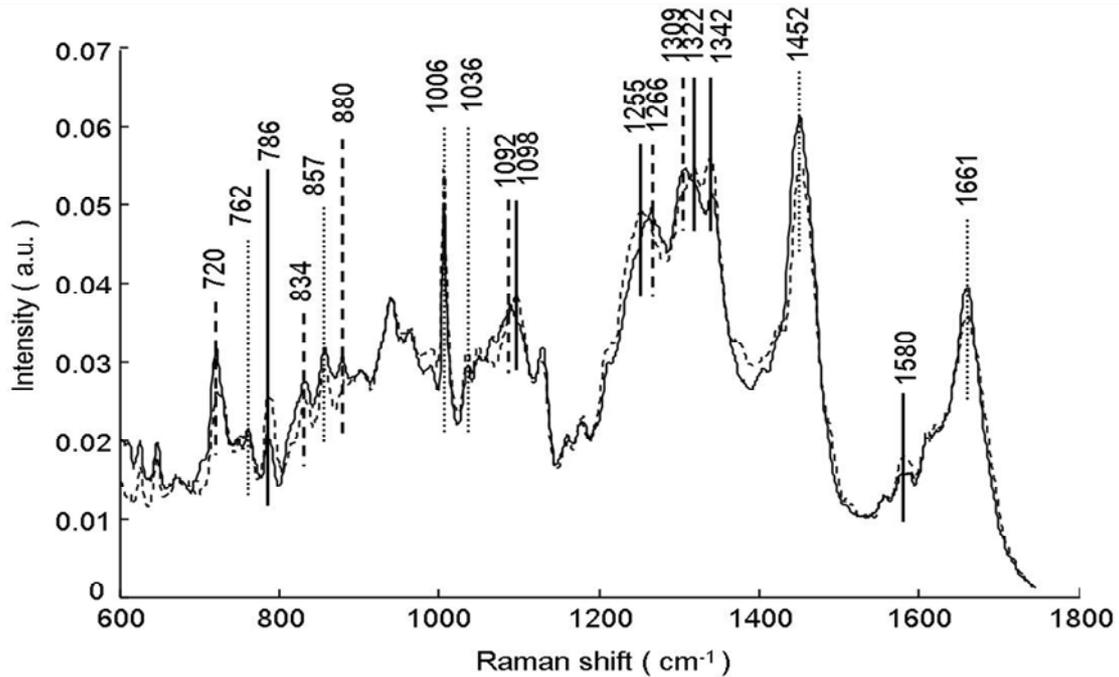


Figure 4: Comparison of Raman spectra from the nucleus and cytoplasm of single living Calu-1 cells growing on quartz substrate. Mean Raman spectra of nucleus (dashed graph) and cytoplasm (full graph) of Calu-1 cells ($n=17$ cells). The full, dashed, and dotted peak-picking vertical lines are respectively assigned to nucleic acid, lipid, and protein bands. Experimental conditions were the same as for figure 3.

When a spectrum is acquired from the region of the nucleus, we obviously also collect some information originating from the surrounding cytoplasmic region. We therefore subtracted a representative cytoplasmic spectrum (taken from a region which was far from the nucleus) from that obtained from the region of the nucleus. This procedure allowed us to better appraise the nucleic acid contribution of the nucleus as confirmed by the comparison with the spectrum from calf thymus DNA (Fig. 5). By doing so, the spectral information related to nuclear protein content is not necessarily lost. Indeed, the difference spectrum still exhibits proteins bands (e.g. Phe at 1006 cm^{-1}). The same bands as in figure 4 are shown, but the result also reveals additional bands due to nucleic acid bases: 667 cm^{-1} (G and T), 682 cm^{-1} (G), 728 cm^{-1} (A), 750 cm^{-1} (T), 1375 cm^{-1} (A, T, G, C), 1486 cm^{-1} (G and T), but also to their sugar-phosphate backbone (834 cm^{-1}). Calf thymus DNA exhibits a rather A-type conformation with a ratio $I_{670}/I_{680} > 1$, a very weak intensity of the 750 cm^{-1} , a shoulder at 805 cm^{-1} , and a phosphodioxo band at 1101 cm^{-1} . It is well known that below 75 % of relative humidity, DNA adopts an A-type conformation, and

for the spectrum acquisition, the calf thymus DNA sample was dried. However, our data on single living cells are in favor of a B-type conformation since the spectrum of the contribution of nucleic acids exhibits the following: the ratio $I_{670}/I_{680} < 1$, higher intensity of the 750 cm^{-1} band, a phosphodiester band at 834 cm^{-1} and a phosphodioxy band at 1094 cm^{-1} as reported by Thomas et al. ²⁷.

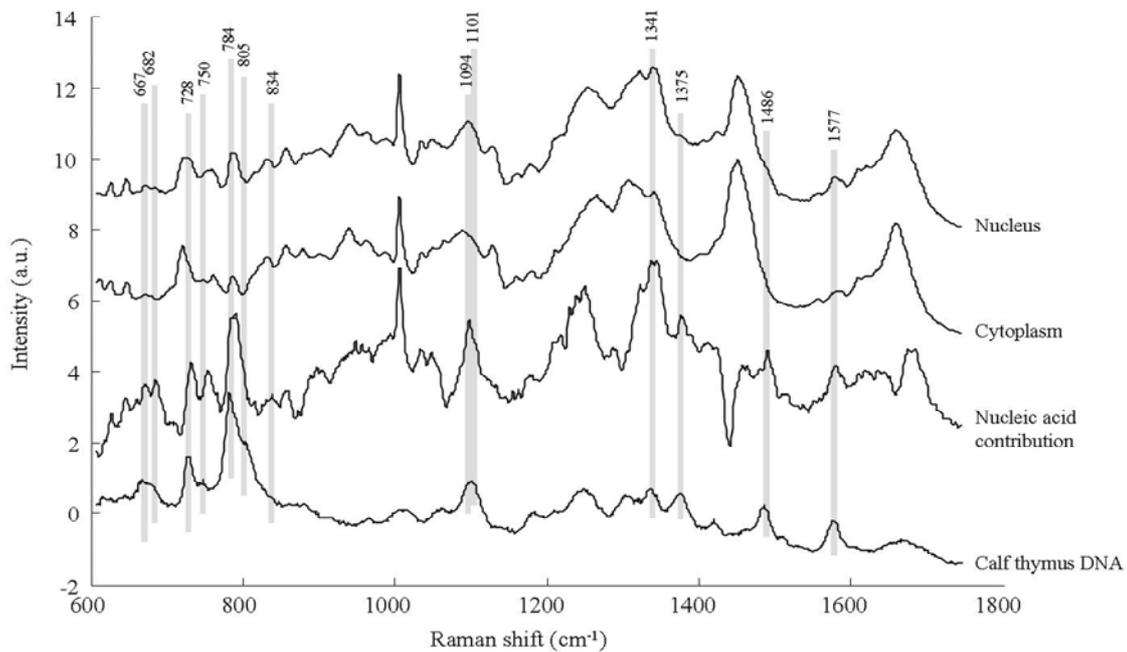


Figure 5: Assignment of nucleic acids Raman spectral information from the nucleus of single living Calu-1 cells. The difference spectrum (nucleus minus cytoplasm) was compared with spectra from calf thymus DNA (bottom), nucleus (top) and cytoplasm. The vertical lines show peaks assigned to nucleic acid bases and sugar-phosphate backbone as described in the Results and discussion section. Experimental conditions were the same as for figure 3.

Secondly, since lipids form part of the major macromolecules constituting the cytoplasm especially in the membrane network and organelles, their contribution to the cytoplasm spectrum has been considered. They exhibit peaks at $720, 834, 880, 1092, 1266,$ and 1309 cm^{-1} as shown by the dashed vertical lines in figure 4. However, in order to better appraise additional lipid bands which are masked by the protein contribution, the latter signal has to be subtracted. Therefore, it was necessary to obtain a representative cellular protein spectrum. To do so, we used the nucleus signal because it contains both spectral

Résultats et discussion

contribution from nucleic acids and from proteins^{20, 28}. The first step consisted of retrieving the protein signal from the nucleus spectrum by subtracting the DNA signal from it. In a second step, the lipid contribution in the cytoplasm spectrum was obtained by subtracting the protein contribution (isolated from the nucleus spectrum) from the cytoplasm spectrum. Figure 6 compares the lipid cellular contribution in the cytoplasm spectrum to that of a reference compound, phosphatidylcholine, showing common bands for example at 720, 878, 969, 1068, 1081, 1267, 1302, 1443, and 1660 cm^{-1} . Finally, the remaining attributions (dotted vertical lines in Figure 4) concern protein contribution without assignment to a particular cellular region. For example, the spectral vibrations can be assigned to Phe (1006 and 1036 cm^{-1}), aliphatic amino acids (1452 cm^{-1}), Trp (762 cm^{-1}), and Tyr (857 cm^{-1}).

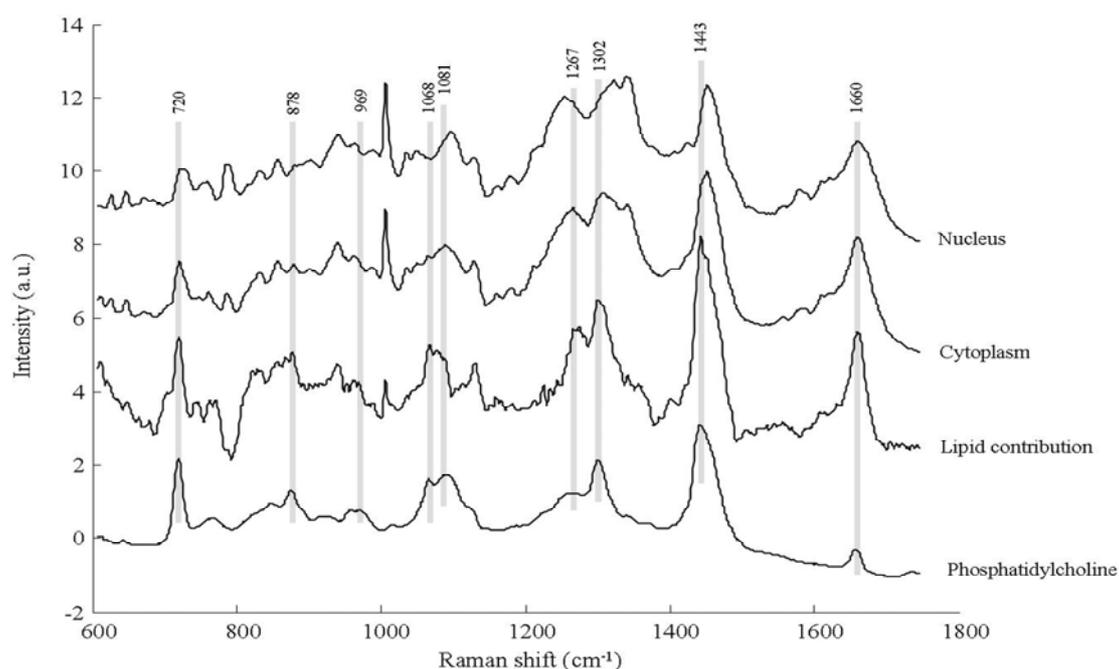


Figure 6: Assignment of lipid Raman spectral information from the cytoplasm of single living Calu-1 cells. The lipid contribution in the cytoplasm spectrum (top) was obtained by removing the protein contribution from the cytoplasm spectrum. This protein contribution was calculated from the nucleus spectrum by subtracting from it the contribution of nucleic acids. The result was compared with spectra from phosphatidylcholine (bottom), nucleus and cytoplasm. The vertical lines show major peaks specific to lipid contributions as described in the results and discussion section. Experimental conditions were the same as for figure 3.

Résultats et discussion

Taking into account all these observed differences; we have performed a cluster analysis on the whole spectral window (780-1750 cm^{-1}) in order to discriminate spectra from the two cellular compartments. Each of the 17 cells was represented by a spectrum from its nucleus and its cytoplasm. The dendrogram shown in figure 7 confirms that the differences between nuclear and cytoplasmic spectral information are discriminant enough to differentiate the two sets of data. All these results show that Raman microspectroscopy enables to detect and identify, at the single living cell level, specific molecular components such as nucleic acids, lipids, and proteins.

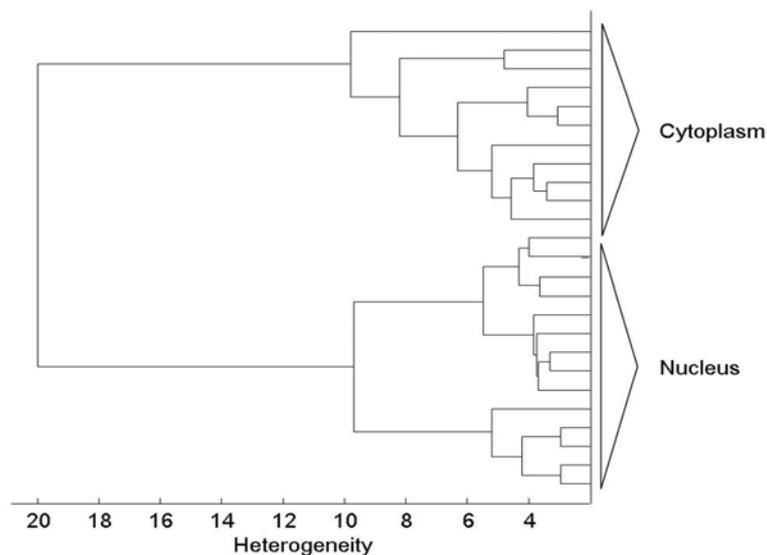


Figure 7: Discrimination, at the single living cell level, between Raman spectral information originating from the nucleus and the cytoplasm of Calu-1 cells. Dendrogram obtained by hierarchical cluster analysis on the whole spectral window (580-1750 cm^{-1}) of Raman spectra from cell nuclei (n=14) and cytoplasm (n=11). Experimental conditions were the same as for figure 3.

Finally, Raman spectral imaging of a single living cell was performed with the aim to show the cellular distribution of these specific components. Spectral imaging allows combining both spatial and molecular information and has been widely used for tissue disease diagnosis³⁻⁸. On the basis of the spectral models identified above from the spectral differences between nucleus and cytoplasm, we reconstructed spectral images which highlight the nuclear and cytoplasmic information. Figure 8a and g present the visible image of a single living Calu-1 cell growing on quartz respectively before and

after the spectral acquisition. The raw spectral image shown in Figure 8b includes spectral contributions from the cell as well as from the optical substrate and the medium. Each pixel spectrum was pre-processed to remove contributions from the substrate and the medium (see Materials and methods). Then, all spectra were subjected to a K-means clustering which gave 5 different classes of spectra, each assigned to a different colour. The spectral image was then reconstructed on the basis of these classes as shown in Figure 8c. It now shows a clearer distinction between the nucleus and the cytoplasm; these two compartments being separated by pixels of a different colour (brown) corresponding to another spectral class. The brown pixels could be related to the perinuclear zone which is known to contain an extended and dense membrane network (endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, ...). In order to show the intracellular distribution of nucleic acids, lipids, and proteins, a reconstruction of the spectral image was computed on the basis of the models identified previously (figures 5 and 6). The results displayed in figure 8d-f corroborate well with the occurrence of these biomolecules inside the cell: nucleic acids inside the nucleus which is delimited by a class of pixels with the same distribution as observed by K-means clustering in figure 8c, lipids which are mainly localised in the cytoplasm, and proteins not assigned to a specific cellular region.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrates the feasibility of probing compartments of single living cancer cells using micro-Raman spectroscopy. Indicative of the chemical composition of the sample, this approach is label-free, non-destructive, and requires minimal sample preparation. Raman spectral imaging at the single living cell level represents a potential avenue for probing cellular processes such as apoptosis, cell growth and differentiation or drug-cell interactions. Indeed experiments are ongoing to apply micro-Raman spectroscopy to investigate drug-cell interactions and cellular events like apoptosis. The effect of an anticancer agent, commonly used in lung cancer treatment, will be tested not only on cultured lung cancer cells but also on cells from patients. This pharmacological approach on single living cells can be of great interest to rapidly

evaluate patient cell response to a chemotherapeutic treatment.

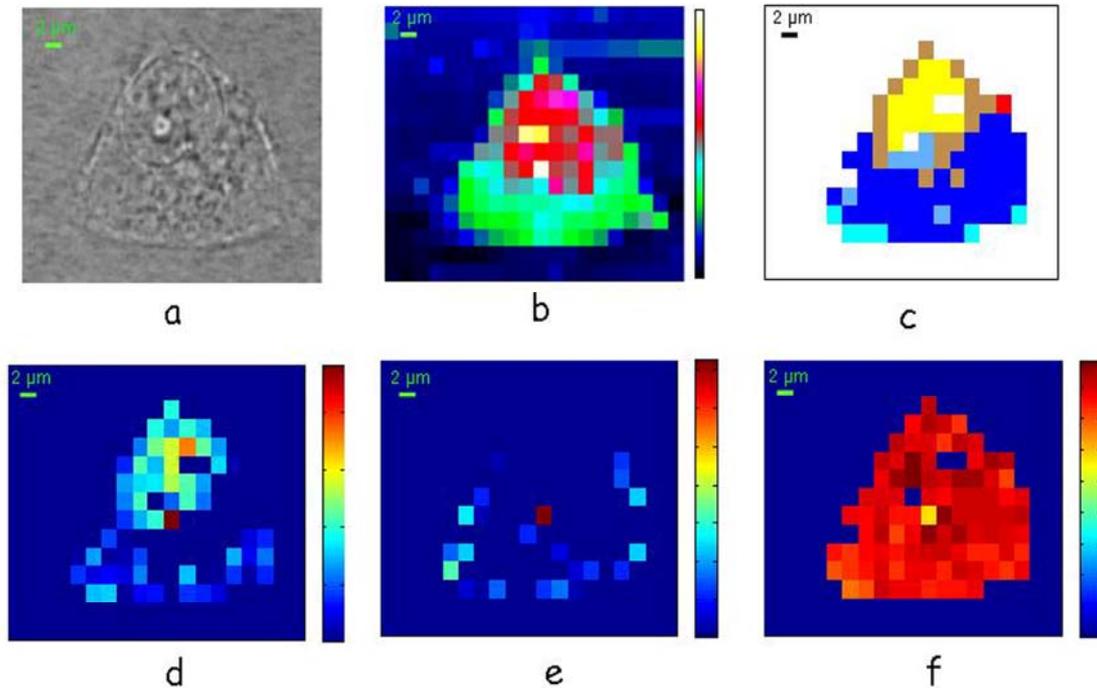


Figure 8: Raman spectral imaging of a single living Calu-1 cell. The isolated single cell was raster-scanned with a $2\mu\text{m}$ step and at each point a spectrum was acquired for 2×10 sec. (a) visible image showing cell before spectral acquisition; (b) raw Raman spectral image based on total intensity; (c) K-means clustering of the processed spectral image. Reconstruction of spectral images showing cellular distribution of d) nucleic acids, e) phosphatidylcholine, and f) proteins. g) visible image showing cell after spectral acquisition

Acknowledgements

This work was supported by Ligue contre le Cancer, Comité de la Marne, Maxime Hanss Prize, BBSRC-Alliance Française, 2006. FD is a recipient of doctoral fellowship from Région Champagne-Ardenne.

References

- 1 P. Dumas, G. D. Sockalingum and J. Sule-Suso, 'Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications?' Trends Biotechnol, 2007, 25, 40-4.
- 2 A. Kohler, J. Sule-Suso, G. D. Sockalingum, M. Tobin, F. Bahrami, Y. Yang, J. Pijanka, P. Dumas, M. Cotte, D. G. van Pittius, G. Parkes and H. Martens, 'Estimating and Correcting Mie Scattering in Synchrotron-Based Microscopic Fourier Transform Infrared Spectra by Extended Multiplicative Signal Correction', Appl Spectrosc, 2008, 62, 259-66.
- 3 R. A. Bitar, S. Martinho Hda, C. J. Tierra-Criollo, L. N. Zambelli Ramalho, M. M. Netto and A. A. Martin, 'Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy', J Biomed Opt, 2006, 11, 054001.
- 4 Z. Huang, A. McWilliams, H. Lui, D. I. McLean, S. Lam and H. Zeng, 'Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer', Int J Cancer, 2003, 107, 1047-52.
- 5 S. Koljenovic, T. C. Bakker Schut, J. P. van Meerbeeck, A. P. Maat, S. A. Burgers, P. E. Zondervan, J. M. Kros and G. J. Puppels, 'Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue', J Biomed Opt, 2004, 9, 1187-97.
- 6 A. P. Oliveira, R. A. Bitar, L. Silveira, R. A. Zangaro and A. A. Martin, 'Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis', Photomed Laser Surg, 2006, 24, 348-53.
- 7 G. Shetty, C. Kendall, N. Shepherd, N. Stone and H. Barr, 'Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus', Br J Cancer, 2006, 94, 1460-4.
- 8 M. A. Short, H. Lui, D. McLean, H. Zeng, A. Alajlan and X. K. Chen, 'Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy', J Biomed Opt, 2006, 11, 34004.
- 9 J. R. Mourant, K. W. Short, S. Carpenter, N. Kunapareddy, L. Coburn, T. M. Powers and J. P. Freyer, 'Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman and infrared spectroscopy', J Biomed Opt, 2005, 10, 031106.

- 10 A. Taleb, J. Diamond, J. J. McGarvey, J. R. Beattie, C. Toland and P. W. Hamilton, 'Raman microscopy for the chemometric analysis of tumor cells', J Phys Chem B, 2006, 110, 19625-31.
- 11 C. M. Krishna, G. Kegelaer, I. Adt, S. Rubin, V. B. Kartha, M. Manfait and G. D. Sockalingum, 'Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines', Biopolymers, 2006, 82, 462-70.
- 12 P. Jeannesson, M. Manfait and J. C. Jardillier, 'A technique for laser Raman spectroscopic studies of isolated cell populations', Anal Biochem, 1983, 129, 305-9.
- 13 C. Yu, E. Gestl, K. Eckert, D. Allara and J. Irudayaraj, 'Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy', Cancer Detect Prev, 2006, 30, 515-22.
- 14 J. Ling, S. D. Weitman, M. A. Miller, R. V. Moore and A. C. Bovik, 'Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of a drug', Appl Opt, 2002, 41, 6006-17.
- 15 I. Notingher, J. Selvakumaran and L. L. Hench, 'New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells', Biosens Bioelectron, 2004, 20, 780-9.
- 16 C. A. Owen, J. Selvakumaran, I. Notingher, G. Jell, L. L. Hench and M. M. Stevens, 'In vitro toxicology evaluation of pharmaceuticals using Raman micro-spectroscopy', J Cell Biochem, 2006, 99, 178-86.
- 17 I. Notingher, Verrier, S., Haque, S., Polak, J.M., Hench, L.L., 'Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells', Biopolymers, 2003, 72, 230-40.
- 18 R. J. Swain, G. Jell and M. M. Stevens, 'Non-invasive analysis of cell cycle dynamics in single living cells with Raman micro-spectroscopy', J Cell Biochem, 2008, .
- 19 C. Matthaus, T. Chernenko, J. A. Newmark, C. M. Warner and M. Diem, 'Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy', Biophys J, 2007, 93, 668-73.

- 20 N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan, E. Volokhina, G. Vrensen, J. Greve and C. Otto, 'Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells', Biophys J, 2003, 84, 3968-81.
- 21 Krafft C, Knetschke T, Siegner A, Funk RHW and S. R, 'Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy', Vibrational Spectroscopy, 2003, 32, 75-83.
- 22 J. H. Ward, 'Hierarchical grouping to optimise an objective function', J Am Stat 1963, Assoc. 58, 236-44.
- 23 J. Pines, M. Jackman and K. Simpson, 'Assays for CDK activity and DNA replication in the cell cycle', Curr Protoc Cell Biol, 2001, Chapter 8, Unit 8 2.
- 24 J. De Gelder, K. De Gussem, P. Vandenabeele and L. Moens, 'Reference database of Raman spectra of biological molecules', Journal of Raman spectroscopy, 2007, 38, 1133-47.
- 25 J. M. Benevides, M. Tsuboi, J. K. Bamford and G. J. Thomas, Jr., 'Polarized Raman spectroscopy of double-stranded RNA from bacteriophage phi6: local Raman tensors of base and backbone vibrations', Biophys J, 1997, 72, 2748-62.
- 26 F. Parker (1983). Applications of Infrared, Raman and Raman Resonance spectroscopy in biochemistry Plenum Press, New York..
- 27 G. J. Thomas, Jr., J. M. Benevides, S. A. Overman, T. Ueda, K. Ushizawa, M. Saitoh and M. Tsuboi, 'Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations', Biophys J, 1995, 68, 1073-88.
- 28 N. Uzunbajakava, A. Lenferink, Y. Kraan, B. Willekens, G. Vrensen, J. Greve and C. Otto, 'Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells', Biopolymers, 2003, 72, 1-9.

III.2. IMAGERIE SPECTRALE RAMAN DE LA CELLULE ISOLEE : IMPACT DE DIFFERENTES METHODES DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON

III.2.1. Preamble

Contexte

Aujourd'hui, les études spectroscopiques au niveau cellulaire ont été essentiellement effectuées sur des échantillons séchés ou fixés chimiquement. Ces techniques de préparation présentent plusieurs avantages importants, dont celui de permettre la préparation simultanée des échantillons destinés à l'étude histocytopathologique et à l'étude spectroscopique. De plus, ces échantillons se conservent très facilement à 4 ou 22°C quand ils sont fixés chimiquement, ou dans un dessiccateur pour les échantillons séchés à l'air. Enfin, d'un point de vue spectroscopique, les échantillons séchés ou fixés permettent des temps d'analyse plus longs que ceux requis pour des échantillons non fixés.

Cependant, la littérature contient de plus en plus de travaux mettant en évidence les "effets secondaires" de ce type de fixation ; une fixation au formaldéhyde pouvant par exemple empêcher l'utilisation des marqueurs diagnostiques. Chan *et al.* ont comparé les profils spectraux de cellules non fixées, fixées au paraformaldéhyde et fixées au méthanol pour des lignées saines et transformées. Ils ont mis en évidence certains changements, dont notamment des variations de rapports de bandes pour les deux techniques de fixation étudiées, ces changements, étant plus importants dans le cas de la fixation au méthanol. Cette étude a également montré des effets sur les modes de vibrations Raman attribuées aux protéines et phospholipides. Cependant, même si la fixation au paraformaldéhyde induit des changements dans le spectre Raman des cellules, ils restent plus faibles que ceux établis entre cellules saines et leucémiques, et n'induisent pas de mauvaise classification des cellules normales et cancéreuses. Par contre, les changements spectraux induits par la fixation au méthanol sont suffisamment significatifs pour induire une mauvaise classification (Chan, 2009). Par contre, Mariani *et al.* ont démontré sur

kératénocytes et macrophages périphériques, que la fixation paraformaldéhyde n'est pas la méthode de préparation d'échantillon idéale, mais plutôt la dessiccation (Mariani, 2009). On peut donc en déduire que la réponse cellulaire à la méthode de fixation dépend de la lignée cellulaire étudiée.

Objectifs

Notre étude a donc pour but d'évaluer par spectroscopie Raman l'effet de différentes méthodes de préservation des échantillons. Ainsi, plusieurs méthodes de préparation d'échantillon, telles que la fixation au paraformaldéhyde (PAF), la fixation au PAF suivie d'un séchage, le séchage à l'air et le cytopspin ont été testées et comparées à des cellules vivantes.

Pour ce faire, la morphologie cellulaire de chaque échantillon a été comparée pour chaque méthode testée. Une classification hiérarchique ascendante a été réalisée sur les images spectrales de cellules vivantes et fixées de manière à localiser les différentes régions cellulaires. Les modifications induites par les différents modes de fixation seront caractérisées au niveau moléculaire par comparaison des centroïdes de noyau. Puis, l'impact de ces méthodes de préservation a été étudié sur la distribution intracellulaire et la contribution spectrale de trois macromolécules majeures, l'ADN, l'ARN et les protéines. Enfin, une classification hiérarchique ascendante (HCA) et une analyse en composantes principales (PCA) appliquées sur les spectres nucléaires détermineront le mode de préparation sont le plus adapté à une analyse cellulaire proche de l'état vivant.

Résultats

En se basant sur des résultats antérieurs (Draux *et al.* Analyst 2009), nous avons enregistré des images spectrales Raman de cellules vivantes isolées et évalué l'impact de différentes méthodes de préservation sur les informations spectrales.

La figure 2 montre les images visibles de cellules cultivées sur quartz selon les méthodes de préparation utilisées. Ainsi, la morphologie allongée des cellules vivantes a été comparée à celle adoptée par les cellules séchées ou fixées. On observe que les cellules fixées au PAF, technique couramment utilisée en histocytopathologie, présentent une

morphologie identique à celle des cellules vivantes. La morphologie cellulaire est également conservée pour les cellules fixées au PAF puis séchées, contrairement aux cellules séchées dont la morphologie est complètement masquée par les cristaux de NaCl provenant du milieu de rinçage. La méthode de fixation au PAF suivie d'un séchage semble donc un bon compromis entre séchage et fixation au PAF et présente l'énorme avantage de pouvoir être utilisée en microspectroscopie IR. Concernant les cellules cyto-centrifugées, leur morphologie arrondie est en accord avec le fait que cette méthode nécessite de les détacher du support par trypsination et de les remettre en suspension avant de les centrifuger.

Une analyse hiérarchique en cluster sur l'image spectrale de la cellule vivante (figure 3a) confirme nos résultats précédents (Draux *et al.* Analyst 2009) et met en évidence une distinction nette entre noyau, cytoplasme et zone périnucléaire. De même, les autres méthodes de préservation aboutissent à une discrimination de ces compartiments cellulaires ; seule la technique de séchage affecte fortement l'information provenant de la zone périnucléaire (figures 3b à 3e).

De manière à mieux apprécier les effets chimiques de ces méthodes de fixation, les centroïdes du cluster correspondant au noyau ont été comparés (figure 4). Le choix de ce compartiment réside dans le fait qu'il est compact, très bien délimité et représentatif de macromolécules type telles que l'ADN, les protéines et les phospholipides. Ainsi, nous observons des variations spectrales dans les régions caractéristiques des acides nucléiques ($670 - 680$, 750 , $805 - 830$ et $1094 - 1100 \text{ cm}^{-1}$) et des protéines ($935 - 982$, $1260 - 1270$ et $1620 - 1680 \text{ cm}^{-1}$).

Ensuite, l'effet de ces méthodes de préservation a été étudié par une méthode de fitting supervisé prenant en compte les signatures spectrales de trois macromolécules majeures, l'ADN, l'ARN et les protéines. Pour ce faire, ces macromolécules ont été extraites et purifiées à partir de cellules Calu-1 vivantes. Après acquisition des profils spectraux (figure 5 et table 1), leur distribution au sein de la cellule vivante isolée est présentée dans la figure 6. Cette distribution concorde avec celle de nos travaux précédents (Draux *et al.* Analyst 2009). De la même manière, pour les cellules fixées, la distribution de

Résultats et discussion

l'ADN est localisé dans le noyau, l'ARN est distribué dans la zone périnucléaire et les protéines couvrent pratiquement la cellule entière (figure 6).

Ces résultats confirment qu'il est possible de récupérer l'information spectrale même si les cellules ont subi une fixation.

De manière à quantifier les effets de ces méthodes de préparation, les coefficients affectés à chaque spectre de référence pour le fitting ont été comparés. Les résultats présentés dans la figure 7 montrent que les protéines contribuent à 80 – 90% de l'information spectrale cellulaire, tandis que les contributions de l'ADN et l'ARN sont comprises entre 4 et 12%. Ces résultats démontrent que la fixation ne semble pas altérer la composition cellulaire globale.

Enfin, une classification hiérarchique ascendante et une analyse en composantes principales ont été appliquées sur des spectres nucléaires isolés de l'image spectrale et ont révélé que les spectres issus des cellules fixées au PAF ou cyto centrifugées sont comparables à ceux des cellules vivantes (figures 8 et 9). Ces résultats démontrent que ces modes de préparation sont les plus adaptés à une analyse cellulaire proche de l'état vivant.

Conclusion

La méthode de préparation de l'échantillon est un élément essentiel à prendre en considération afin de s'assurer de la fiabilité des informations spectrales. Dans notre étude, la fixation au PAF et la cyto centrifugation apparaissent comme les méthodes qui donnent des informations spectrales comparables à celles obtenues à partir de cellules vivantes.

III.2.2. Article en cours de rédaction

**Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the
impact of sample fixation methods**

Florence DRAUX¹, Cyril GOBINET¹, Josep SULE-SUSO^{2,3}, Aurélie TRUSSARDI¹,
Michel MANFAIT¹, Pierre JEANNESSON¹, and Ganesh D. SOCKALINGUM¹.

¹Unité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6237 - MEDyC, UFR de Pharmacie, IFR53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.

²Staffordshire Oncology Centre, University Hospital of North Staffordshire, Stoke on Trent, UK.

³Institute for Science and Technology in Medicine, Keele University, Guy Hilton Research Centre, Thornburrow Drive, Stoke on Trent ST4 7QB., UK.

Corresponding author:

Dr. Ganesh D. Sockalingum

**Unité MEDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6237
UFR de Pharmacie, IFR53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.**

Mail: ganesh.sockalingum@univ-reims.fr

Phone: +33 326913553 Fax: +33 326913550

Abstract

Raman spectroscopy has proven its great potential for the analysis of cell constituents and processes. However, sample preparation methods compatible with clinical practice must be implemented for collection of accurate spectral information. This study aims at assessing using micro-Raman imaging the effects of some routinely used fixation methods such as formalin-fixation, formalin-fixation / air-drying, cytocentrifugation, air-drying on cellular spectral information. Data were compared with those acquired from single living cells. In parallel to these spectral information, cell morphology was compared. Spectral images of isolated cells were analyzed first with an unsupervised method based on HCA which allowed delimitation of the cellular compartments. The resulting nuclei cluster centers were compared and revealed at the molecular level that fixation induced changes in spectral information assigned to nucleic acids, and proteins. Second, a supervised fitting approach using model spectra of DNA, RNA, and proteins chemically extracted from living cells, revealed very small modifications at the level of the localization and quantification of these macromolecules. Finally, HCA and PCA performed on individual randomly selected from the nuclear regions showed that formalin-fixation and cytocentrifugation are sample preparation methods that have little impact on the biochemical information as compared to living conditions. Any step involving cell air-drying seem to accentuate the spectral deviations from the other preparation methods. It is therefore important in a future context of spectral cytology to take into account these variations.

Keywords: Raman micro-imaging, cell fixation, statistical analysis, spectral cytology

Introduction

Raman microspectroscopy has proven to be a powerful, effective and non invasive method for investigating cell populations as well as single cells. It has been shown to be an adapted modality for probing cell constituents and processes¹⁻¹⁰. Recently, we showed its potential for imaging the major biomolecular components within single live cancer cells⁴. All these studies show that Raman microspectroscopy holds promises as a novel cytological tool. In both fundamental biology and clinical settings, development of Raman cytology should take into account live and fixed specimens. Fixation allows sample preservation for later analysis but is also indispensable for specific techniques, such as conventional cytology, immunohistochemistry, or electron microscopies. It is therefore important to evaluate the effects of routine fixation methods on Raman spectral signatures of cells. Recent Raman studies have reported such effects showing that spectral changes due to formalin-fixation do not influence delineation between normal and cancer cells, in contrast to methanol fixation which induces data misclassification¹¹. On the other hand, Mariani *et al.* tested several fixation methods and observed heterogeneous responses depending on the cell line analyzed¹². However, these Raman studies remain limited and reveal strong discrepancies in the impact of these fixation methods on cell spectral features.

In this context, and using our previous expertise on Raman imaging of single living cells⁴, we evaluate in the present study the impact of different preservation methods on cellular spectral information originating from major macromolecules, such as DNA, RNA, and proteins. We compared data obtained from fixed cells with cells in living conditions and differences were highlighted using high contrast Raman images of whole cells processed by multivariate statistical analysis.

Experimental

Cell line

The non-small cell lung cancer cell line Calu-1 was purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and cultured in Minimum Essential Medium with Earle salts and Glutamax I (MEM; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France)

supplemented with 10% foetal calf serum, 1% sodium pyruvate, 1% of essential amino-acids and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen). Culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. Cells were routinely passaged before reaching confluence using 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen). The absence of mycoplasma was checked using PCR methods.

Cell sample preparation

Calu-1 cells were plated on quartz substrates at 25×10^3 cells/mL and were allowed to adhere for 24 h at 37 °C. Quartz cell samples were then removed from culture medium and washed with saline. Living samples were immersed in saline and immediately analyzed. Air-dried samples were prepared by leaving cells in open Petri dishes for 1h in ambient conditions. Cell fixation was performed using a solution of 4% formalin in PBS (Sigma, St Quentin Fallavier, France) for 10 min at 22 °C, rinsed, and immersed in saline (for formalin-fixed samples) or air-dried (for formalin-fixed / air-dried cell samples). For cytocentrifugated cell samples, 30×10^3 cells were centrifuged at 400 x g for 7 min on quartz slides.

Cell morphology

Cell morphology was analyzed using an Axiovert 200M microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 20X objective. The microscope was driven by the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France) and images were recorded with a CCD camera (CoolsnapHQ, Roper Scientific).

RNA extracted from cancer cells using TRIzol[®] Reagent

Total RNAs from Calu-1 cells were isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Abingdon, UK) in accordance to the manufacturer's protocol¹³. A pellet of $1 - 2 \times 10^6$ cells previously washed with cold Phosphate Buffered Saline (PBS; Invitrogen) is homogenized in 1mL of TRIzol[®] Reagent and incubated for 5min at 4°C. After this procedure, 200µL chloroform was added to the tube and the solution was centrifuged for 15 min at 12 000×g. The aqueous phase was transferred to a clean tube, precipitated with 500 µL isopropyl alcohol, and centrifuged for 10 min at 12 000×g. The resulting pellet

was then suspended in 70% cold ethanol and centrifuged for 5 min at 12 000×g. The pellet was dried at room temperature, resuspended in 200µL of Ultra-Pure DNase/RNase free H₂O, and stored at -20 °C. The extracted RNA was subjected to electrophoresis on 2% agarose gel and bands were visualized by UV transillumination using ethidium bromide staining.

DNA extracted from cancer cells using MINI kit QIamp® DNA

DNA was isolated from Clau-1 cells using the MINI kit QIamp® DNA (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions¹⁴. 200µL of sample (5.10⁶ cells) were incubated in a protease/Lysis buffer mixture (200 µL Qiagen Protease/2.4 ml buffer AL) for 10 minutes at 56°C in a 1.5 ml conical tube. 2 ml absolute ethanol were added to the lysate and the tube was mixed by vigorous shaking (vortexing). The lysate/ethanol mixture was transferred to a QIamp Spin column placed in a clean 2 ml conical tube. The column was centrifuged at 6000 × g for 1min. The filtrate was discarded, the column was washed with 500µL of buffer AW1 and centrifuged for 1min at 6000 × g. The column was washed a second time with 500µL of buffer AW2 and centrifuged for 3min at 6000 × g to ensure complete drying. DNA was eluted from the column into a clean 1.5 ml conical tube by adding 200µL buffer AE to the column, incubating at room temperature for 1min, and centrifuging for 1min at 6000 × g. The extracted DNA was subjected to electrophoresis on 2% agarose gel and bands were visualized by UV transillumination using ethidium bromide staining.

Total protein extraction

Total proteins were isolated using lysis buffer (10 mM Tris (pH 7.4) + 0.1% Triton X-100). A pellet of 4.10⁶ cells was resuspended in 5mL ice-cold PBS (Invitrogen) and centrifugated for 5min at 600 × g. The filtrate was discarded, the pellet resuspended in extraction buffer and centrifugated for 10min at 4000 × g. The upper phase was transferred to a new centrifuge tube and 4 volumes iced-cold acetone were added and incubated 15min on ice. After centrifugation for 10min at 4800 × g, the filtrate was discarded and pellet was air-dried. Finally, the protein pellet was resuspended in DNase/RNase free H₂O and stored at -20 °C.

Raman spectrometer

Raman spectral acquisitions were performed with a Labram microspectrometer (Horiba Jobin Yvon, Lille, France). The excitation source was a diode laser (Toptica Photonics, Germany) generating a 300 mW single mode line at 785 nm. The microspectrometer was equipped with an Olympus microscope and all measurements were recorded using a 100X water immersion objective (Olympus LUMPLFL100XW, NA 1, Japan). The nominal spot size at the sample was assessed to 2 μm and the power of the laser beam focused on the sample was ~ 30 mW. Raman scattered light from the cell was collected through the same objective. Rayleigh elastic scattering was rejected by a Notch filter which reduces its intensity by a factor of 10^6 . A confocal pinhole rejects signals from out-of-focus regions of the sample (150 μm). A multichannel CCD device (1024 x 256 pixels) was used to detect the Raman Stokes signal dispersed with a 4 cm^{-1} spectral resolution by a holographic grating.

Raman reference spectra of DNA, RNA, and proteins

Raman reference spectra of DNA, RNA, and proteins were obtained from the extracted solutions deposited on a quartz slide and dried. Micro-Raman images were recorded with a 3 μm step in the $580\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ range and an acquisition time of 2×10 sec for each point. All spectral acquisitions were carried out using the Labspec 4.18 software (Horiba Jobin Yvon).

Acquisition of Raman spectra from single living cancer cells

Raman images of single living Calu-1 cells in exponential phase growth were measured from quartz seeded at 50×10^3 cells/mL and incubated overnight at $37\text{ }^\circ\text{C}$ to allow cell attachment. Isolated single cells were raster-scanned with a 3 μm step and an acquisition time of 2×10 sec for each point.

Data pre-processing and image analysis

It is widely accepted that spectral artefacts can have a considerable incidence on the interpretation of data. It is therefore important to separate biochemical information from undesired effects. In the case of Raman microspectroscopy, it is essential before data

interpretation to take into account in the pre-processing steps, instrument calibration and response, substrate and medium interference, and noise reduction.

To this end, we implemented into Matlab software (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts) routines that take into account the above pre-processing steps which were applied on the raw Raman data (Figure 1a). The first step corrects for instrumental spectral shifts by performing a peak alignment on the whole data set following the method described by Tfayli *et al.*¹⁵ (Figure 1b). Then, spectra were corrected for instrumental response by subtracting the dark current and dividing by the detector response (Figure 1c). For the latter, we used a NIST standard for 785nm (SRM 2241-785 nm, US National Institute of Standards & Technology Gaithersburg, MD 20899). Spectral smoothing is then performed using the Savitsky-Golay method (Figure 1d), and a spectral quality test is used to discard spectra with no significant signal (area under peak 1420-1500 < 0.15). The distribution of the major macromolecules was evaluated on these corrected images, with the substrate contribution included in the correlation (in order to minimize the error).

Prior to HCA and PCA analyses, spectra were normalized (standard normal variate (SNV)) and corrected for the contribution of the quartz substrate by least-squares fitting (Figure 1e). HCA was performed using Euclidean distance and Ward's linkage method and the cluster centers were calculated with the average of all spectra belonging to the same cluster. PCA method used was based on singular value decomposition.

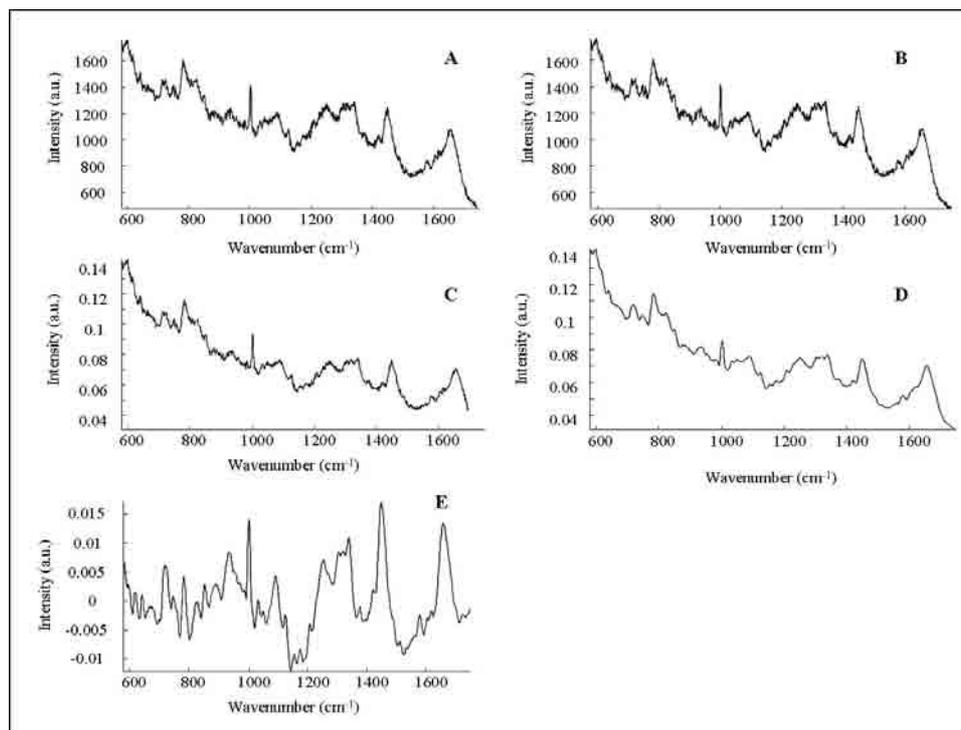


Figure 1: Pre-processing of Raman spectral data. (a) Raw spectrum, (b) Peak alignment, (c) Correction for dark current and detector response, (d) Savitsky-Golay smoothing, and (e) Correction for the contribution of the quartz substrate.

Results and discussion

We present here Raman imaging data obtained at the single cell level after different fixation modalities. These images are then compared to those of single living cells, based on three major macromolecules, DNA, RNA, and proteins.

Effect of different fixation methods on Calu-1 cell morphology

Figure 2 compares visible light microscopy images of single living cells grown on quartz with cells fixed using different methods. Calu-1 living cells exhibit the conventional elongated morphology as usually observed on plastic cell culture substrate. Formalin-fixed cells and formalin-fixed / air-dried cells show a similar morphology as living cells, indicating that these fixation methods do not significantly affect cell structures. In contrast, air-dried cells are morphologically different from the above and are masked by salt crystals due to the rinsing medium. Finally, cytocentrifuged cells present a rounded

morphology which is due to the preparation method that requires cell detachment and resuspension in saline before centrifugation.

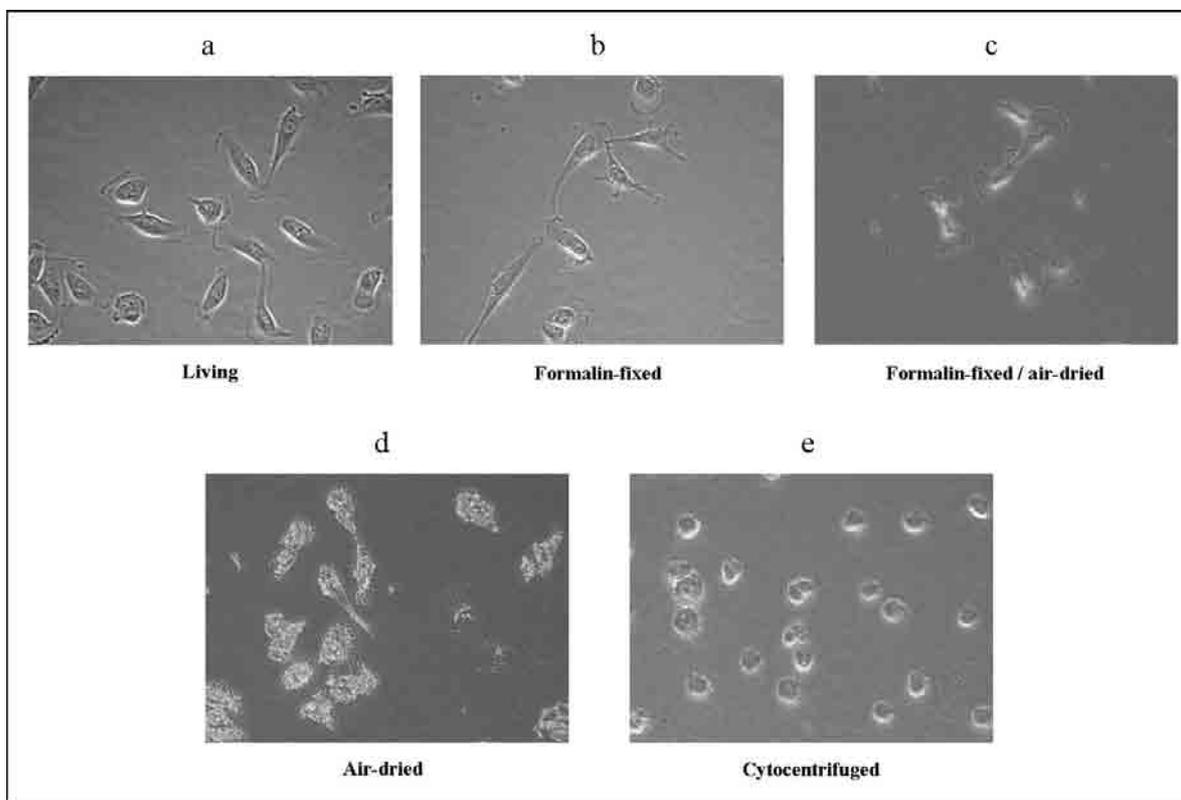


Figure 2: Effect of fixation on Calu-1 cell morphology as compared to living conditions. Cells were seeded on quartz substrates and (a) maintained in living conditions, (b) formalin-fixed, (c) formalin-fixed / air-dried, (d) air-dried, and (e) cytocentrifuged.

Effect of fixation procedures on Raman spectral images of single Calu-1 cells

Analysis of Raman spectral images using an unsupervised hierarchical clustering

Spectral images contain a large amount of data based on spatial and molecular information. These data are difficult to interpret without the use of multivariate processing methods. We used here a method based on HCA analysis of images in order to have a rapid way of comparing the effect of different fixation procedures. As a control, clustering was also performed on cells in living conditions. It is important to note that in the clustering procedure, for each condition, Raman images acquired from 10 different cells are processed together. Figure 3a shows the results for a living cell with 4 different

Résultats et discussion

clusters assigned to the main subcellular regions: nucleus (yellow pixels), cytoplasm (green pixels), perinuclear zone (purple pixels), which is known to contain an extended and dense membrane network (Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, ...), and cytoplasmic membrane (blue pixels). Each of these compartments can be represented by a cluster center spectrum, or centroid spectrum (for example, average of yellow pixels corresponds to the nuclei cluster center). The cluster images obtained for the living conditions are in agreement with previously published results⁴. The same color codes have then been used to construct the Raman images of fixed cells (figures 3b-e). A clear discrimination between cellular compartments can be observed, except for the air-dried cell where the information from perinuclear region is almost inexistent. It is known that fixation has a chemical impact on cellular biomolecules¹¹. Our results obtained via Raman spectral cytology seem to indicate that this impact has no incidence on cell morphology. Indeed, the cluster images shown above reveal a good concordance with visible light microscopy information. In order to better appraise the chemical impact of fixation, we compared, for each condition (figure 4), the cluster centers corresponding to the nucleus. This cellular compartment was chosen because it is compact, well delimited, easily identifiable, and representative of macromolecules such as nucleic acids, and proteins. Several variations were observed in the spectral regions assigned to nucleic acids (670 – 680, 750, 805 – 830, and 1094-1100 cm^{-1}) and proteins (935 – 982, 1260 – 1270, 1620 – 1680 cm^{-1}).

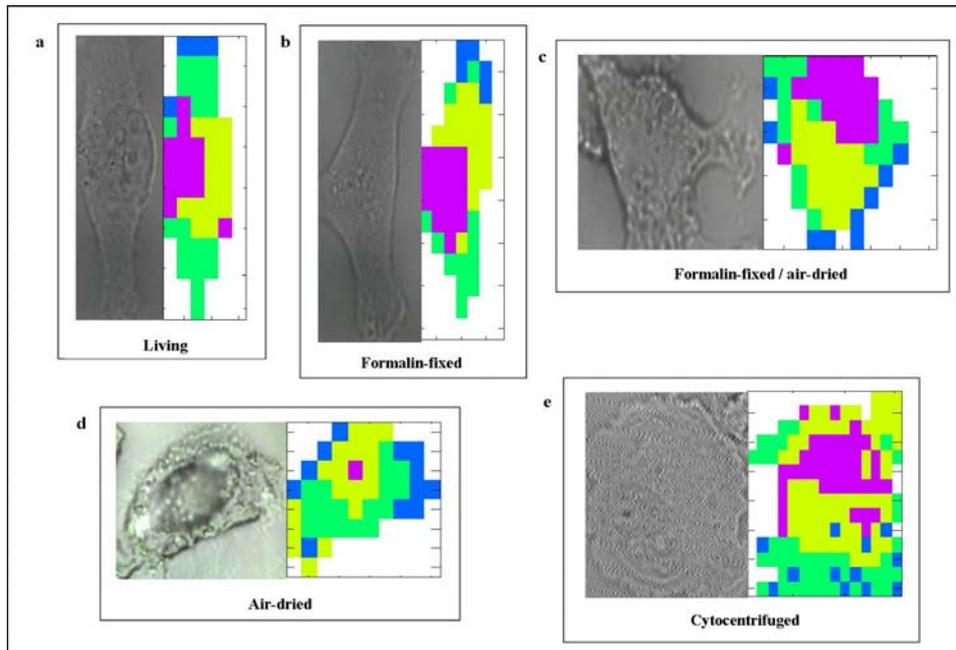


Figure 3: Hierarchical cluster analysis of spectral images from (a) living, (b) formalin-fixed, (c) formalin-fixed / air-dried, (d) air-dried, and (e) cytocentrifuged cells. Pixel color code: yellow (nucleus), green (cytoplasm), purple (perinuclear zone), and blue (cytoplasmic membrane).

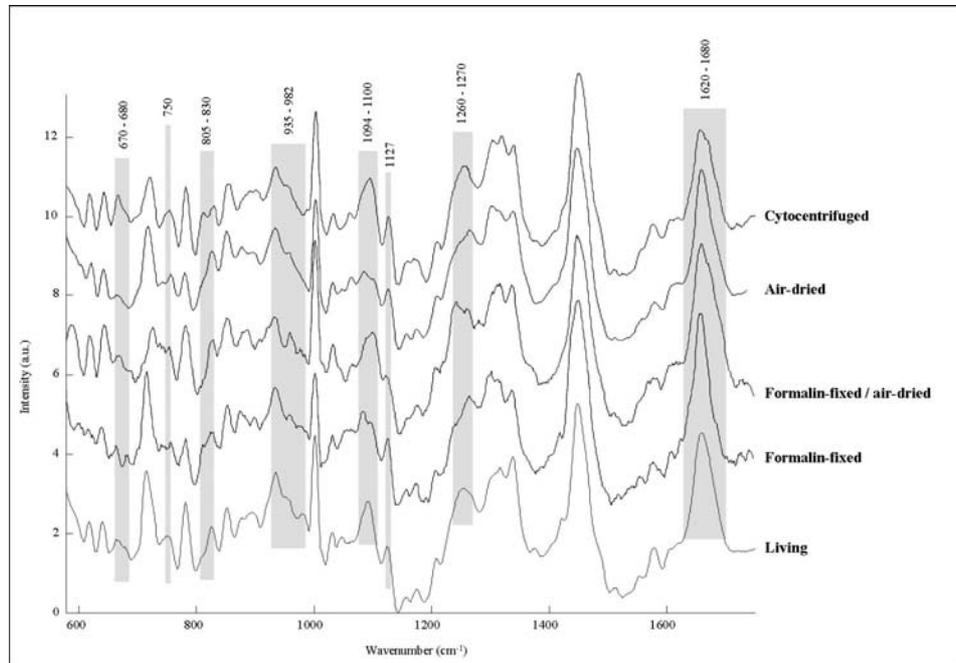


Figure 4: Centroid spectra representative of nuclei of living and fixed Calu-1 cells. Data correspond to 10 individual cells for each condition. Spectral changes are highlighted in grey vertical lines.

Supervised fitting of Raman spectral images based on reference model spectra of DNA, RNA and proteins

In the above section, the effects of the fixation methods were analyzed in an unsupervised manner using HCA and without any *a priori* cellular information. Here, we have adopted a supervised approach in order to assess these effects by taking into account the spectral signatures of the 3 main macromolecules, DNA, RNA, and proteins. For each fixation condition, Raman images were reconstructed using a fitting procedure based on intrinsic cell molecular information. To do so, the macromolecules were extracted from living Calu-1 cells, purified, and their spectral profiles recorded (figure 5). Cellular DNA spectral bands observed at 787 cm^{-1} (ring breathing of cytosine), 1092 (PO_2^- stretching), 1486 and 1575 cm^{-1} (ring modes of guanine and adenine) are in accordance with reported data¹⁶. Cellular RNA shows common bands with DNA and a specific peak at 809 cm^{-1} assigned to PO_2^- stretching mode¹⁷. Raman spectrum of extracted proteins exhibits the specific bands¹⁸ at 1003 , 1264 , 1451 and 1660 cm^{-1} . These characteristic spectral signatures, consistent with the literature data and summarized in table 1, were used as model spectra for Raman images reconstruction based on a fitting procedure.

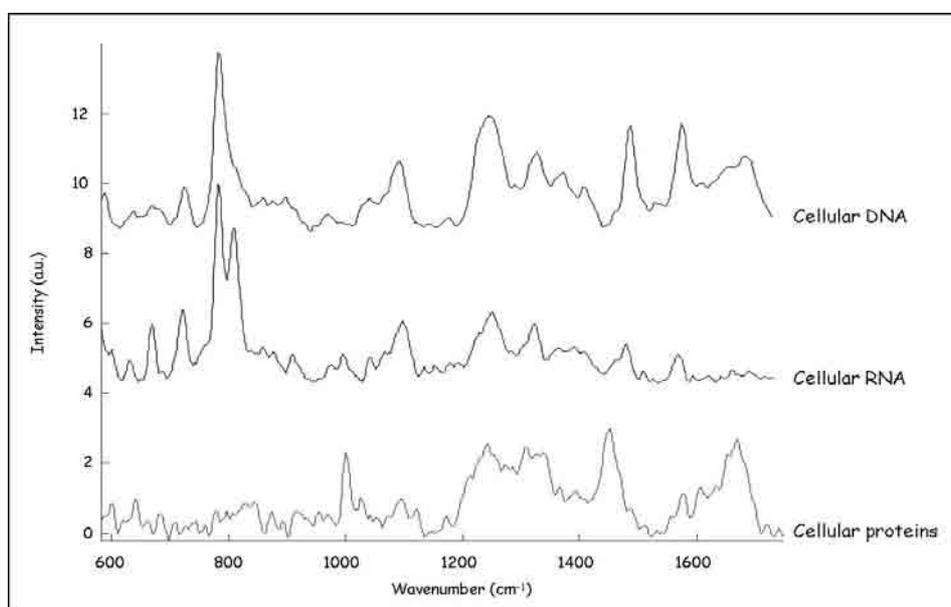


Figure 5: Raman spectral signature of extracted cellular macromolecules (DNA, RNA, and proteins)

Table 1: Assignments of the Raman spectral profiles of extracted macromolecules.

Wavenumbers	Assignments
787	DNA/RNA : ring breathing (C)
809	RNA : O-P-O stretching
1003	Prot : ring breathing Phe
1092	DNA/RNA : O-P-O stretching
1264	Prot : Amide III
1451	Prot : (C-H) bending
1486	DNA/RNA : ring mode (G,A)
1553	Prot : c=C stretching (Trp)
1575	DNA/RNA : ring mode (G,A)
1660	Prot : Amide I

This procedure takes into account all three signatures simultaneously and each pixel spectrum is represented by a linear combination of the reference spectra respectively associated to a fit coefficient. The resulting images shown in figure 6 allow to visualize the intracellular localization of these three major macromolecules, based on a molecular spectral information. By associating the light microscope and Raman images, it can be seen that for each condition, DNA is well localized in the nucleus, RNA is distributed as spots in the perinuclear region, while proteins cover almost the entire cell. These results indicate that spectral information extracted from living cells can be easily retrieved, although cells have undergone fixation.

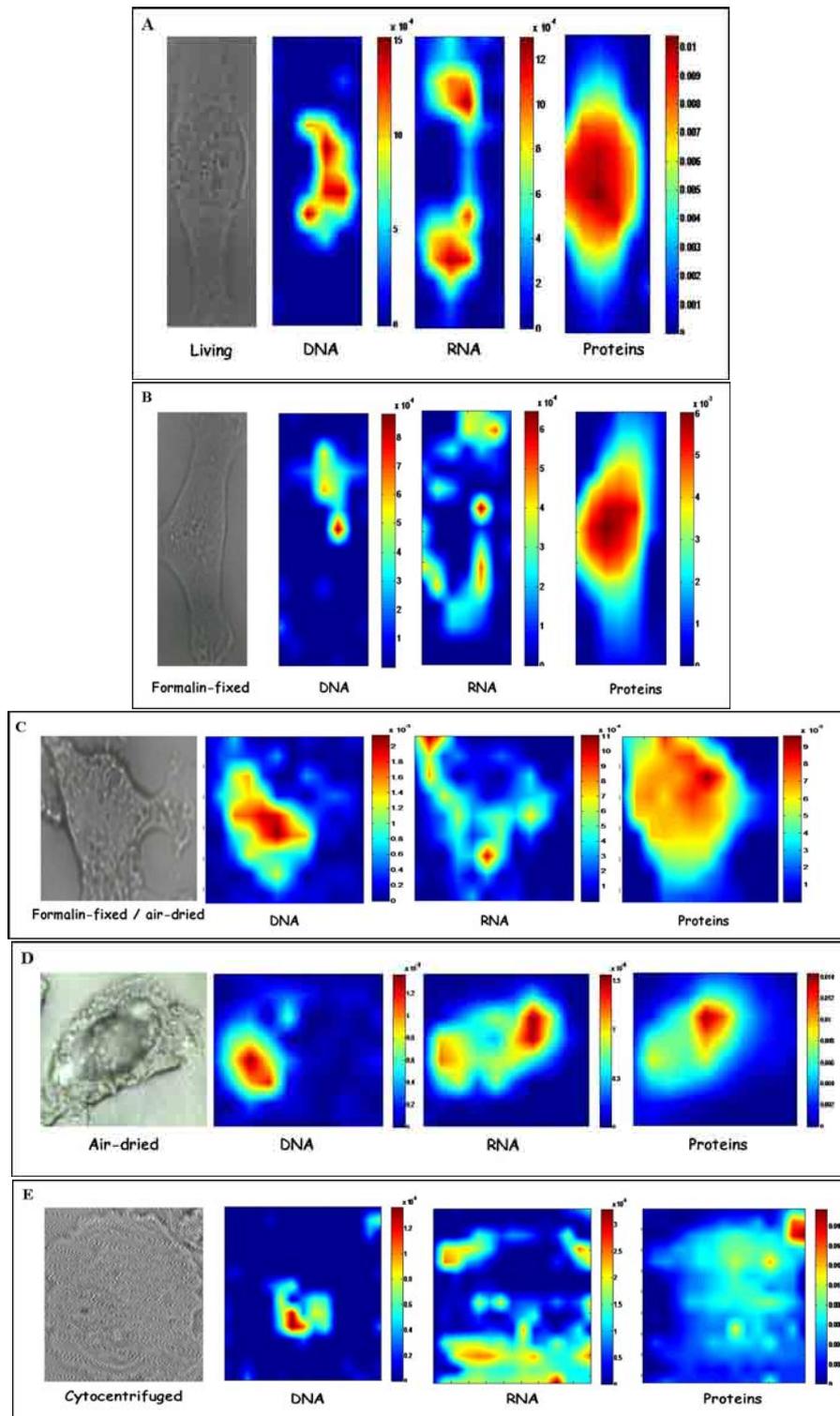


Figure 6: Qualitative representation of the localization of DNA, RNA, and proteins based on their respective reference spectra. (A) Living cell, (B) formalin-fixed cell, (C) formalin-fixed / air-dried cell, (D) air-dried cell, and (E) cytocentrifuged cell. The reference spectra have been obtained by extracting these components from living cells.

In order to quantify these effects, we have compared the fit coefficients obtained for these macromolecules in the 5 experimental conditions. For this analysis, data from 10 cells / condition have been computed. Results are shown in figure 7 where proteins contribute to 80 – 90 % of the cellular spectral information, while DNA and RNA contribution ranges between 4 – 12 %. Taking into account that water contributes weakly to the spectral information, these data are in accordance with the percentage total cellular mass of these macromolecules as currently admitted in eukaryote cell. In addition, these results demonstrate that fixation does not seem to alter the global cell composition. This methodology represents an innovative label-free assay of cell components at the micrometric level, since each pixel spectrum corresponds to information originating from a microvolume of the cell.

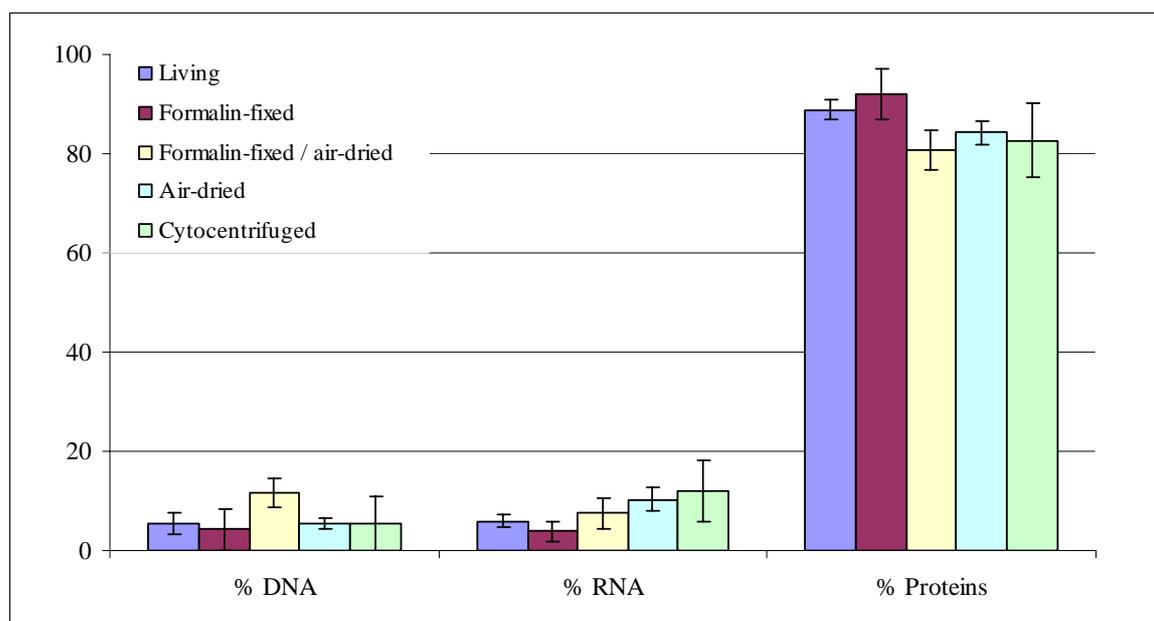


Figure 7: Histogram showing the quantitative contribution of DNA, RNA and proteins in the cellular spectral information. The fit coefficients have been computed from 10 cells / condition.

In a further attempt to analyze the effect of the fixation methods compared to living conditions, we performed a HCA classification using individual spectra. To do so, we randomly chose 15 spectra from the nuclear regions of each analyzed cell (n = 10), and for each experimental condition. HCA analysis using Euclidean distance calculation and Ward’s algorithm for linkage is shown in figure 8. First of all, it is noticed that there is a

good experimental reproducibility since there is almost no overlapping of spectra from one group to another. Five distinct clusters are obtained. Second, the formalin-fixed cell cluster seems to be close to that of living cells, cytocentrifuged cells form a separate group but links with the cluster of living and formalin-fixed cells. Cells which have been air-dried or formalin-fixed / air-dried are completely delineated from the living cells since they form a separate cluster. These findings were verified using a second approach of multivariate data analysis based on principal components analysis (PCA). In PCA, each spectrum is considered as a point in a space of n dimensions, with n the number of spectra. All spectra constitute a cloud of points in this space. The basis of PCA is to find a new system (space) in performing rotations of the n coordinate axes. The first axis represents the direction of the maximal inter-spectral variance (first component), the second represents the direction of the following variance (second component), and so on. Figure 9 shows the loading plots of PC 2 and 3 from which it can be observed that two clouds of points are easily distinguished. The first one groups spectra from living, formalin-fixed and cytocentrifuged cells, as already observed in the HCA analysis. The second cloud of points contains spectra from formalin-fixed / air-dried and air-dried cells, the latter appearing as a distinct subcluster. Again, these findings corroborate with the HCA analysis.

These spectroscopic results indicate that conventional cytology practice like formalin-fixation, and cytocentrifugation have a weak incidence on the global molecular information present in the cell.

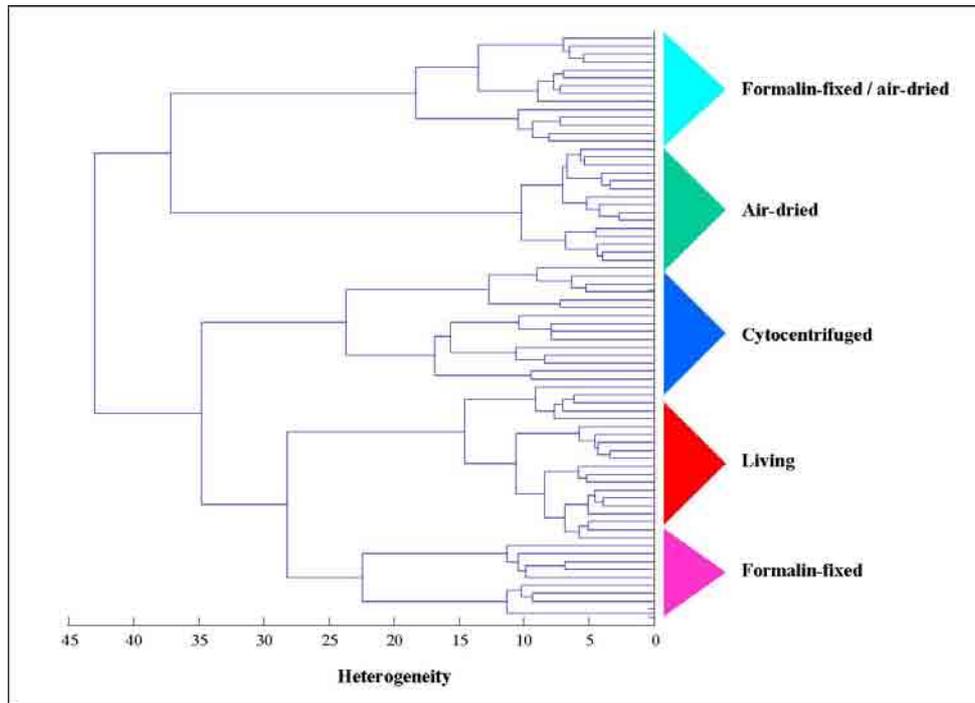


Figure 8: Hierarchical cluster analysis of nucleus spectra isolated from spectral images of living, formalin-fixed, cytocentrifuged, air-dried, and formalin-fixed / air-dried cells (n = 10 cells / condition).

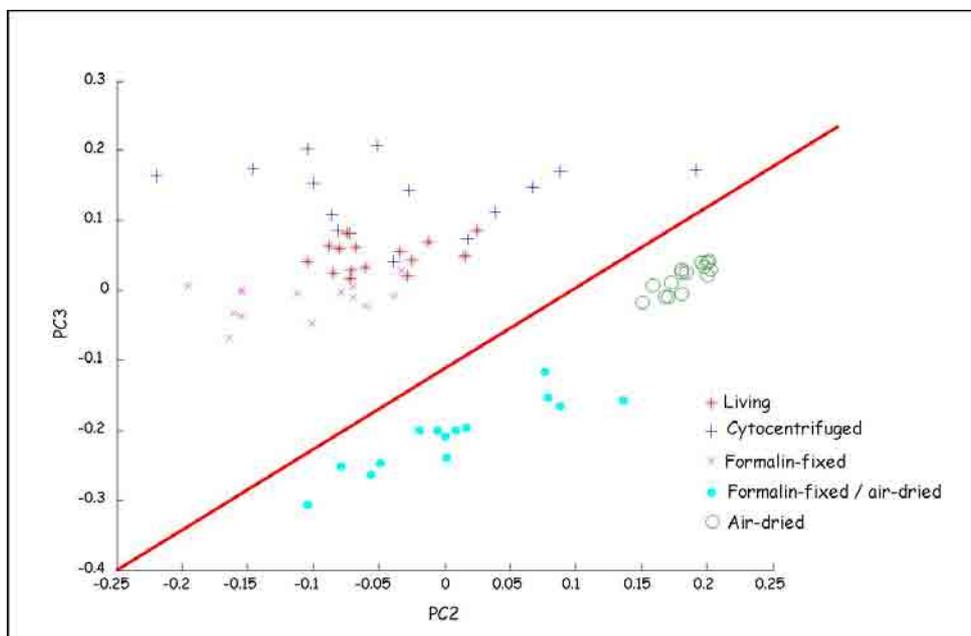


Figure 9: Score plots of PC2 and PC3 of nucleus spectra isolated from spectral images of living, formalin-fixed, cytocentrifuged, air-dried, and formalin-fixed / air-dried cells (n = 10 cells / condition).

Conclusion

Selecting the ideal sample preparation method for sample analysis is critical but essential for obtaining both sensitive and reproducible results, in particular in Raman microspectroscopy. Overall, each cell fixation method studied in this work produces small effects on nucleic acids, and proteins spectral profile, and on the localization and distribution of these macromolecules as observed from Raman spectral images. HCA and PCA analyses suggest that formalin-fixation and cytocentrifugation preserve the cell in an estate as close as possible to the living form, for the cell line and fixation methods studied. Any step of cell air-drying has the consequence of causing spectral deviations. It is therefore important in a future context of spectral cytology to take into account these modifications

Acknowledgements

This work was supported by Ligue contre le Cancer, Comité de la Marne, Maxime Hanss Prize, BBSRC-Alliance Française, 2006. FD is a recipient of doctoral fellowship from Région Champagne-Ardenne.

References

- 1 B. A. Brennan, J. G. Cummings, D. B. Chase, I. M. Turner, Jr. and M. J. Nelson, 'Resonance Raman spectroscopy of nitrile hydratase, a novel iron-sulfur enzyme', Biochemistry, 1996, **35**, 10068-77.
- 2 F. C. Clarke, M. J. Jamieson, D. A. Clark, S. V. Hammond, R. D. Jee and A. C. Moffat, 'Chemical image fusion. The synergy of FT-NIR and Raman mapping microscopy to enable a more complete visualization of pharmaceutical formulations', Anal Chem, 2001, **73**, 2213-20.
- 3 P. Crow, J. S. Uff, J. A. Farmer, M. P. Wright and N. Stone, 'The use of Raman spectroscopy to identify and characterize transitional cell carcinoma in vitro', BJU Int, 2004, **93**, 1232-6.
- 4 F. Draux, P. Jeannesson, A. Beljebbar, A. Tfayli, N. Fourre, M. Manfait, J. Sule-Suso and G. D. Sockalingum, 'Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study', Analyst, 2009, **134**, 542-8.
- 5 A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice, J. Crowe, R. R. Dasari and M. S. Feld, 'Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy', Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, **102**, 12371-6.
- 6 P. R. Jess, D. D. Smith, M. Mazilu, K. Dholakia, A. C. Riches and C. S. Herrington, 'Early detection of cervical neoplasia by Raman spectroscopy', Int J Cancer, 2007, **121**, 2723-8.
- 7 C. Krafft, M. Kirsch, C. Beleites, G. Schackert and R. Salzer, 'Methodology for fiber-optic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in mouse brains', Anal Bioanal Chem, 2007, **389**, 1133-42.
- 8 A. Tripathi, R. E. Jabbour, P. J. Treado, J. H. Neiss, M. P. Nelson, J. L. Jensen and A. P. Snyder, 'Waterborne pathogen detection using Raman spectroscopy', Appl Spectrosc, 2008, **62**, 1-9.
- 9 M. Diem, M. Romeo, S. Boydston-White, M. Miljkovic and C. Matthaus, 'A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004)', Analyst, 2004, **129**, 880-5.

- 10 Y. S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto and H. O. Hamaguchi, 'Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy', Biochemistry, 2005, **44**, 10009-19.
- 11 J. W. Chan, D. S. Taylor and D. L. Thompson, 'The effect of cell fixation on the discrimination of normal and leukemia cells with laser tweezers Raman spectroscopy', Biopolymers, 2009, **91**, 132-9.
- 12 M. M. Mariani, P. Lampen, J. Popp, B. R. Wood and V. Deckert, 'Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy', Analyst, 2009, **134**, 1154-61.
- 13 A. Trussardi-Régnier, S. Lavenus, M.-C. Gorisse and J. Dufer, 'Thalidonide alters nuclear architecture without ABCB1 gene modulation in drug-resistant myeloma cells', Int. J. Oncol., Under press.
- 14 V. El-Khoury, G. Breuzard, N. Fourre and J. Dufer, 'The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR1 (ABCB1) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model', Br J Cancer, 2007, **97**, 562-73.
- 15 A. Tfayli, C. Gobinet, V. Vrabie, R. Huez, M. Manfait and O. Piot, 'Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies', Appl Spectrosc, 2009, **63**, 564-70.
- 16 G. J. Thomas, Jr., J. M. Benevides, S. A. Overman, T. Ueda, K. Ushizawa, M. Saitoh and M. Tsuboi, 'Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations', Biophys J, 1995, **68**, 1073-88.
- 17 J. M. Benevides, M. Tsuboi, J. K. Bamford and G. J. Thomas, Jr., 'Polarized Raman spectroscopy of double-stranded RNA from bacteriophage phi6: local Raman tensors of base and backbone vibrations', Biophys J, 1997, **72**, 2748-62.
- 18 I. Notingher, J. Selvakumaran and L. L. Hench, 'New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells', Biosens Bioelectron, 2004, **20**, 780-9.

III.3. APPROCHE DE L'INTERACTION CELLULE/MEDICAMENT PAR SPECTROSCOPIES INFRAROUGE ET RAMAN

III.3.1. Préambule

Contexte et objectifs

Comme évoqué dans l'introduction, une nouvelle stratégie anticancéreuse, la chimiothérapie métronomique, basée sur des traitements moléculaires tolérés interférant sélectivement avec le phénotype malin a été développée. Cette thérapie visant plutôt un contrôle thérapeutique à long terme consiste notamment en un changement dans le protocole et la dose de l'agent anticancéreux (Gasparini, 2001 ; Scharovsky, 2009).

Il devient dès lors important d'obtenir des données évaluant la réponse de cellules tumorales à de faibles doses d'agents chimiothérapeutiques à un stade précoce du traitement, permettant ainsi la personnalisation du traitement du patient. Notre étude aborde la détection de l'effet de faibles doses d'un médicament antitumoral sur des cellules de cancer de poumon non-à-petites cellules, et se situe donc pleinement dans ce contexte.

L'analyse des effets d'un médicament à l'échelle cellulaire peut être abordée au niveau d'une population de cellules par spectroscopie IR conventionnelle ou au niveau unicellulaire par une approche non conventionnelle via l'utilisation d'une source synchrotron. Comme le montrent nos travaux précédents, cette pharmacologie cellulaire peut être envisagée à l'échelle de la cellule isolée vivante par microspectroscopie Raman.

Dans ce cadre, nous évaluerons l'apport de ces approches biophotoniques sur le modèle d'étude choisi, un médicament majeur dans le traitement du cancer du poumon non-à-petites cellules sur une lignée cellulaire cible de ce cancer, la lignée cellulaire Calu-1.

Objectifs de ces études

Dans un premier temps, à l'aide de la spectroscopie IR, nous déterminerons si la réponse cellulaire à un agent antitumoral est détectable à faibles doses, et si les effets observés au niveau de la population cellulaire sont comparables à ceux obtenus à l'échelle de la cellule isolée.

Dans un deuxième temps, l'utilisation de la microspectroscopie Raman nous permettra d'aborder ces effets au niveau de la cellule vivante isolée.

Résultats

➤ Spectroscopie infrarouge

Avant toute analyse spectroscopique, nous avons évalué l'effet de la gemcitabine (structure présentée dans la figure 1a) sur la croissance des cellules Calu-1 afin de déterminer précisément les concentrations cytostatiques. Ces conditions assurent que seule la prolifération cellulaire est affectée et non la viabilité cellulaire. La figure 1b montre que pour un temps d'incubation de 24 h, des concentrations croissantes de gemcitabine (0,1 ; 1 ; 10 et 100 nM) inhibent respectivement la croissance cellulaire de 5, 23, 82, et 95 %. De plus, nous avons observé qu'avec des temps d'incubation plus longs (48 et 72h), ces taux d'inhibition de croissance restent inchangés ($p < 0.05$).

Une fois ces conditions fixées, des spectres IR-TF ont été enregistrés sur des populations cellulaires pour chaque dose et temps d'incubation. Les figures 2a à 2c présentent les spectres IR issus de populations cellulaires traitées à 0,1, 1, 10, et 100 nM de gemcitabine pendant 24, 48, et 72 h. Visuellement, ces spectres semblent très similaires pour les faibles concentrations (0.1, 1 et 10 nM), mais des variations apparaissent à partir de 100 nM. Les spectres de dérivée seconde ont permis d'accentuer ces différences, comme on peut le voir dans les figures 3a à 3d. Un test de Kruskal-Wallis a révélé des régions spectrales discriminantes dont les attributions sont précisées dans la table 1. Ces régions spécifiques ont été utilisées pour une analyse hiérarchique en cluster (figures 4a à 4c). Les dendrogrammes obtenus mettent en évidence un effet dose-dépendant du

médicament; les spectres correspondant aux faibles doses (0,1 et 1 nM) sont groupés dans un premier cluster, alors que ceux obtenus pour des fortes doses (10 et 100 nM) sont classés dans un second cluster.

Ces résultats démontrent que dans des conditions induisant moins de 25% d'inhibition de croissance, l'effet du médicament n'est pas détecté par spectroscopie IR-TF alors qu'entre 80 et 95% d'inhibition, un effet dose-dépendant est observé. De la même manière, pour chaque dose, nous avons constaté un effet temps-dépendant à partir de 10 nM de gemcitabine (figures 5a à 5d).

En conclusion, la spectroscopie infrarouge à haut débit permet d'évaluer rapidement la réponse d'une population cellulaire tumorale à des doses cytostatiques d'un médicament anticancéreux. Cette étude semble prometteuse pour évaluer l'effet d'un médicament sur des cellules prélevées chez des patients en cours de traitement chimiothérapeutique.

Cependant, dans le cadre de certains prélèvements cliniques tels que les lavages bronchiques, les ponctions cytologiques à l'aiguille fine, le nombre de cellules obtenues est souvent limité. De ce fait, les techniques spectroscopiques doivent pouvoir respecter cette contrainte ; ce qui n'est pas le cas de la spectroscopie IR conventionnelle. En effet, celle-ci est limitée par la faible brillance de sa source qui ne permet pas d'aborder une étude à l'échelle unicellulaire (résolution spatiale de l'ordre de 20 à 25 μm).

La spectroscopie IR à source synchrotron, comme celle disponible sur la ligne SMIS de SOLEIL, peut répondre à cette attente, car sa brillance est 1000 fois supérieure à celle d'une source conventionnelle et permet d'atteindre une résolution subcellulaire de l'ordre de 6 à 10 μm .

A l'échelle de la cellule isolée, des doses de gemcitabine identiques à celles utilisées pour l'étude de populations cellulaires ont été étudiées pour des temps d'incubation de 24 et 48 h. La figure 6 présente les spectres pré-traités et moyennés de 30 cellules individuelles. Après classification hiérarchique ascendante des spectres (figure 7a), on distingue 2 groupes : un premier inclut les spectres de cellules témoins et traitées à 0,1 nM pendant 24 h ; le second, les spectres de cellules exposées aux doses les plus fortes (1, 10, et 100 nM). La même tendance est observée pour une exposition de 48 h au médicament (figure 7b).

Ces résultats sont en accord avec les taux d'inhibition de croissance décrits précédemment (figure 1b) et les informations spectrales obtenues sur populations cellulaires.

Les résultats obtenus dans cette étude ne montrent aucune modification au niveau de la bande phosphate à 1080 cm^{-1} , contrairement à d'autres travaux où l'augmentation du signal des phosphates est corrélée à l'utilisation de fortes doses de gemcitabine (40 mM) (Sulé-Suso, 2005). Cette différence s'expliquerait par le fait que nous utilisons des concentrations de médicament 1000 fois plus faibles.

➤ Spectroscopie Raman

L'effet cytostatique de la gemcitabine sur la croissance des cellules Calu-1 a été déterminé sur quartz, support optique le plus adapté pour l'analyse spectrale Raman de cellules vivantes (Draux *et al.* Analyst 2009). La figure 1 montre que pour un temps d'incubation de 24 h, des concentrations croissantes de gemcitabine (1 ; 10 ; 100 nM et 1 μM) inhibent respectivement la croissance cellulaire de 22, 79, 92 et 98 %. Ces taux d'inhibition de croissance ne changent pas ($p < 0.05$) pour des temps d'incubation plus longs (ex : 48 h).

Des images spectrales Raman de cellules traitées ou non (1 et 100 nM pendant 24 h) ont été reconstruites à partir de spectres de macromolécules extraites de cellules Calu-1 (ADN, ARN et protéines) et d'un phospholipide majeur, la phosphatidylcholine (respectivement figures 2, 3 et 4). On observe que la distribution de l'ADN est conservée lorsque les cellules sont traitées pendant 24 h à 1 nM de gemcitabine. Au contraire, pour des doses plus élevées, la distribution de l'ADN diminue considérablement, ce qui suggère que la synthèse de l'ADN est inhibée, conformément aux données de la littérature (Mini, 2006 ; Wong, 2009). Concernant l'ARN, les protéines et les phospholipidiques, on n'observe aucune variation significative de leur distribution respective.

Afin de préciser, à l'échelle moléculaire, la nature des variations spectrales induites par la gemcitabine, nous avons comparé des spectres de biomolécules types (ADN, ARN, et protéines) de cellules témoins à ceux de cellules traitées. Ces macromolécules ont été extraites à partir de cellules traitées ou non avec 1 et 100 nM de gemcitabine pendant 24 et 48 h.

Les profils spectraux des extraits d'ADN ne présentent aucun décalage en fréquence, mais des variations en intensité au niveau des bandes attribuées aux PO_2^- à 1090 cm^{-1} et aux bases nucléiques à 678, 725, 783, 1251, 1486 et 1574 cm^{-1} (Thomas, 1995) (figure 5). Concernant l'ARN extrait, on observe aucun décalage en fréquence, ni variation d'intensité significative (figure 6). Par contre, les extraits protéiques de cellules traitées présentent un signal Raman plus intense, particulièrement pour les bandes attribuées à la phénylalanine et l'Amide III. Une augmentation très importante du rapport du doublet de Fermi (I_{850}/I_{825}) ainsi qu'un décalage en fréquence significatif de la bande Amide I ont également été observés (figure 7).

Conclusion

Ce travail démontre que des informations spectrales témoignant d'une interaction médicament anticancéreux/cellule peuvent être observées pour des concentrations subtoxiques et des temps d'exposition courts, tant au niveau de populations cellulaires par spectroscopie IR à source conventionnelle qu'au niveau de cellules isolées par microspectroscopie IR à source synchrotron et par microspectroscopie Raman.

A l'échelle cellulaire, ces informations pourraient être précieuses pour la mise en place d'une aide au diagnostic ou au choix du traitement chimiothérapeutique.

III.3.2. Article accepté dans Analytical Bioanalytical Chemistry

Anal Bioanal Chem
DOI 10.1007/s00216-009-3140-y

ORIGINAL PAPER

IR spectroscopy reveals effect of non-cytotoxic doses of anti-tumour drug on cancer cells

Florence Draux · Pierre Jeannesson · Cyril Gobinet · Josep Sule-Suso · Jacck Pijanka · Christophe Sandt · Paul Dumas · Michel Manfait · Ganesh D. Sockalingum

Received: 12 June 2009 / Revised: 10 August 2009 / Accepted: 7 September 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Identifying early cellular events in response to a chemotherapy drug treatment, in particular at low doses that will destroy the highest possible number of cancer cells, is an important issue in patient management. In this study, we employed Fourier transform infrared spectroscopy as a potential tool to access such information. We used as model the non-small cell lung cancer cell line, Calu-1. They were exposed to cytostatic doses (0.1 to 100 nM for 24, 48 and 72 h) of gemcitabine, an anti-tumour drug, currently used in treatment of lung cancer patients. In these conditions, inhibition of cell proliferation ranges from weak ($\leq 5\%$), to moderate ($\sim 23\%$), to high (82–95%) without affecting cell viability. Following drug treatment

as a function of doses and incubation times, the spectra of cell populations and of individual cells were acquired using a bench-top IR source and a synchrotron infrared microscope. It is demonstrated that spectral cell response to gemcitabine is detectable at sublethal doses and that effects observed on cell populations are similar to those from single cells. Using cluster analysis, spectra could be classified in two main groups: a first group that contains spectra of cells exhibiting a weak or moderate proliferation rate and a second group with spectra from cells presenting a high growth inhibition. These results are promising since they show that effects of subtoxic doses can also be monitored at the single-cell level with the clinical implications that this may have in terms of patient benefit and response to chemotherapy.

F. Draux · P. Jeannesson · C. Gobinet · M. Manfait · G. D. Sockalingum (✉)
Unité MeDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6237-MEDyC, UFR de Pharmacie, IFR53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France
e-mail: ganesh.sockalingum@univ-reims.fr

J. Sule-Suso
Cancer Research,
University Hospital of North Staffordshire,
Stoke on Trent ST4 6QG, UK

J. Sule-Suso · J. Pijanka
Institute for Science and Technology in Medicine,
Keele University,
Guy Hilton Research Centre, Thornburrow Drive,
Stoke on Trent ST4 7QB, UK

C. Sandt · P. Dumas
Synchrotron SOLEIL,
L'Orme des Merisiers, BP 48, Saint-Aubin,
91192 Gif sur Yvette, France

Keywords Cell–drug interaction · FT-IR · Synchrotron · Cancer cells · Gemcitabine

Published online: 02 October 2009

 Springer

Introduction

Assessment of cell response to anticancer agents is an important issue in the management of patients with cancer. To date, there is a need for methods that can rapidly evaluate tumor response to chemotherapy in order to give a personalized treatment. Indeed, access to early cellular events in response to drug treatment, and in particular at low doses, would be of utmost importance in view of reducing chemotherapeutic side effects. Such an approach could be envisaged using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, the potential of which for analyzing biological samples, in particular eukaryotic cells, has been widely recognized [1-3]. The great advantage of IR is its unprecedented specificity and sensitivity to molecular and structural changes, which may often be correlated to changes in biological functions. Apart from fundamental studies of biochemical interest, a significant research effort has been devoted to the development of FT-IR imaging, which represents a true “chemical photography” [4], towards distinguishing healthy tissue from malignant and pre-malignant samples for early diagnosis of cancer [1, 5-7]. With advances both in the instrumentation and in multivariate statistics, tumor cell populations with different biological behavior could also be separated [8] and distinction between premalignant and malignant cells could be achieved [9].

In addition, since IR spectroscopy provides a characteristic fingerprint of the main cell constituents, the global effect of a therapeutic agent can be appraised from IR spectra of treated cell populations. For instance, subtle biochemical variations associated to cell growth inhibition that occur in a human prostate cancer cell line when exposed to ouabain, a potential antitumor agent, could be related to cell lipids modifications [10]. Other processes like apoptosis induced by chemotherapeutics have been studied with the aim to establish the signatures of growing cancerous tissue versus successfully treated tissue [11].

In non-small lung cancer, a disease associated with poor prognosis, the chemotherapeutic agent gemcitabine is widely used in the management of patients with this tumor. This drug is a pyrimidine antimetabolite that inhibits DNA replication and repair. It is a pro-drug that is activated by phosphorylation to its monophosphate, diphosphate and triphosphate forms. The final metabolite, gemcitabine triphosphate, serves as the

substrate for the eventual incorporation of gemcitabine into DNA. The insertion of this molecule inhibits DNA synthesis and subsequently stops cell replication (http://www.doctissimo.fr/html/sante/principalespatho/sa_121_cancer_trait.htm). In search to have a rapid and effective method that could predict tumor cell sensitivity to this type of compound, we studied in the present work the effects of subtoxic doses of gemcitabine on a representative model of a human non small lung cancer cells, Calu-1 cell line [13] as a function of time incubation. This study was performed on cell populations using a bench-top instrument as well as on single cells using a synchrotron source at the French Synchrotron Facility SOLEIL (SMIS line) [14]. The aim is two-fold: firstly, to assess if cell response to anticancer drug is detectable at non-cytotoxic doses and secondly, if the same effects are observed both on cell populations and on single cells. Using multivariate statistical methods, spectral profiles of cells during early steps of the treatment were discriminated, and subtle metabolic changes observed, which sheds some light on the chemical modifications induced upon gemcitabine exposure.

Experimental

Cell line

The non-small cell lung cancer cell line (Calu-1) was purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and cultured in Minimum Essential Medium with Earle salts and Glutamax I (MEM; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum, 1% sodium pyruvate, 1% of essential amino-acids and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen) according to the provider's instructions. Culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. Cells were routinely passaged before reaching confluence using 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen) and screened for the presence of mycoplasma using PCR methods.

Gemcitabine

Gemcitabine (Gemzar[®]) (Figure 1a) was obtained from the Reims University Hospital. The drug was available in powder form and reconstituted with 0.9% NaCl to yield a concentration of 100mM. We used 0.9% NaCl as reconstituting agent in order to apply to

our study the same conditions in which the drug is prepared before it is given, intravenously, to patients with lung cancer.

Tumor cell sensitivity to gemcitabine

In order to study lung cancer cells sensitivity to gemcitabine, 2×10^4 cells were seeded in triplicate in 1ml of complete media in 24 well plates. Cells were allowed to attach by incubating them overnight at 37°C and 5% CO₂. Following this incubation period, different doses of gemcitabine (at 0.1, 1, 10, 100nM and control) were added to the wells. Cells were then incubated for 24h, 48h and 72h before carrying out a cell growth inhibition assay by a counting method. Cell viability was assessed by Trypan blue exclusion test.

Sample preparation for High-Throughput measurements on cell populations

After overnight adhesion in 75 cm² culture flasks (seeding at 4×10^3 cells), cells were treated with different concentrations of gemcitabine for 24, 48h and 72h. After drug treatment, the culture medium was removed and cells were detached with 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen) for 5 min. at 37°C and 5% CO₂. Complete medium was added and cells were spun at 400g for 8 min. Supernatant was discarded and cell pellet resuspended in saline. They were then deposited in triplicate at 6×10^6 cells/well on a 96-well Silicon plate (Bruker Optik, Etlingen, Germany). Samples were air-dried prior to the High-Throughput FT-IR transmission measurements.

Single cell preparation for Synchrotron IR measurements

After overnight adhesion in 75 cm² culture flasks as described above, cells were treated with different concentrations of gemcitabine for 24 and 48h. After treatment, the culture medium was removed and cells were detached with 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen) for 5 min at 37°C and 5% CO₂. Complete medium was then added and cells were spun at 1200rpm for 8min. Supernatant was discarded and 5µL of cellular pellet was deposited and spread on zinc selenide substrates (ZnSe) (Ø 13 mm x 1 mm; Crystal GmbH, Berlin, Germany) and spread to form a smear. Samples were air-dried before single cell measurements.

FT-IR bench-top measurements and of cell populations

We used a High-Throughput-Screening EXTension (HTS-XT) device coupled to a Tensor-27 FT-IR spectrometer (Bruker Optik, Ettlingen, France) which performs automatic measurements of samples in transmission mode using a 96-well Silicon-based plate. The advantage of such a device is the rapidity of IR spectral measurements of a large number of samples. In our case, lung cancer cells were seeded on Silicon plate at 6×10^6 cells in triplicate, as previously described. All spectra were recorded at a resolution of 4 cm^{-1} and with 64 co-additions. Spectra were baseline corrected, normalized on the whole spectral window and offset corrected. By comparing the second derivative spectra, the most significant regions were identified (see Table 1) and confirmed using a Kruskal-Wallis test (data not shown). A hierarchical cluster analysis was constructed using the Ward's algorithm on the vector-normalized spectra. The evaluation of growth inhibition was always performed in parallel.

Synchrotron Soleil measurements

IR spectra were recorded on the SMIS beamline of the French Synchrotron Facility SOLEIL (Saint-Aubin, France) using a NIC-plan microscope attached to a Magma FT-IR spectrometer (Thermo-Nicolet) Using a X36 objective, the synchrotron IR beam was focused to a sample area of $15\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$ so as to cover an entire Calu-1 cell. Lung cancer cells were spread on ZnSe slides, as previously described and spectra were recorded using the Omnic software (version 7.3) at a resolution of 6 cm^{-1} and with 64 co-additions. Spectra were baseline corrected, vector-normalized and corrected for offset. Dendrograms were computed using the Ward's algorithm on the normalized mean spectra (average of 30 individual cells).

Results and discussion

Effect of gemcitabine on Calu-1 cell growth

Prior to spectroscopic measurements, it was important to evaluate the growth inhibitory effect of gemcitabine (for structure see Figure 1a) on Calu-1 cells and to determine the cytostatic conditions. These conditions ensure that only cell proliferation is affected and

not cell viability. To do so, cells were incubated with gemcitabine concentrations ranging from 0.1nM to 100nM for 24, 48, and 72h. As can be seen in Figure 1b, the drug concentrations we used (0.1, 1, 10 and 100nM) spans over the cytostatic range with 5, 23, 82, and 95% of cell growth inhibition, respectively, without affecting cell viability since 95-100% of cells were viable at all doses and time points as revealed by Trypan blue exclusion test. In addition, for all concentrations, we observed that longer incubation times (48 and 72h) do not induce further significant inhibitory effect ($p<0.05$).

With these conditions set, we investigated whether FT-IR spectroscopy could detect cellular changes upon exposure to gemcitabine. It is important to note that, in this study, our working conditions are different from those used previously [15] where significantly higher drug concentrations were used.

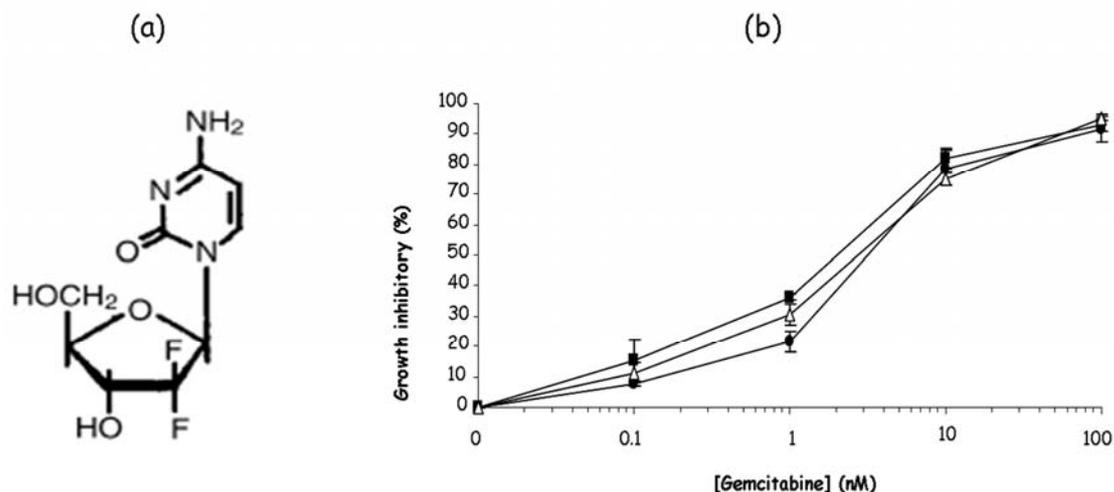


Figure 1: Gemcitabine mediated *in vitro* cytostatic activity. (a) Chemical structure of gemcitabine, (b) Growth inhibitory effect of gemcitabine on Calu-1 cells treated for 24h (circles), 48h (triangles), and 72h (squares). Values represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

IR spectroscopy of control and gemcitabine-treated cell populations

For each experimental condition, FT-IR spectra of control cells were recorded and were found to be reproducible. This can be explained by the fact that the cells were harvested in the exponential phase as has been previously observed [10]. FT-IR spectra of Calu-1 cell populations were also obtained for cells treated with 0.1, 1, 10, and 100nM for 24, 48, and 72h as displayed in Figure 2a, 2b and 2c respectively. These spectra exhibit the classical profile of an IR spectrum of a cell population with distinct spectral regions

corresponding to lipids (2800-3000 cm^{-1}), proteins (1550-1680 cm^{-1}), nucleic acids (1200-1250 cm^{-1}), and polysaccharides (900-1200 cm^{-1}). Visually these spectra look very similar for the lower concentrations (0.1, 1 and 10nM) and subtle variations start appearing for 100nM. These variations are observed in the four major spectral regions mentioned above and increase with exposure time.

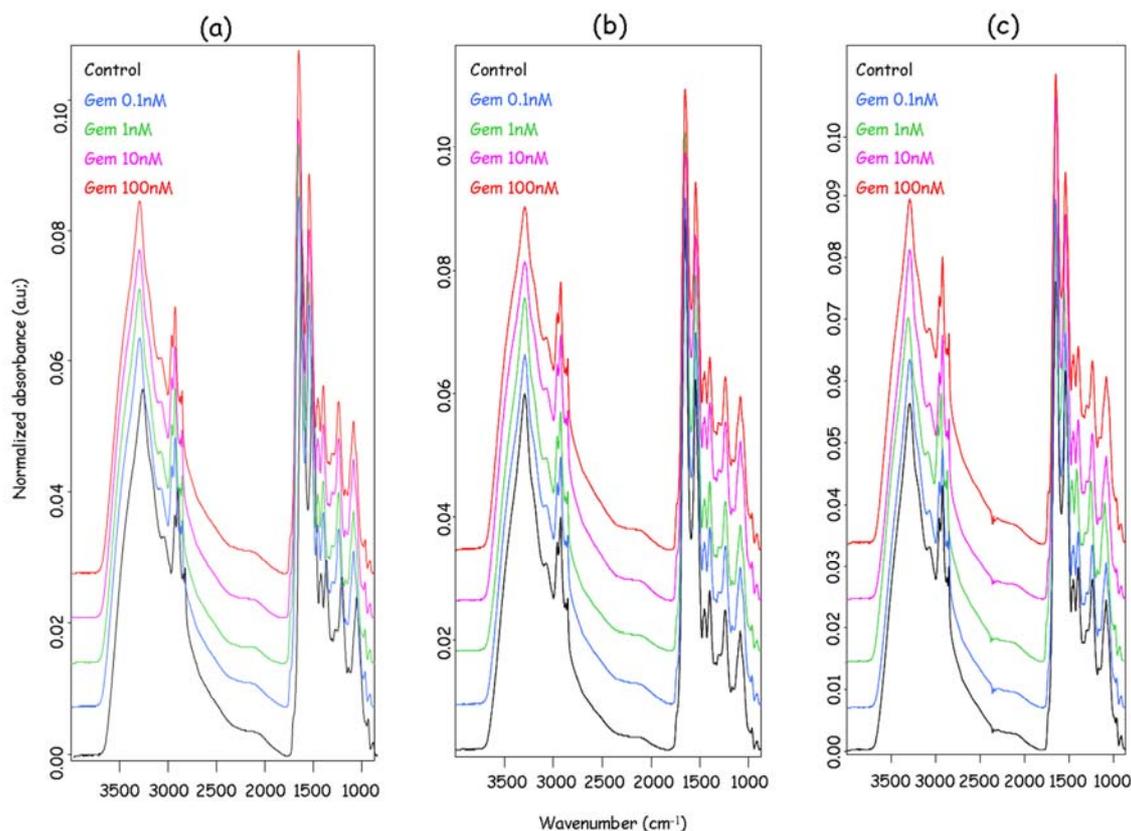


Figure 2: Time- and dose-dependent FT-IR spectral signatures of gemcitabine-treated Calu-1 cell populations. Cells were treated with cytostatic doses of 0.1, 1, 10 and 100nM for (a) 24h, (b) 48h, and (c) 72h. Spectra were normalized and offset for clarity.

These differences are more enhanced when the second derivative spectra are overlaid, as shown for the gemcitabine concentration of 100nM (Figures 3a, b, c and d). In order to determine discriminant spectral regions, we used a Kruskal-Wallis test. Table 1 illustrates the main discriminant spectral windows obtained and their corresponding assignments (discussed below): 3088-3049, 2980-2947, 2937-2909, 2873-2845, 1137-1106 cm^{-1} . Using these specific regions, hierarchical cluster analysis was then computed.

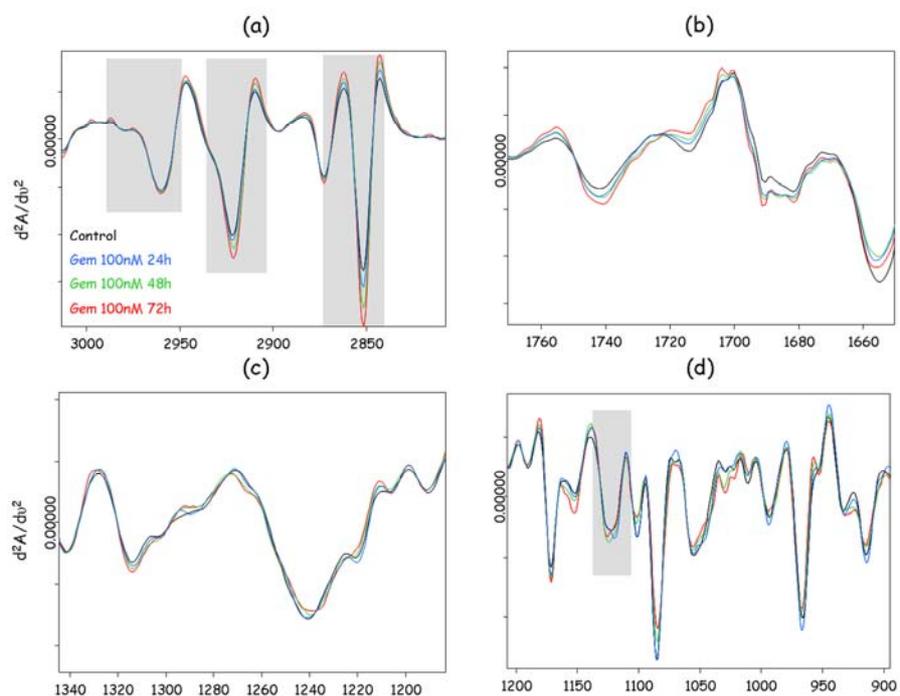


Figure 3: Second derivative FT-IR spectra of gemcitabine-treated Calu-1 cells highlighted for the major macromolecules regions. Cells were treated with 100nM gemcitabine for 24h, 48h, and 72h and effects observed for the (a) lipids, (b) proteins, (c) nucleic acids and (d) polysaccharides regions. Spectral windows shown in grey correspond to the discriminant regions found by the Kruskal-Wallis test.

Table 1 : Assignment of the discriminant spectral regions calculated from the Kruskal-Wallis test.

Frequency (cm ⁻¹)	Assignment
3088 - 3049	$\nu_{(C-H)}$ (C=C-H)
2980 - 2947	$\nu_{as(C-H)}$ (CH ₃)
2937 - 2909	$\nu_{as(C-H)}$ (CH ₂)
2873 - 2845	$\nu_{s(C-H)}$ (CH ₂)
1137 - 1106	$\nu_{(C-O)}$ (ribose)

vas : asymmetric stretching mode; vs : symmetric stretching mode

The results displayed in Figures 4a, b and c for 24, 48 and 72h respectively, show a dose-dependent effect of the drug with an increase in inter-group heterogeneity with time (from 0.2 to 0.8). It can be noticed that for each exposure time, spectra corresponding to control cells and the lower doses (0.1 and 1 nM) always form one cluster, whereas spectra corresponding to higher doses (10 and 100nM) are grouped together in a separate cluster. This distinction between these two clusters seems to be linked to the extent of the growth inhibitory effect as previously described above. From these results, it can be concluded that below 25% of growth inhibition, no effect of the drug is detected, and that in the range of 80-95%, a dose-dependent effect is observed.

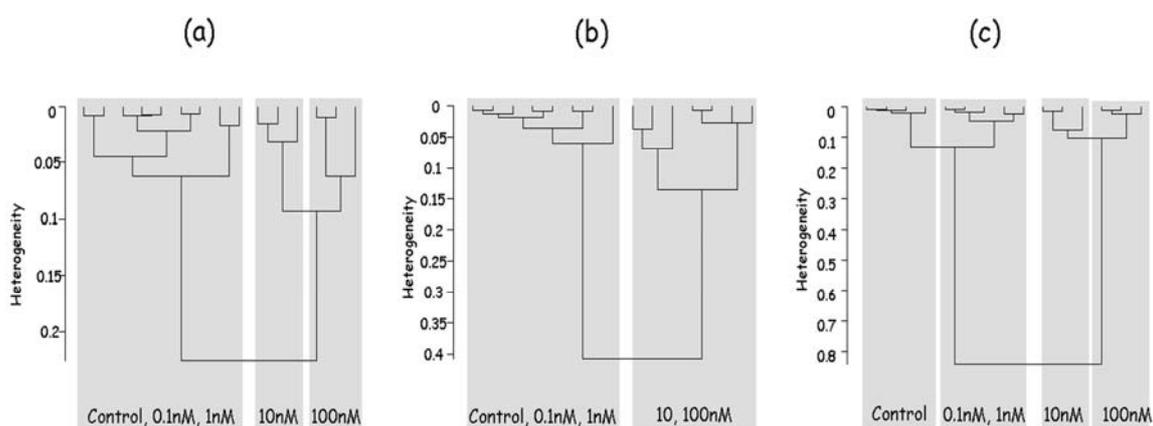


Figure 4: Assessment by hierarchical cluster analysis of the effect of gemcitabine at cytostatic doses on Calu-1 cell populations. FT-IR spectra of Calu-1 control and cells treated at 0.1, 1, 10, 100nM of gemcitabine were acquired for exposition times of (a) 24h, (b) 48h, and (c) 72h.

Similarly, for each dose, we have computed dendrograms in order to compare the time-dependent effect. Data are shown in Figures 5a, b, c and d corresponding respectively to 0.1, 1, 10 and 100nM. The cluster analysis clearly shows an exposure time-dependence for each concentration with a pronounced effect as from 10nM.

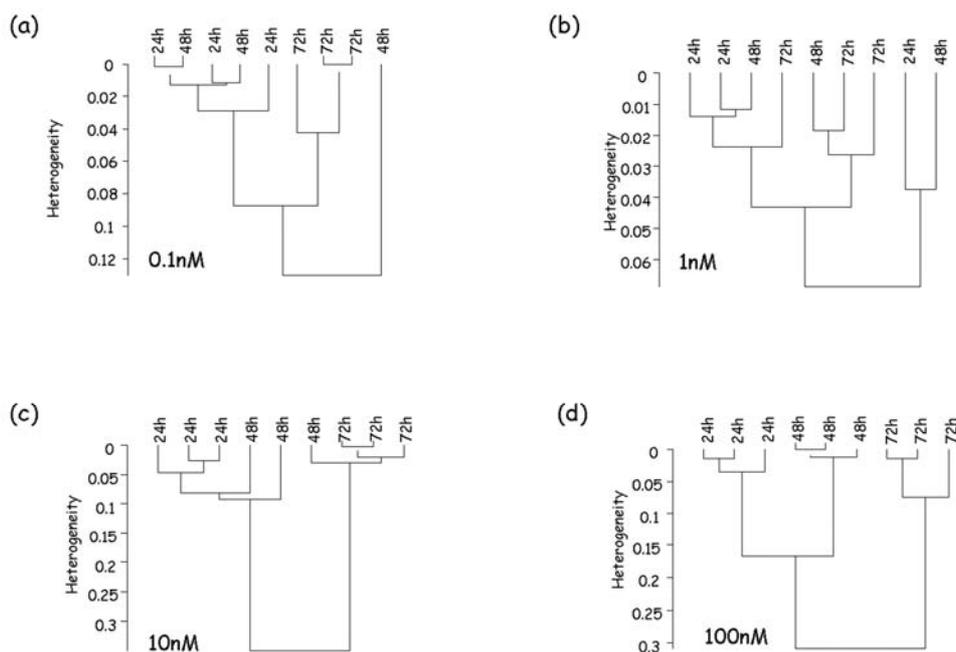


Figure 5: Assessment by hierarchical cluster analysis of the effect of gemcitabine at different exposure times on Calu-1 cell populations. FT-IR spectra were acquired from Calu-1 cells treated for 24h, 48h, and 72h with (a) 0.1nM, (b) 1nM, (c) 10nM, and (d) 100nM of gemcitabine.

Taken together these data demonstrate that the response of Calu-1 cell populations to gemcitabine can be detected from their FT-IR spectra under cytostatic conditions, but it is necessary that the drug induces at least 80% of growth inhibition. Further work examining concentrations in the range 1-10nM producing intermediate effects on growth inhibition is needed to better clarify the threshold giving detectable effects using FT-IR.

IR spectroscopy at the single cell level using a synchrotron source

During the last decade, there has been a growing interest in the development of techniques for single cell studies. The interests for biomedical research are for rapid screening, for understanding biological processes, or for identifying a few abnormal cells in a cell population. IR microscopy with “bench-top” instruments shows its limitations because the spatial resolution is limited by the low source brightness. On the contrary, synchrotron FT-IR microscopy (SIRM) provides higher brightness at a diffraction-limited spatial resolution of 10 μ m or less [16]. It therefore represents a sensitive and non

destructive technique [17] useful for probing single cells and providing molecular information at both cellular [16] and subcellular level [16]. Thus, it has been shown that SIRM can be used to acquire distribution of chemical groups inside living cells [18, 19]. The biological variations due to the presence of an anti-tumor agent were detected using SIRM and the combination with confocal fluorescence microscopy allowed to localize the presence of the drug [20].

In order to investigate whether the effect observed above on cell populations could also be detected at the single cell level, we have analyzed using SIRM, single Calu-1 cells at the SMIS beamline of the French Synchrotron Facility SOLEIL. In this experimental design, we have used the same subtoxic doses of gemcitabine as before (0.1, 1, 10, 100nM and control) but only 2 incubation times (24 and 48h) could be tested during the allocated beamtime. For each experimental condition, spectra of 30 individual cells were recorded, pre-processed (see Materials and Methods), and averaged as displayed in Figures 6a and b. Surprisingly, these single cell transmission spectra do not exhibit the Mie scattering usually observed and for this reason, the pre-processing did not include Mie scattering correction as described recently [21]. After visual observation of the spectra, differences between the several treatments can hardly be seen. In the same way as for cell population, hierarchical classifications were used to emphasize the differences. Again we used the spectral window ($3131 - 2817 \text{ cm}^{-1}$), which is commonly assigned to C-H and =C-H stretching.

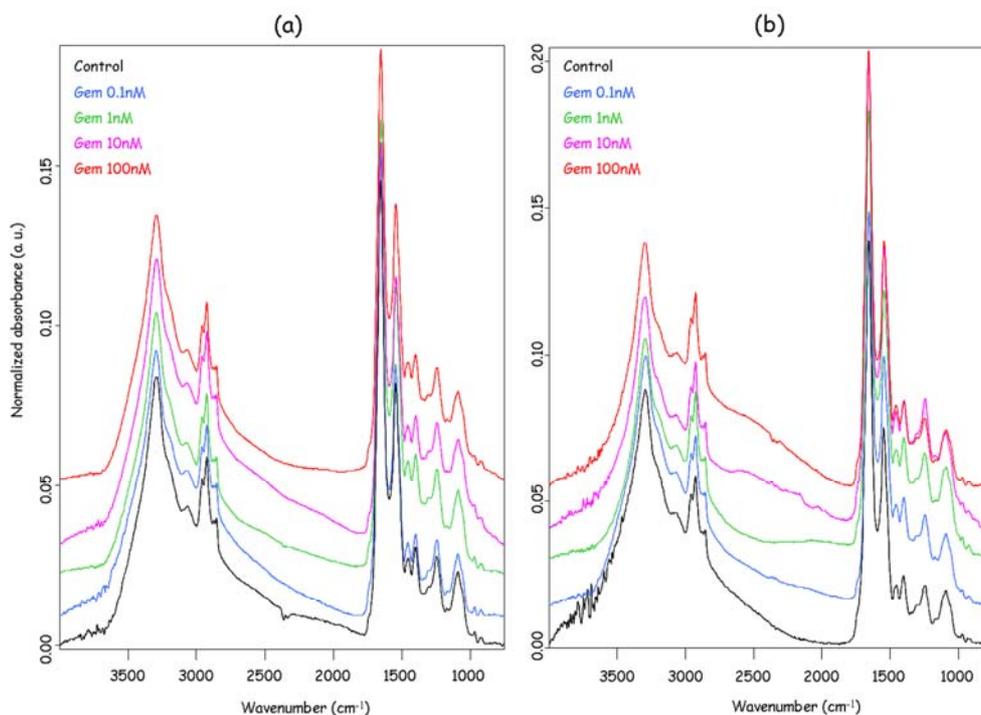


Figure 6: Synchrotron FT-IR spectra of single gemcitabine-treated Calu-1 cells. Cells were treated with cytostatic doses of 0.1, 1, 10 and 100nM for (a) 24h and (b) 48h. Spectra were averaged (mean of 30 individual cells), normalized, and offset for clarity.

As can be seen in figure 7, spectra are clustered in the same way as for cell populations. Indeed, for both incubation times of 24 and 48h, spectra are separated in two groups. In figure 7a, the first cluster includes spectra from control cells and cells treated for 24h with 0.1nM, the lowest dose. The second cluster groups spectra from cells exposed to higher doses (1, 10, and 100nM). These results are in agreement with the growth inhibition rates previously described (figure 1b) and the spectral information obtained from cell populations. Similar results are observed at 48h as shown in figure 7b. As previously observed for cell populations, we also noticed an increase in the intergroup heterogeneity between 24 and 48h (from 0.07 to 0.09). These results confirm at the single cell level the observations previously described for cell population, i.e., spectral modifications associated with drug concentrations and exposure times.

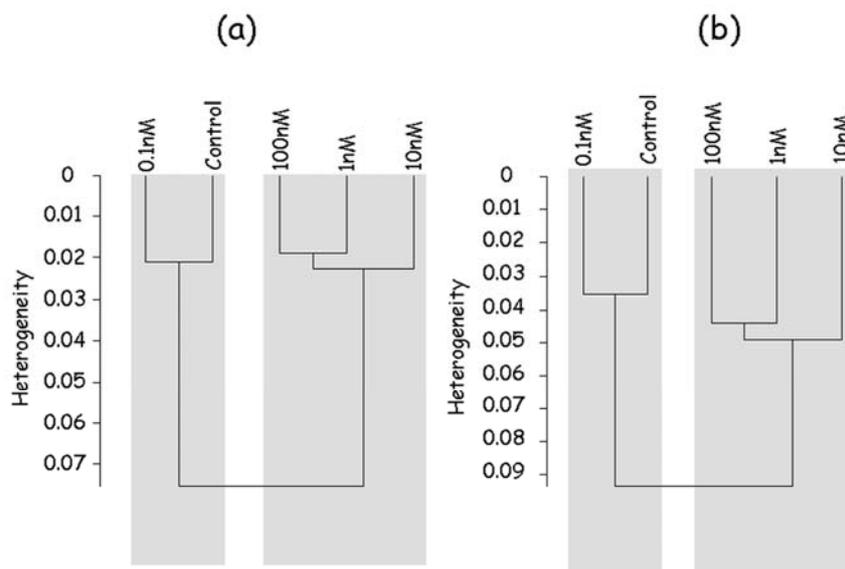


Figure 7: Assessment by hierarchical cluster analysis of the effect of gemcitabine at cytostatic doses on Calu-1 single cells. Synchrotron FT-IR spectra of Calu-1 control and cells treated at 0.1nM, 1nM, 10nM, and 100nM of gemcitabine were acquired for exposition times of (a) 24h and (b) 48h.

Intracellular pharmacokinetics and molecular mechanism of gemcitabine

As mentioned earlier, active gemcitabine binds DNA in its triphosphate form causing progressive arrest of cell proliferation. In our experiments, no modification was observed at the level of phosphate band at 1080 cm^{-1} , which is in accordance with the low drug concentrations used. This contrasts with previous findings where an increase in PO_2^- signal was observed and directly correlated with a higher dose of the drug used (40mM) and consequently of the active triphosphate form [15].

The discriminant regions (described in Table 1) are commonly assigned in the literature to C-H symmetric and asymmetric stretching of CH_2 and CH_3 [5, 6, 22], stretching of C-H of $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ of alkenes and C-O stretching of ribose [22]. These molecular vibrations are found to increase for gemcitabine treated cells, and could be correlated in part to certain aspects of the molecular mechanism of the drug on cell functions. Indeed, gemcitabine is known to accumulate the cells in G1 phase [23], where transcription and translation are activated; which could explain the increase in the characteristic bands of proteins and RNA.

Conclusion

The present work demonstrates that spectral information can be acquired from tumour cells treated with low doses of a chemotherapeutic drug. In a perspective of future oncology, this could lead to applications of this biophotonic approach in the field of metronomic chemotherapy and new modality of drug administration. Indeed, one of the aims in the management of patients with cancer is to deliver a dose of chemotherapy drug(s) that will kill the maximum number of cancer cells with the least side effects. This is a difficult compromise and, at present, it is not possible to know the most appropriate dose and combination of chemotherapy drug(s) for each individual patient. Therefore, studies that shed light on the exact dose at which a chemotherapy agent becomes cytotoxic (cell killing) rather than just cytostatic (inhibition of proliferation) will help to tailor chemotherapy regimens to each individual patient.

Acknowledgements

This work was supported by Ligue contre le Cancer, Comité de la Marne. FD is a recipient of doctoral fellowship from Région Champagne-Ardenne. Supports from the Erasmus Mobility Programme, British Council, 2007/2008 and synchrotron SOLEIL project no. 99080031_20080371 are also acknowledged.

References

1. Cohenford MA & Rigas B (1998) Cytologically normal cells from neoplastic cervical samples display extensive structural abnormalities on IR spectroscopy: implications for tumor biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15327-15332
2. Diem M, Romeo M, Boydston-White S, Miljkovic M & Matthaus C (2004) A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004). *Analyst* 129: 880-885
3. Kuimova MK, Chan KL & Kazarian SG (2009) Chemical imaging of live cancer cells in the natural aqueous environment. *Appl Spectrosc* 63: 164-171
4. Kazarian SG & Chan KLA (2003) "Chemical Photography" of Drug Release. *Macromolecules* 36: 9866-9872
5. Baker MJ, Gazi E, Brown MD, Shanks JH, Clarke NW & Gardner P (2009) Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer. *J Biophotonics* 2: 104-113
6. Baker MJ, Gazi E, Brown MD, Shanks JH, Gardner P & Clarke NW (2008) FT-IR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer. *Br J Cancer*. 99: 1859-1866
7. Wood BR, Quinn MA, Tait B, Ashdown M, Hislop T, Romeo M & McNaughton D (1998) FTIR microspectroscopic study of cell types and potential confounding variables in screening for cervical malignancies. *Biospectroscopy* 4: 75-91
8. Gaigneaux A, Decaestecker C, Camby I, Mijatovic T, Kiss R, Ruyschaert JM & Goormaghtigh E (2004) The infrared spectrum of human glioma cells is related to their in vitro and in vivo behavior. *Exp Cell Res* 297: 294-301
9. Sahu RK & Mordechai S (2005) Fourier transform infrared spectroscopy in cancer detection. *Future Oncol* 1: 635-647
10. Gasper R, Dewelle J, Kiss R, Mijatovic T & Goormaghtigh E (2009) IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbamem.2009.02.016:

11. Liu K, Jia L, Kelsey S, Newland A & Mantsch H (2001) Quantitative determination of apoptosis on leukemia cells by infrared spectroscopy. *Apoptosis*. 6: 269-278
12. Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I & Mazzei T (2006) Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* 17 Suppl 5: v7-12
13. Edelman MJ, Quam H & Mullins B (2001) Interactions of gemcitabine, carboplatin and paclitaxel in molecularly defined non-small-cell lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 48: 141-144
14. Dumas P, Polack F, Lagarde B, Chubar O, Giorgetta J & Lefrançois S (2006) Synchrotron infrared microscopy at the French Synchrotron Facility SOLEIL. *Infrared Physics & Technology* 49: 152-160
15. Sulé-Suso J, Skingsley D, Sockalingum GD, Kohlere A, Kegelaerd G, Manfait M & El Haj AJ (2005) FT-IR microspectroscopy as a tool to assess lung cancer cells response to chemotherapy *Vibrational Spectroscopy* 38: 179-184
16. Dumas P, Sockalingum GD & Sule-Suso J (2007) Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends Biotechnol* 25: 40-44
17. Holman HY, Bjornstad KA, McNamara MP, Martin MC, McKinney WR & Blakely EA (2002) Synchrotron infrared spectromicroscopy as a novel bioanalytical microprobe for individual living cells: cytotoxicity considerations. *J Biomed Opt* 7: 417-424
18. Jamin N, Dumas P, Moncuit J, Fridman WH, Teillaud JL, Carr GL & Williams GP (1998) Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4837-4840
19. Jamin N, Miller L, Moncuit J, Fridman WH, Dumas P & Teillaud JL (2003) Chemical heterogeneity in cell death: combined synchrotron IR and fluorescence microscopy studies of single apoptotic and necrotic cells. *Biopolymers* 72: 366-373
20. Chio-Srichan S, Refregiers M, Jamme F, Kascakova S, Rouam V & Dumas P (2008) Photosensitizer effects on cancerous cells: a combined study using synchrotron infrared and fluorescence microscopies. *Biochim Biophys Acta* 1780: 854-860

21. Kohler A, Sule-Suso J, Sockalingum GD, Tobin M, Bahrami F, Yang Y, Pijanka J, Dumas P, Cotte M, van Pittius DG, Parkes G & Martens H (2008) Estimating and correcting mie scattering in synchrotron-based microscopic fourier transform infrared spectra by extended multiplicative signal correction. *Appl Spectrosc* 62: 259-266
22. Colley CS, Kazarian SG, Weinberg PD & Lever MJ (2004) Spectroscopic imaging of arteries and atherosclerotic plaques. *Biopolymers* 74: 328-335
23. Bergman AM, Pinedo HM & Peters GJ (2002) Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist Updat* 5: 19-33

III.3.3. Article en préparation

**Raman imaging of single living cancer cells: Probing effects of
an antitumor drug**

**Florence DRAUX¹, Cyril GOBINET¹, Ali TFAYLI¹, Josep SULE-SUSO^{2,3}, Michel
MANFAIT¹, Pierre JEANNESSON¹ and Ganesh D. SOCKALINGUM¹.**

¹Unité MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6237 - MEDyC, UFR de Pharmacie, IFR53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.

²Staffordshire Oncology Centre, University Hospital of North Staffordshire, Stoke on Trent, UK.

³Institute for Science and Technology in Medicine, Keele University, Guy Hilton Research Centre, Thornburrow Drive, Stoke on Trent ST4 7QB., UK.

Corresponding author:

Dr. Ganesh D. Sockalingum

**Unité MEDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR 6237
UFR de Pharmacie, IFR53, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France.**

Mail: ganesh.sockalingum@univ-reims.fr

Phone: +33 326913553 Fax: +33 326913550

Abstract

To date, chemotherapy treatment is based on a "one for all" approach, which does not take into account individual patient response to a given drug or combination of drugs. Identifying cell response to a chemotherapy drug treatment, in particular at the single cell level, is an important issue in patient management and treatment. In this study, we aimed at probing the effect of gemcitabine on single living cells using micro-Raman imaging. We used as model the non-small lung cancer cell line, Calu-1 exposed to cytostatic doses (1nM to 1 μ M for 24h and 48h) of gemcitabine, an antitumor drug, currently used in treatment of lung cancer patients. For each dose and time point, Raman maps of isolated living cells were acquired and reconstructed using spectra of cellular extracted biomolecules (DNA, RNA, and proteins) and a phospholipid, phosphatidylcholine, to evaluate their cellular distribution. It was found that DNA distribution decrease considerably, RNA distribution show a weak decrease, and protein and phospholipids distribution do not present significant variations. The comparison of spectral signature of these macromolecules were compared and revealed variations in the PO₂⁻ and nucleic acids bands for both DNA and RNA, and in the intensity of the whole spectra for proteins.

Keywords: cell-drug interaction, Raman mapping, cancer cells, gemcitabine, extracted macromolecules

Introduction

The last decade has witnessed an increasing number of applications of vibrational spectroscopy in biomedical sciences as clinical tool for cancer diagnosis^{1, 2} since it provides molecular level information. Thus, Raman spectroscopy (RS) has been widely applied for the distinction between fixed or fresh healthy tissues or cell populations for differentiating between malignant and pre-malignant samples for early diagnosis of cancer. The discrimination is mainly based on proportions of nucleic acids and proteins bands³⁻⁶ and on a different distribution of macromolecules^{7, 8}. The great advantage of RS is its unprecedented specificity and sensitivity to molecular and structural changes, which may often be correlated to changes in biological functions. Therefore, the global effect of a therapeutic agent can be appraised from the Raman spectral features of treated cells⁹⁻¹¹. In the same way, identification of cell drug resistance phenotype is also an important issue in the management of patients with cancer^{12, 13}. Moreover, RS presents several advantages such as being non-invasive, non-destructive, and can provide high spatially resolved images without external markers. Raman microspectroscopy presents another advantage when compared to infrared spectroscopy. Because water has only a weak Raman spectrum, in case of biological samples, spectral information can be recorded in living conditions. It was assessed that RS combined with statistical methods could detect subtle biochemical differences between living normal and cancer cells¹⁴⁻¹⁹. Spatial resolution provides by RS allows mapping single cells. The biochemical composition of the cellular regions has been studied and used for the distinction of different cell compartments: nucleus, cytoplasm, organelles, mitochondria, ...²⁰⁻²².

Gemcitabine (2'2'-difluorodeoxycytidine, for structure see Figure 1a) is an anticancer drug commonly used in the treatment of non-small lung cancer patients. This pyrimidine antimetabolite inhibits DNA replication and repair. This drug needs to be activated in its triphosphorylated metabolite which serves as the substrate for the eventual incorporation of gemcitabine into DNA²³.

In a previous work, the detection of cell response to subtoxic doses of gemcitabine was observed both on cell populations and at the single cell level using infrared spectroscopy. In contrast to the FIIR spectroscopy, here the cell response to the drug is assessed in living cell conditions using Raman spectroscopy. Raman spectral maps of control and

gemcitabine-treated isolated living cells have been recorded and analysed. Spectral biomarkers obtained from major macromolecules extracted from untreated and treated cells and from a phospholipid were used to evaluate their cellular distribution for each time point and treatment condition. Then, in order to characterize at the molecular level the effect of gemcitabien treatment on these macromolecules, their Raman spectral features of the extracted macromolecules were compared.

Experimental

Cell line

The non-small cell lung cancer cell line (Calu-1) was purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and cultured in Minimum Essential Medium with Earle salts and Glutamax I (MEM; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum, 1% sodium pyruvate, 1% of essential amino-acids and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen) according to the provider's instructions. Culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂. Cells were routinely passaged before reaching confluence using 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA (Invitrogen) and screened for the presence of mycoplasma using PCR methods.

Gemcitabine

Gemcitabine (Gemzar[®]) (for structure see Figure 1a) was obtained from the Reims University Hospital. The drug was available in powder form and reconstituted with 0.9% NaCl to yield a concentration of 100mM. We used 0.9% NaCl as reconstituting agent in order to apply to our study the same conditions in which the drug is prepared before it is given, intravenously, to patients with lung cancer.

RNA extracted from cancer cells using TRIzol[®] Reagent

Total RNAs from Calu-1 cells were isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Abingdon, UK) in accordance to the manufacturer's protocol²⁵. A pellet of 1 – 2.10⁶ cells previously washed with cold Phosphate Buffered Saline (PBS; Invitrogen) is homogenized in 1mL of TRIzol[®] Reagent and incubated for 5min at 4°C. After this

procedure, 200µL chloroform was added to the tube and the solution was centrifuged for 15 min at 12 000×g. The aqueous phase was transferred to a clean tube, precipitated with 500 µL isopropyl alcohol, and centrifuged for 10 min at 12 000×g. The resulting pellet was then suspended in 70% cold ethanol and centrifuged for 5 min at 12 000×g. The pellet was dried at room temperature, resuspended in 200µL of Ultra-Pure DNase/RNase free H₂O, and stored at -20 °C. The extracted RNA was subjected to electrophoresis on 2% agarose gel and bands were visualized by UV transillumination using ethidium bromide staining.

DNA extracted from cancer cells using MINI kit QIamp® DNA

DNA was isolated from Clau-1 cells using the MINI kit QIamp® DNA (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions ²⁶. 200µL of sample (5.10⁶ cells) were incubated in a protease/Lysis buffer mixture (200 µL Qiagen Protease/2.4 ml buffer AL) for 10 minutes at 56°C in a 1.5 ml conical tube. 2 ml absolute ethanol were added to the lysate and the tube was mixed by vigorous shaking (vortexing). The lysate/ethanol mixture was transferred to a QIamp Spin column placed in a clean 2 ml conical tube. The column was centrifuged at 6000 × g for 1min. The filtrate was discarded, the column was washed with 500µL of buffer AW1 and centrifuged for 1min at 6000 × g. The column was washed a second time with 500µL of buffer AW2 and centrifuged for 3min at 6000 × g to ensure complete drying. DNA was eluted from the column into a clean 1.5 ml conical tube by adding 200µL buffer AE to the column, incubating at room temperature for 1min, and centrifuging for 1min at 6000 × g. The extracted DNA was subjected to electrophoresis on 2% agarose gel and bands were visualized by UV transillumination using ethidium bromide staining.

Total protein extraction

Total proteins were isolated using lysis buffer (10 mM Tris (pH 7.4) + 0.1% Triton X-100). A pellet of 4.10⁶ cells was resuspended in 5mL ice-cold PBS (Invitrogen) and centrifugated for 5min at 600 × g. The filtrate was discarded, the pellet resuspended in extraction buffer and centrifugated for 10min at 4000 × g. The upper phase was transferred to a new centrifuge tube and 4 volumes iced-cold acetone were added and

incubated 15min on ice. After centrifugation for 10min at $4800 \times g$, the filtrate was discarded and pellet was air-dried. Finally, the protein pellet was resuspended in DNase/RNase free H₂O and stored at -20°C .

Tumor cell sensitivity to gemcitabine

In order to study lung cancer cells sensitivity to gemcitabine, 2×10^4 cells were seeded in triplicate in 1mL of complete media in 24 well plates. For collagen gels, cells 2×10^4 cells were seeded in triplicate in 0.5mL of complete media in 24 well plates containing collagen gel. Cells were allowed to attach by incubating them overnight at 37°C and 5% CO₂. Following this incubation period, different doses of gemcitabine (at 0.1, 1, 10, 100nM and control) were added to the wells. Cells were then incubated for 24h and 48h before carrying out a cell growth inhibition assay by a counting method. Cell viability was assessed by Trypan blue exclusion test.

Raman mapping measurements at the single living cell

Raman mapping of single living Calu-1 cells in exponential phase growth were acquired on quartz and collagen gel seeded at 50×10^3 cells/ml and incubated overnight at 37°C to allow cell attachment. Prior to Raman measurements, samples were both washed and quartz slides were immersed in a Petri dish containing saline at 20°C . The confocal pinhole was adjusted at 150 μm . Raman spectral imaging were acquired in the 580–1750 cm^{-1} range with a 3 μm step and an acquisition time of 2×10 sec for each point. All spectral acquisitions were carried out using the Labspec 4.18 software (Horiba Jobin Yvon).

Data pre-processing and image analysis

Spectral pre-processing and analysis were performed using homemade software that operates in the Matlab environment (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts). Several corrections were applied on the raw spectral data, and the effect on the spectra can be seen in Figure 1. First of all, in order to avoid spectral shifts due to the instrument, a peak alignment was performed on the whole data set following the method described by Tfayli *et al.*²⁷. Then, in order to reduce the influence of the instrument response, Raman

spectra were corrected for dark current and detector response, for noise using a Savitsky-Golay smoothing, and spectra with no significant signal (area under peak 1420-1500 < 0.15) were discarded. The distribution of the major macromolecules was evaluated on these corrected images, with the substrate contribution included in the correlation (in order to minimize the error).

Results and discussion

Growth inhibitory effect of gemcitabine on Calu-1 cell cultured on quartz

Cytostatic effect of gemcitabine (for structure see Figure 1a) on Calu-1 cell growth was evaluated on quartz, which was shown to be the most adapted optical substrate for Raman spectral analysis on living cells²⁰. Figure 1b shows that for 24 h of exposition time, gemcitabine concentrations ranging from 1nM to 1μM respectively inhibit cellular growth 22, 79, 92 and 98%, without affecting cell, as revealed by Trypan blue exclusion test. In addition, for all concentrations, we observed that a longer exposition to the anticancer drug (48h) does not induce any further significant inhibitory effect ($p < 0.05$).

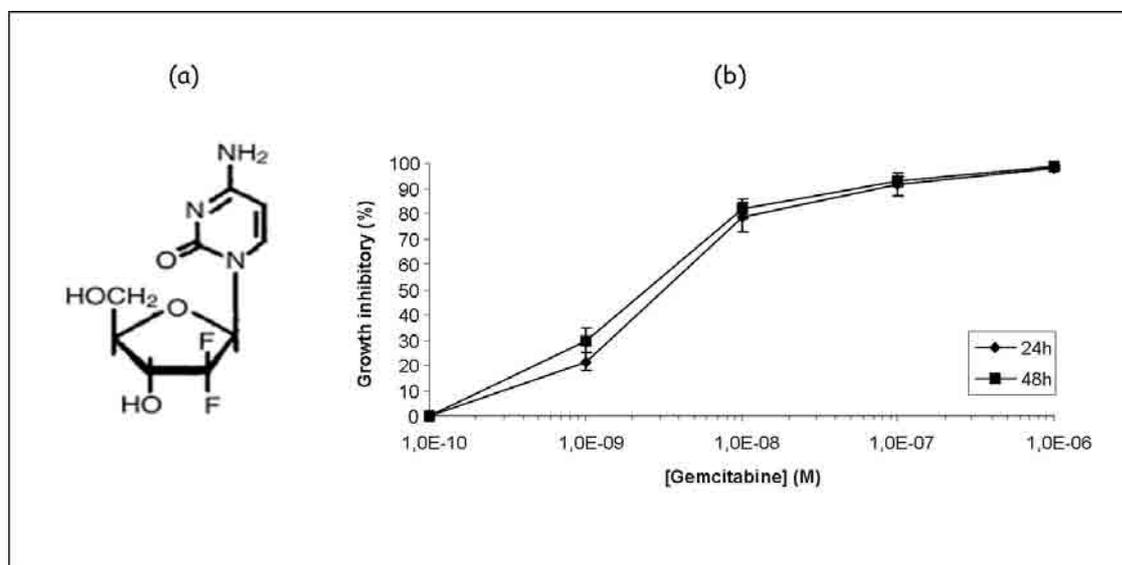


Figure 1: Gemcitabine-mediated *in vitro* cytostatic activity. (a) Chemical structure of gemcitabine, (b) Growth inhibitory effect of gemcitabine on Calu-1 cells treated for 24h (circles), and 48h (squares). Values represent the mean \pm SEM of three independent experiments.

Raman mapping of single cells: distribution of the extracted cellular macromolecules and phosphatidylcholine

Raman spectral images of control and treated cells (1 and 100nM for 24h) were reconstructed using spectra of extracted biomolecules (DNA, RNA, and proteins) and a major phospholipid, phosphatidylcholine (respectively figures 2, 3, and 4). It can be observed that DNA distribution is conserved for cells treated with 1nM of gemcitabine for 24h. On the contrary, for 100nM, DNA distribution decreases considerably, which suggest a DNA synthesis inhibition in accordance with literature²³. Concerning RNA, proteins and phospholipids distributions, they are not significantly affected.

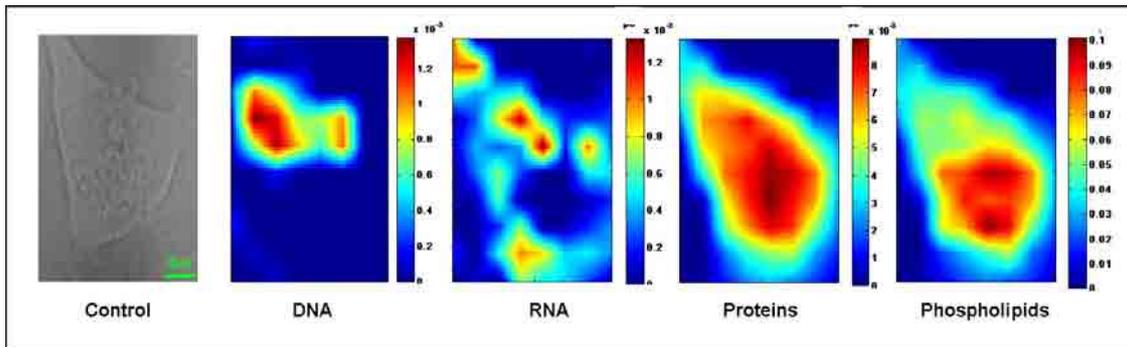


Figure 2: Visible image and cellular distribution of major macromolecules (extracted DNA, RNA, proteins, and phospholipid) in a Calu-1 control cell.

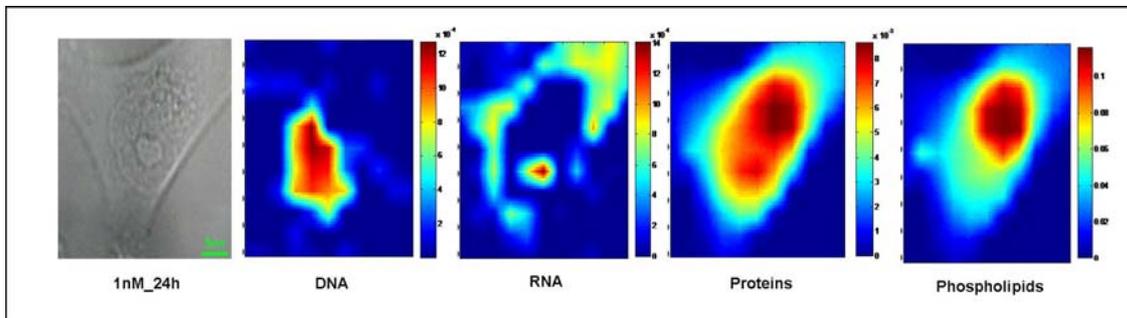


Figure 3: Visible image and cellular distribution of major macromolecules (extracted DNA, RNA, proteins, and phospholipid) in a Calu-1 cell exposed to 1nM of gemcitabine for 24h.

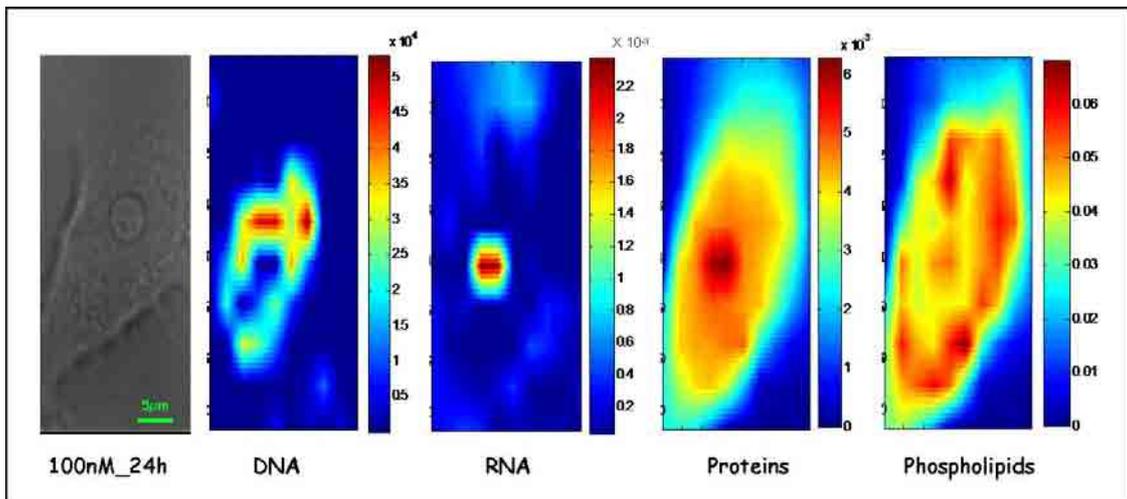


Figure 4: Visible image and cellular distribution of major macromolecules (extracted DNA, RNA, proteins, and phospholipid) in a Calu-1 cell exposed to 100nM of gemcitabine for 24h.

Raman profiles of cellular extracted biomolecules of control and gemcitabine-treated Calu-1 cells

In order to characterize at the molecular level, the spectral variations induced by gemcitabine, we compared biomolecules spectra (DNA, RNA, and proteins) from control and treated cells. These biomolecules were extracted from control and treated cells with 1 and 100nM of gemcitabine for 24 and 48h.

Spectral features of extracted DNA show changes in the PO_2^- band at 1090 cm^{-1} which is more intense in presence of gemcitabine, in particular with 100nM for 48h (figure 5)²⁹. Shifts in frequency were not observed as well as in RNA spectra. These latter do not show significant variations (figure 6). Raman spectra of cellular protein extracts of treated cells are more intense when compared to control, especially for the phenylalanine and Amide III peaks. Moreover, the Fermi doublet ratio, associated to the secondary structure, increases from 100nM of gemcitabine for 24h and a significant shift is observed in the Amide I band (figure 7).

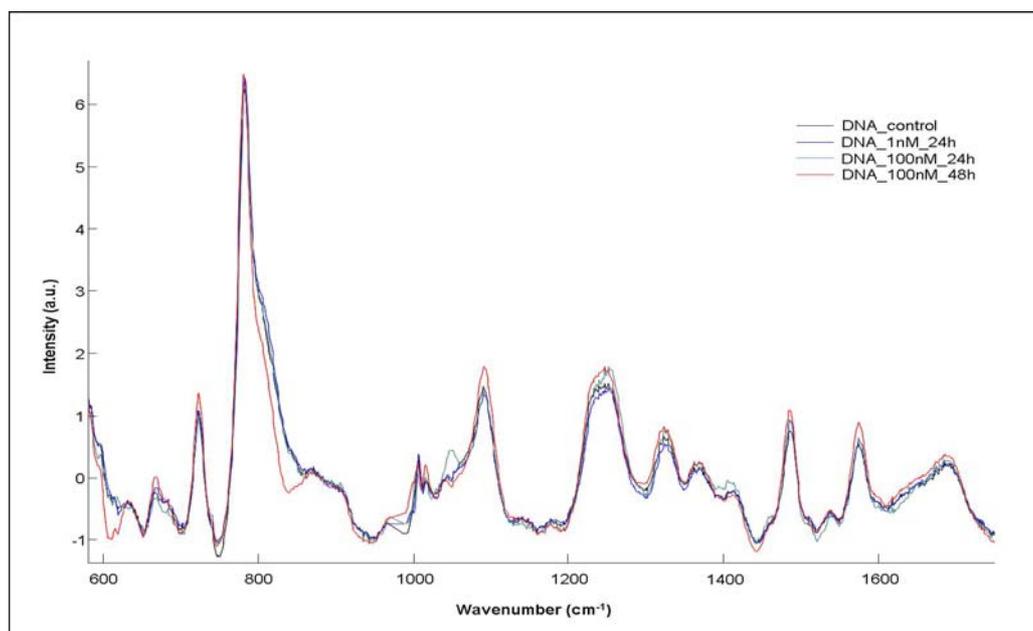


Figure 5: Raman spectral profile of DNA extracted from control cells and cells treated with 1nM for 24h and 100nM for 24 and 48h.

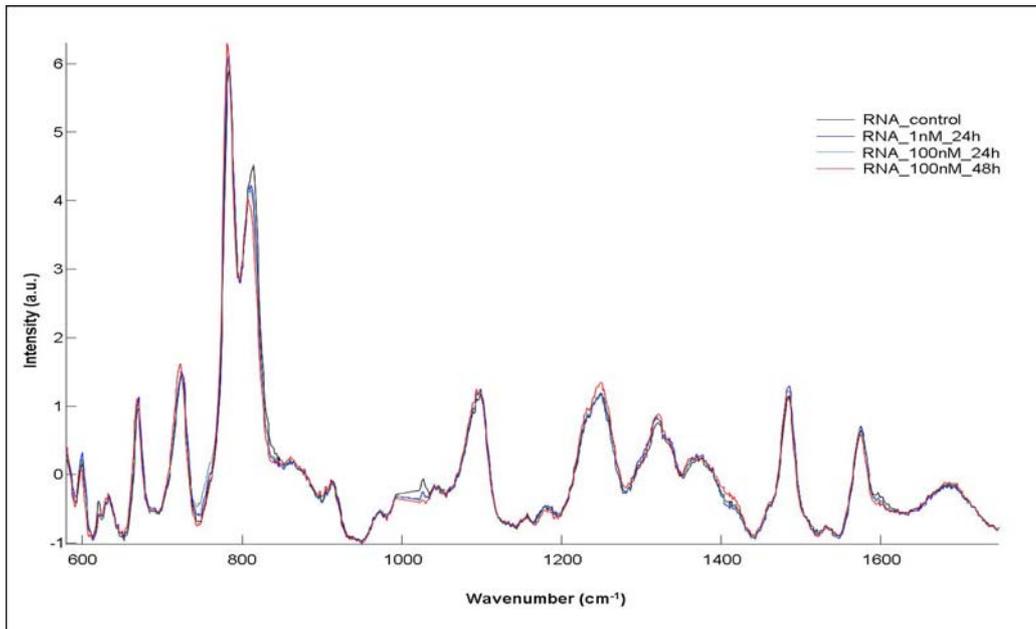


Figure 6: Raman spectral profile of RNA extracted from control cells and cells treated with 1nM for 24h and 100nM for 24 and 48h.

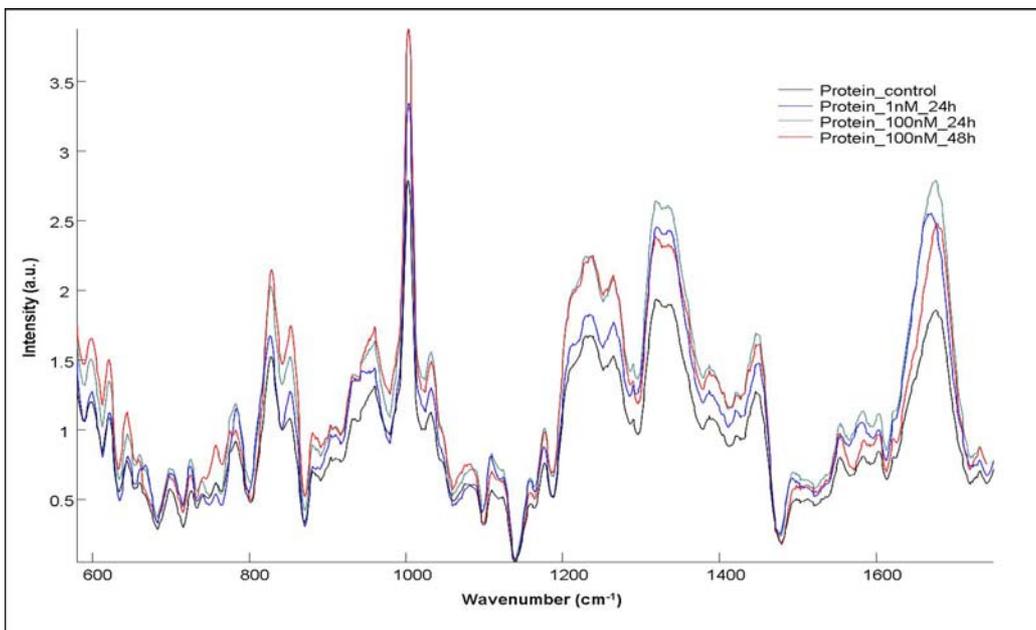


Figure 7: Raman spectral profile of total protein extracted from control cells and cells treated with 1nM for 24h and 100nM for 24 and 48h.

Conclusion

The present work assessed the effect of an anticancer drug, gemcitabine, on Calu-1 cells using micro-Raman imaging. The variations observed in the cellular distribution of major macromolecules in control and treated cells showed changes in the DNA and RNA cellular distribution. These results were confirmed by the comparison of extracted macromolecules which showed that the drug induce changes in the DNA and RNA spectral features.

Acknowledgements

This work was supported by Ligue contre le Cancer, Comité de la Marne. FD is a recipient of doctoral fellowship from Région Champagne-Ardenne. Supports from the Erasmus Mobility Programme, British Council, 2007/2008.

References

- 1 C. Kendall, M. Isabelle, F. Bazant-Hegemark, J. Hutchings, L. Orr, J. Babrah, R. Baker and N. Stone, 'Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics', Analyst, 2009, 134, 1029-45.
- 2 C. Krafft and V. Sergo, 'Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues', Spectroscopy, 2006, 20, 195-218.
- 3 A. P. Oliveira, R. A. Bitar, L. Silveira, R. A. Zangaro and A. A. Martin, 'Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis', Photomed Laser Surg, 2006, 24, 348-53.
- 4 A. Taleb, J. Diamond, J. J. McGarvey, J. R. Beattie, C. Toland and P. W. Hamilton, 'Raman microscopy for the chemometric analysis of tumor cells', J Phys Chem B, 2006, 110, 19625-31.
- 5 R. A. Bitar, S. Martinho Hda, C. J. Tierra-Criollo, L. N. Zambelli Ramalho, M. M. Netto and A. A. Martin, 'Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy', J Biomed Opt, 2006, 11, 054001.
- 6 K. W. Short, S. Carpenter, J. P. Freyer and J. R. Mourant, 'Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures', Biophys J, 2005, 88, 4274-88.
- 7 M. A. Short, H. Lui, D. McLean, H. Zeng, A. Alajlan and X. K. Chen, 'Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy', J Biomed Opt, 2006, 11, 34004.
- 8 G. Shetty, C. Kendall, N. Shepherd, N. Stone and H. Barr, 'Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus', Br J Cancer, 2006, 94, 1460-4.
- 9 J. Ling, S. D. Weitman, M. A. Miller, R. V. Moore and A. C. Bovik, 'Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of a drug', Appl Opt, 2002, 41, 6006-17.
- 10 I. Notingher, J. Selvakumaran and L. L. Hench, 'New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells', Biosens Bioelectron, 2004, 20, 780-9.

- 11 C. A. Owen, J. Selvakumaran, I. Notingher, G. Jell, L. L. Hench and M. M. Stevens, 'In vitro toxicology evaluation of pharmaceuticals using Raman micro-spectroscopy', J Cell Biochem, 2006, 99, 178-86.
- 12 C. M. Krishna, G. Kegelaer, I. Adt, S. Rubin, V. B. Kartha, M. Manfait and G. D. Sockalingum, 'Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines', Biopolymers, 2006, 82, 462-70.
- 13 C. Murali Krishna, G. Kegelaer, I. Adt, S. Rubin, V. B. Kartha, M. Manfait and G. D. Sockalingum, 'Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational spectroscopy', Biochim Biophys Acta, 2005, 1726, 160-7.
- 14 J. W. Chan, D. S. Taylor, T. Zwerdling, S. M. Lane, K. Ihara and T. Huser, 'Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells', Biophys J, 2006, 90, 648-56.
- 15 K. Chen, Qin, Y., Zheng, F., Sun, M., Shi, D., 'Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells', Opt Lett., 2006, 31, 2015-7.
- 16 J. R. Mourant, J. Dominguez, S. Carpenter, K. W. Short, T. M. Powers, R. Michalczyk, N. Kunapareddy, A. Guerra and J. P. Freyer, 'Comparison of vibrational spectroscopy to biochemical and flow cytometry methods for analysis of the basic biochemical composition of mammalian cells', J Biomed Opt, 2006, 11, 064024.
- 17 J. R. Mourant, K. W. Short, S. Carpenter, N. Kunapareddy, L. Coburn, T. M. Powers and J. P. Freyer, 'Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman and infrared spectroscopy', J Biomed Opt, 2005, 10, 031106.
- 18 I. Notingher, J Cell Biochem, 2004, .
- 19 C. Yu, E. Gestl, K. Eckert, D. Allara and J. Irudayaraj, 'Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy', Cancer Detect Prev, 2006, 30, 515-22.
- 20 F. Draux, P. Jeannesson, A. Beljebbar, A. Tfayli, N. Fourre, M. Manfait, J. Sule-Suso and G. D. Sockalingum, 'Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study', Analyst, 2009, 134, 542-8.

- 21 Krafft C, Knetschke T, Siegner A, Funk RHW and S. R, 'Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy', Vib Spectrosc., 2003, 32, 75-83.
- 22 C. Matthaus, T. Chernenko, J. A. Newmark, C. M. Warner and M. Diem, 'Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy', Biophys J, 2007, 93, 668-73.
- 23 E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini and T. Mazzei, 'Cellular pharmacology of gemcitabine', Ann Oncol, 2006, 17 Suppl 5, v7-12.
- 24 R. Garnotel, L. Rittie, S. Poitevin, J. C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, F. X. Maquart, A. Randoux and P. Gillery, 'Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95)', J Immunol, 2000, 164, 5928-34.
- 25 A. Trussardi-Régnier, S. Lavenus, M.-C. Gorisse and J. Dufer, 'Thalidonide alters nuclear architecture without ABCB1 gene modulation in drug-resistant myeloma cells', Int. J. Oncol., Under press.
- 26 V. El-Khoury, G. Breuzard, N. Fourre and J. Dufer, 'The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR1 (ABCB1) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model', Br J Cancer, 2007, 97, 562-73.
- 27 A. Tfayli, C. Gobinet, V. Vrabie, R. Huez, M. Manfait and O. Piot, 'Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between nevi and melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies', Appl Spectrosc, 2009, 63, 564-70.
- 28 E. E. Lawson, A. N. Anigbogu, A. C. Williams, B. W. Barry and H. G. Edwards, 'Thermally induced molecular disorder in human stratum corneum lipids compared with a model phospholipid system; FT-Raman spectroscopy', Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 1998, 54A, 543-58.
- 29 G. J. Thomas, Jr., J. M. Benevides, S. A. Overman, T. Ueda, K. Ushizawa, M. Saitoh and M. Tsuboi, 'Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations', Biophys J, 1995, 68, 1073-88.

Résultats et discussion

30 J. M. Benevides, M. Tsuboi, J. K. Bamford and G. J. Thomas, Jr., 'Polarized Raman spectroscopy of double-stranded RNA from bacteriophage phi6: local Raman tensors of base and backbone vibrations', Biophys J, 1997, 72, 2748-62.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Un spectre vibrationnel, véritable "empreinte" caractéristique de l'échantillon biologique étudié permet d'accéder à des informations portant sur la composition moléculaire, les interactions entre les composants ou encore le suivi de réactions biochimiques. De plus, le caractère non destructif de l'analyse vibrationnelle rend cet outil particulièrement bien adapté à l'étude des relations structure - fonction des échantillons biologiques et à la mise en évidence de changements moléculaires et structuraux consécutifs à un état lésionnel, ou induits par une molécule exogène (médicament, toxine...).

Au cours de ce doctorat, nous avons démontré le potentiel des spectroscopies vibrationnelles pour réaliser des études tant au niveau de la population cellulaire qu'à l'échelle unicellulaire. Cette approche biophotonique se situe dans le cadre du développement actuel de nouvelles méthodes d'investigation en biologie cellulaire, telles que la cytologie spectrale et la pharmacologie spectrale. La première permet une cartographie des grandes classes de biomolécules en termes qualitatifs et quantitatifs, et la seconde, l'analyse de la réponse cellulaire à de faibles doses d'un médicament anticancéreux ; toutes deux de manière automatisée, objective, et sans exiger de marquage préalable.

Pour la microspectroscopie Raman, nous avons montré, à l'échelle de la cellule vivante isolée, qu'il est possible d'acquérir et de différencier des informations spectrales issues du noyau, du cytoplasme et des réseaux membranaires. Cette différenciation est basée sur les différences de répartition et de structure des acides nucléiques, protéines et phospholipides. Etant donné que les analyses en biologie cellulaire nécessitent souvent une préservation à long terme de l'échantillon, nous avons caractérisé l'impact de différents modes de préparation sur l'information spectrale des macromolécules cellulaires. Nous avons ainsi démontré que la fixation au paraformaldéhyde et la cyto centrifugation apparaissent comme les méthodes donnant des informations spectrales comparables à celles issues de cellules vivantes.

Dans le domaine de la pharmacologie spectrale à l'échelle cellulaire, l'effet de faibles doses d'un agent anticancéreux a été détecté par spectroscopie infrarouge à haut débit au

Conclusion et perspectives

niveau des profils spectraux de populations cellulaires. Ces informations ont pu être confirmées au niveau unicellulaire par microspectroscopie infrarouge à source synchrotron, et sur cellules vivantes isolées par microspectroscopie Raman.

Concernant les perspectives de ce travail, il serait intéressant d'aborder les points suivants :

➤ *Développement d'une spectroscopie en mode "time-lapse"* : le suivi de l'activité cellulaire, comme celui d'un médicament pendant ses phases d'incorporation et d'interaction avec sa cible requiert l'acquisition de l'information spectrale à intervalles réguliers. Le développement de ce type de méthodologie reste encore actuellement très limité. C'est la raison pour laquelle nous envisageons d'équiper le microspectromètre Raman d'une enceinte thermostatée donnant accès aux conditions classiques de la culture cellulaire.

➤ *Approche d'une cytologie spectrale sur cellule vivante en interaction avec son microenvironnement* : dans les conditions physiologiques et physiopathologiques, les cellules évoluent au sein d'un microenvironnement tridimensionnel qui joue un rôle crucial aussi bien dans le maintien des fonctions cellulaires normales, qu'en pathologie pour l'évolution de processus tel que la progression tumorale. Compte tenu du développement actuel des méthodologies de culture cellulaire (utilisation de matrices tridimensionnelles diverses) qui prennent en compte cette notion de microenvironnement, nous étudions actuellement l'influence d'une matrice 3D de collagène I sur la réponse spectrale des cellules vivantes traitées par un agent anticancéreux. Il serait intéressant d'avoir l'information spectrale au niveau cellulaire et péri-cellulaire, et ainsi de comprendre le phénomène d'invasion tumorale.

➤ *Application clinique sur cellules vivantes de patients* : cette étape visera à déterminer les conditions optimales de culture et d'acquisition de spectres pour des cellules isolées

Conclusion et perspectives

par bronchoscopie ou à partir de biopsies, chez des patients atteints de cancer du poumon. Elle permettrait la mise au point de nouvelles méthodes d'aide à la prise de décision thérapeutique en termes de diagnostic rapide et de réponse au traitement chimiothérapeutique.

V. BIBLIOGRAPHIE

- ABDULAEV NG, NABIEV IR, EFREMOV RG, CHUMANOV GD
Retinal Schiff base position relative to the surfaces of photoreceptor disk
FEBS Lett 1987; 213 (1): 113-8
- ANDRIANI F, PEREGO P, CARENINI N, SOZZI G, ROZ L
Increased sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines after FHIT gene transfer
Neoplasia 2006; 8 (1): 9-17
- BAKER MJ, GAZI E, BROWN MD, SHANKS JH, CLARKE NW, GARDNER P
Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer
J Biophotonics 2009; 2 (1-2): 104-13
- BAKER MJ, GAZI E, BROWN MD, SHANKS JH, GARDNER P, CLARKE NW
FT-IR-based spectroscopic analysis in the identification of clinically aggressive prostate cancer
Br J Cancer. 2008; 99 (11): 1859-66
- BAKKER SCHUT TC, PUPPELS GJ, KRAAN YM, GREVE J, VAN DER MAAS LL, FIGDOR CG
Intracellular carotenoid levels measured by Raman microspectroscopy: comparison of lymphocytes from lung cancer patients and healthy individuals
Int J Cancer 1997; 74 (1): 20-5
- BARNES RJ, DHANOA MS, LISTER SJ
Standard normal variate transformation and detrending of near-infrared diffuse reflectance spectra
Appl Spectrosc 1989; 43 (5): 773-77
- BERGMAN AM, PINEDO HM, PETERS GJ
Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine)
Drug Resist Updat 2002; 5 (1): 19-33
- BITAR RA, MARTINHO HDA S, TIERRA-CRIOLLO CJ, ZAMBELLI RAMALHO LN, NETTO MM, MARTIN AA
Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy
J Biomed Opt 2006; 11 (5): 054001
- BOYDSTON-WHITE S, ROMEO M, CHERNENKO T, REGINA A, MILJKOVIC M, DIEM M
Cell-cycle-dependent variations in FTIR micro-spectra of single proliferating HeLa cells: principal component and artificial neural network analysis
Biochim Biophys Acta 2006; 1758 (7): 908-14

BREUZARD G, MILLOT JM, RIOU JF, MANFAIT M
Selective interactions of ethidiums with G-quadruplex DNA revealed by surface-enhanced Raman scattering
Anal Chem 2003; 75 (16): 4305-11

CARDOSO JF, SOULOUMIAC A
Blind beamforming for non-Gaussian signals
IEE Proceedings-F 1993; 140 (6): 362-70

CARMICHAEL J, WALLING J
Advanced breast cancer: investigational role of gemcitabine
Eur J Cancer 1997; 33 Suppl 1: S27-30

CHAN JW, TAYLOR DS, THOMPSON DL
The effect of cell fixation on the discrimination of normal and leukemia cells with laser tweezers Raman spectroscopy
Biopolymers 2009; 91 (2): 132-9

CHEN K, QIN, Y., ZHENG, F., SUN, M., SHI, D.
Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells
Opt Lett. 2006; 31 (13): 2015-7

CHIO-SRICHAN S, REFREGIERS M, JAMME F, KASCAKOVA S, ROUAM V, DUMAS P
Photosensitizer effects on cancerous cells: a combined study using synchrotron infrared and fluorescence microscopies
Biochim Biophys Acta 2008; 1780 (5): 854-60

CHOI S, CICHOCKI A, PARK HM, LEE SY
Blind source separation and independent component analysis: A review
Neural Information Processing – Letters and Reviews 2005; 6 (1): 1-57

CHOURPA I, MORJANI H, RIOU JF, MANFAIT M
Intracellular molecular interactions of antitumor drug amsacrine (m-AMSA) as revealed by surface-enhanced Raman spectroscopy
FEBS Lett 1996; 397 (1): 61-4

COHENFORD MA, RIGAS B
Cytologically normal cells from neoplastic cervical samples display extensive structural abnormalities on IR spectroscopy: implications for tumor biology
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (26): 15327-32

CONTI C, FERRARIS P, GARAVAGLIA M, GIORGINI E, RUBINI C, SABBATINI S, TOSI G

Microimaging FTIR of head and neck tumors. IV
Microsc Res Tech 2009; 72 (2): 67-75

DIEM M, ROMEO M, BOYDSTON-WHITE S, MILJKOVIC M, MATTHAUS C

A decade of vibrational micro-spectroscopy of human cells and tissue (1994-2004)
Analyst 2004; 129 (10): 880-5

DRAUX F, JEANNESSON P, BELJEBBAR A, TFAYLI A, FOURRE N, MANFAIT M, SULE-SUSO J, SOCKALINGUM GD

Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study
Analyst 2009; 134 (3): 542-8

DUMAS P, SOCKALINGUM GD, SULE-SUSO J

Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications?
Trends Biotechnol 2007; 25 (1): 40-4

DUTTA PK, HUTT JA

Resonance Raman spectroscopic studies of adriamycin and copper(II)-adriamycin and copper(II)-adriamycin-DNA complexes
Biochemistry 1986; 25 (3): 691-5

EDELMAN MJ, QUAM H, MULLINS B

Interactions of gemcitabine, carboplatin and paclitaxel in molecularly defined non-small-cell lung cancer cell lines
Cancer Chemother Pharmacol 2001; 48 (2): 141-4

EL-KHOURY V, BREUZARD G, FOURRE N, DUFER J

The histone deacetylase inhibitor trichostatin A downregulates human MDR1 (ABCB1) gene expression by a transcription-dependent mechanism in a drug-resistant small cell lung carcinoma cell line model
Br J Cancer 2007; 97 (4): 562-73

ERFURTH SC, KISER EJ, PETICOLAS WL

Determination of the backbone structure of nucleic acids and nucleic acid oligomers by laser Raman scattering
Proc Natl Acad Sci U S A 1972; 69 (4): 938-41

EWALD B, SAMPATH D, PLUNKETT W

H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation
Mol Cancer Ther 2007; 6 (4): 1239-48

FEOFANOV AV, GRICHINE AI, SHITOVA LA, KARMAKOVA TA, YAKUBOVSKAYA RI, EGRET-CHARLIER M, VIGNY P

Confocal raman microspectroscopy and imaging study of theraphthal in living cancer cells

Biophys J 2000; 78 (1): 499-512

GAHR S, OCKER M, GANSLMAYER M, ZOPF S, OKAMOTO K, HARTL A, LEITNER S, HAHN EG, HEROLD C

The combination of the histone-deacetylase inhibitor trichostatin A and gemcitabine induces inhibition of proliferation and increased apoptosis in pancreatic carcinoma cells

Int J Oncol 2007; 31 (3): 567-76

GAIGNEAUX A, DECAESTECKER C, CAMBY I, MIJATOVIC T, KISS R, RUYSSCHAERT JM, GOORMAGHTIGH E

The infrared spectrum of human glioma cells is related to their in vitro and in vivo behavior

Exp Cell Res 2004; 297 (1): 294-301

GASPARINI G

Metronomic scheduling: the future of chemotherapy?

Lancet Oncol 2001; 2 (12): 733-40

GASPER R, DEWELLE J, KISS R, MIJATOVIC T, GOORMAGHTIGH E

IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures.

Biochim Biophys Acta. 2009; doi:10.1016/j.bbamem.2009.02.016:

GAZI E, DWYER J, LOCKYER NP, MIYAN J, GARDNER P, HART C, BROWN M, CLARKE NW

Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy

Biopolymers 2005; 77 (1): 18-30

GIOVANNETTI E, MEY V, LONI L, NANNIZZI S, BARSANTI G, SAVARINO G, RICCIARDI S, DEL TACCA M, DANESI R

Cytotoxic activity of gemcitabine and correlation with expression profile of drug-related genes in human lymphoid cells

Pharmacol Res 2007; 55 (4): 343-9

GIOVANNETTI E, MEY V, NANNIZZI S, PASQUALETTI G, DEL TACCA M, DANESI R

Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer

Mol Cancer Ther 2006; 5 (6): 1387-95

GIOVANNETTI E, MEY V, NANNIZZI S, PASQUALETTI G, MARINI L, DEL TACCA M, DANESI R

Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells

Mol Pharmacol 2005; 68 (1): 110-8

GOBINET C, VRABIE V, MANFAIT M, PIOT O

Preprocessing methods of Raman spectra for source extraction on biomedical samples: application on paraffin-embedded skin biopsies

IEEE Trans Biomed Eng 2009; 56 (5): 1371-82

GRAHAM D, MALLINDER BJ, WHITCOMBE D, WATSON ND, SMITH WE

Simple multiplex genotyping by surface-enhanced resonance Raman scattering

Anal Chem 2002; 74 (5): 1069-74

GRIFFIN JL, SHOCKCOR JP

Metabolic profiles of cancer cells

Nat Rev Cancer 2004; 4 (7): 551-61

HART PRIETO MC, MATOUSEK P, TOWRIE M, PARKER AW, WRIGHT MP, RITCHIE AW, STONE N

Use of picosecond Kerr-gated Raman spectroscopy to suppress signals from both surface and deep layers in bladder and prostate tissue

J Biomed Opt 2005; 10 (4):

HOLMAN HYN, GOTH - GOLDSTEIN R, MARTIN MC, RUSSELL ML, MCKINNEY R

Low-Dose Responses to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Single Living Human Cells Measured by Synchrotron Infrared Spectromicroscopy

Environ. Sci. Technol 2000; 34: 2513-17

[HTTP://SANTE-MEDICINE.COMMENTCAMARCHE.NET/CONTENTS/TABAC/01_LE-TABAC-DES-STATISTIQUES-ALARMANTES-QU-IL-FAUT-CONNAITRE.PHP3](http://sante-medecine.commentcamarche.net/contents/tabac/01_le-tabac-des-statistiques-alarmantes-qu-il-faut-connaître.php3)

[Consulté 09/09]:

[HTTP://WWW.BIOPHOTONIQUE.ULAVAL.CA/](http://www.biophotonique.ulaval.ca/)

[Consulté 09/09]:

[HTTP://WWW.CNHIM.ORG/DOSSIER%20DU%20CNHIM%20-%20PDF/DOSSIERS/DOSSIER%202001%20N%C2%B06.PDF](http://www.cnhim.org/dossier%20du%20cnhim%20-%20pdf/dossiers/dossier%202001%20n%C2%B06.pdf)

[Consulté 09/09]:

[HTTP://WWW.DOCTISSIMO.FR/HTML/SANTE/PRINCIPALES PATHO/SA_121_CANCER_TRAIT.HTM](http://www.doctissimo.fr/html/sante/principalespatho/sa_121_cancer_trait.htm)

[Consulté 09/09]:

[HTTP://WWW.IARC.FR/FR/PUBLICATIONS/PDFS-ONLINE/WCR/2003/WCRF-1.PDF](http://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/wcrf-1.pdf)

[Consulté 09/09]:

[HTTP://WWW.INVS.SANTE.FR.PDF](http://www.invs.sante.fr/pdf)

[Consulté 09/09]:

[HTTP://WWW.SYNCHROTRON-
SOLEIL.FR/PORTAL/PAGE/PORTAL/RESSOURCESPEDAGOGIQUES/SOLEIL3Q
UESTIONS#COMMENTFONCTIONNESOLEIL](http://www.synchrotron-soleil.fr/portal/page/portal/ressourcespedagogiques/soleil3questions#commentfonctionnesoleil)

[Consulté 09/09]:

HUANG Z, MCWILLIAMS A, LUI H, MCLEAN DI, LAM S, ZENG H
Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer
Int J Cancer 2003; 107 (6): 1047-52

HYVARINEN A, KARHUNEN J, OJA E
Independent Component Analysis
New York: Wiley 2001; 10 (3): 031106

JAMIN N, DUMAS P, MONCUIT J, FRIDMAN WH, TEILLAUD JL, CARR GL,
WILLIAMS GP
Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared
microspectrometry
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (9): 4837-40

JAMIN N, MILLER L, MONCUIT J, FRIDMAN WH, DUMAS P, TEILLAUD JL
Chemical heterogeneity in cell death: combined synchrotron IR and fluorescence
microscopy studies of single apoptotic and necrotic cells
Biopolymers 2003; 72 (5): 366-73

JEANNESSON P, MANFAIT M, JARDILLIER JC
A technique for laser Raman spectroscopic studies of isolated cell populations
Anal Biochem 1983; 129 (2): 305-9

KENDALL C, ISABELLE M, BAZANT-HEGEMARK F, HUTCHINGS J, ORR L,
BABRAH J, BAKER R, STONE N
Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics
Analyst 2009; 134 (6): 1029-45

KEREN S, ZAVALITA C, CHENG Z, DE LA ZERDA A, GHEYSENS O, GAMBHIR
SS
Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy
Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105 (15): 5844-9

KIRSTEIN MN, WIEMAN KM, WILLIAMS BW, FISHER JE, MARKER PH, LE CT, YEE D, KRATZKE RA

Short versus continuous gemcitabine treatment of non-small cell lung cancer in an in vitro cell culture bioreactor system

Lung Cancer 2007; 58 (2): 196-204

KOLJENOVIC S, BAKKER SCHUT TC, VAN MEERBEECK JP, MAAT AP, BURGERS SA, ZONDERVAN PE, KROS JM, PUPPELS GJ

Raman microspectroscopic mapping studies of human bronchial tissue

J Biomed Opt 2004; 9 (6): 1187-97

KRAFFT C, KNETSCHKE T, SIEGNER A, FUNK RHW, R S

Mapping of single cells by near infrared Raman microspectroscopy

Vib Spectrosc. 2003; 32: 75-83

KRAFFT C, KIRSCH M, BELEITES C, SCHACKERT G, SALZER R

Methodology for fiber-optic Raman mapping and FTIR imaging of metastases in mouse brains

Anal Bioanal Chem 2007; 389 (4): 1133-42

KRISHNA CM, KEGELAER G, ADT I, RUBIN S, KARTHA VB, MANFAIT M, SOCKALINGUM GD

Combined Fourier transform infrared and Raman spectroscopic approach for identification of multidrug resistance phenotype in cancer cell lines

Biopolymers 2006; 82 (5): 462-70

KUIMOVA MK, CHAN KL, KAZARIAN SG

Chemical imaging of live cancer cells in the natural aqueous environment

Appl Spectrosc 2009; 63 (2): 164-71

KWAN C, AYHAN B, CHEN G, WANG J, JI B, CHANG CI

A novel approach for spectral unmixing, classification and concentration estimation of chemical and biological agents

IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing 2006; 44 (2): 409-19

LASCH P, CHIRIBOGA L, YEE H, DIEM M

Infrared spectroscopy of human cells and tissue: detection of disease

Technol Cancer Res Treat 2002; 1 (1): 1-7

LASCH P, PACIFICO A, DIEM M

Spatially resolved IR microspectroscopy of single cells

Biopolymers 2002; 67 (4-5): 335-8

LI QB, XU Z, ZHANG NW, ZHANG L, WANG F, YANG LM, WANG JS, ZHOU S, ZHANG YF, ZHOU XS, SHI JS, WU JG

In vivo and in situ detection of colorectal cancer using Fourier transform infrared spectroscopy

World J Gastroenterol 2005; 11 (3): 327-30

LING J, WEITMAN SD, MILLER MA, MOORE RV, BOVIK AC

Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of a drug

Appl Opt 2002; 41 (28): 6006-17

LIU CH, DAS BB, SHA GLASSMAN WL, TANG GC, YOO KM, ZHU HR, AKINS DL, LUBICZ SS, CLEARY J, PRUDENTE R, ET AL.

Raman, fluorescence, and time-resolved light scattering as optical diagnostic techniques to separate diseased and normal biomedical media

J Photochem Photobiol B 1992; 16 (2): 187-209

LIU K, JIA L, KELSEY S, NEWLAND A, MANTSCH H

Quantitative determination of apoptosis on leukemia cells by infrared spectroscopy.

Apoptosis. 2001; 6 (4): 269-78

LUTZ B, DENTINGER C, SUN L, NGUYEN L, ZHANG J, CHMURA A, ALLEN A, CHAN S, KNUDSEN B

Raman nanoparticle probes for antibody-based protein detection in tissues

J Histochem Cytochem 2008; 56 (4): 371-9

MACQUEEN JB

Some methods for classification and analysis of multivariate observations

Proceedings of 5th Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability 1967; 1: 281-97

MANFAIT M, ALIX AJ, JEANNESSON P, JARDILLIER JC, THEOPHANIDES T

Interaction of adriamycin with DNA as studied by resonance Raman spectroscopy

Nucleic Acids Res 1982; 10 (12): 3803-16

MARIANI MM, LAMPEN P, POPP J, WOOD BR, DECKERT V

Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy

Analyst 2009; 134 (6): 1154-61

MATTHAUS C, CHERNENKO T, NEWMARK JA, WARNER CM, DIEM M

Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy

Biophys J 2007; 93 (2): 668-73

MINI E, NOBILI S, CACIAGLI B, LANDINI I, MAZZEI T

Cellular pharmacology of gemcitabine

Ann Oncol 2006; 17 Suppl 5: v7-12

MOORE MA

Clinical utility of bone marrow culture
Hamatol Bluttransfus 1976; 19: 79-90

MOSS D, KEESE M, PEPPERKOK R

IR microspectroscopy of live cells
Vib Spectrosc. 2005; 38: 185-91

MOTZ JT, GANDHI SJ, SCEPANOVIC OR, HAKA AS, KRAMER JR, DASARI RR,
FELD MS

Real-time Raman system for in vivo disease diagnosis
J Biomed Opt 2005; 10 (3): 031113

MOURANT JR, DOMINGUEZ J, CARPENTER S, SHORT KW, POWERS TM,
MICHALCZYK R, KUNAPAREDDY N, GUERRA A, FREYER JP

Comparison of vibrational spectroscopy to biochemical and flow cytometry methods for
analysis of the basic biochemical composition of mammalian cells
J Biomed Opt 2006; 11 (6): 064024

MOURANT JR, SHORT KW, CARPENTER S, KUNAPAREDDY N, COBURN L,
POWERS TM, FREYER JP

Biochemical differences in tumorigenic and nontumorigenic cells measured by Raman
and infrared spectroscopy
J Biomed Opt 2005; 10 (3): 031106

MUNNIER E, COHEN-JONATHAN S, LINASSIER C, DOUZIECH-EYROLLES L,
MARCHAIS H, SOUCE M, HERVE K, DUBOIS P, CHOURPA I

Novel method of doxorubicin-SPION reversible association for magnetic drug targeting
Int J Pharm 2008; 363 (1-2): 170-6

MURALI KRISHNA C, KEGELAER G, ADT I, RUBIN S, KARTHA VB, MANFAIT
M, SOCKALINGUM GD

Characterisation of uterine sarcoma cell lines exhibiting MDR phenotype by vibrational
spectroscopy
Biochim Biophys Acta 2005; 1726 (2): 160-7

MURZA A, SANCHEZ-CORTES S, GARCIA-RAMOS JV, GUISAN JM, ALFONSO
C, RIVAS G

Interaction of the antitumor drug 9-aminoacridine with guanidinobenzoate studied by
spectroscopic methods: a possible tumor marker probe based on the fluorescence
exciplex emission
Biochemistry 2000; 39 (34): 10557-65

NEAULT JF, NAOUI M, MANFAIT M, TAJMIR-RIAHI HA

Aspirin-DNA interaction studied by FTIR and laser Raman difference spectroscopy
FEBS Lett 1996; 382 (1-2): 26-30

NEAULT JF, NAOUI M, TAJMIR-RIahi HA
DNA-drug interaction. The effects of vitamin C on the solution structure of Calf-thymus DNA studied by FTIR and laser Raman difference spectroscopy
J Biomol Struct Dyn 1995; 13 (2): 387-97

NEAULT JF, TAJMIR-RIahi HA
Diethylstilbestrol-DNA interaction studied by Fourier transform infrared and Raman spectroscopy
J Biol Chem 1996; 271 (14): 8140-3

NEAULT JF, TAJMIR-RIahi HA
RNA-diethylstilbestrol interaction studied by Fourier transform infrared difference spectroscopy
J Biol Chem 1997; 272 (14): 8901-4

NOTINGHER I, SELVAKUMARAN J, HENCH LL
New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells
Biosens Bioelectron 2004; 20 (4): 780-9

NOTINGHER I, VERRIER, S., HAQUE, S., POLAK, J.M., HENCH, L.L.
Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells
Biopolymers 2003; 72 (4): 230-40

OLIVEIRA AP, BITAR RA, SILVEIRA L, ZANGARO RA, MARTIN AA
Near-infrared Raman spectroscopy for oral carcinoma diagnosis
Photomed Laser Surg 2006; 24 (3): 348-53

OWEN CA, SELVAKUMARAN J, NOTINGHER I, JELL G, HENCH LL, STEVENS MM
In vitro toxicology evaluation of pharmaceuticals using Raman micro-spectroscopy
J Cell Biochem 2006; 99 (1): 178-86

PAL A, ISOLA NR, ALARIE JP, STOKES DL, VO-DINH T
Synthesis and characterization of SERS gene probe for BRCA-1 (breast cancer)
Faraday Discuss 2006; 132: 293-301; discussion 09-19

PETICOLAS WL
Application of Raman spectroscopy to biological macromolecules
Biochimie 1975; 57 (4): 417-28

PIJANKA JK, KOHLER A, YANG Y, DUMAS P, CHIO-SRICHAN S, MANFAIT M, SOCKALINGUM GD, SULE-SUSO J

Spectroscopic signatures of single, isolated cancer cell nuclei using synchrotron infrared microscopy

Analyst 2009; 134 (6): 1176-81

QIAN X, PENG XH, ANSARI DO, YIN-GOEN Q, CHEN GZ, SHIN DM, YANG L, YOUNG AN, WANG MD, NIE S

In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags

Nat Biotechnol 2008; 26 (1): 83-90

RIGAS B, MORGELLO S, GOLDMAN IS, WONG PT

Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra

Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87 (20): 8140-4

ROBICHAUX-VIEHOEVER A, KANTER E, SHAPPELL H, BILLHEIMER D, JONES H, 3RD, MAHADEVAN-JANSEN A

Characterization of Raman spectra measured in vivo for the detection of cervical dysplasia

Appl Spectrosc 2007; 61 (9): 986-93

SAVITZKY A, GOLAY MJE

Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures

Analytical Chemistry 1964; 36: 1627-39

SCHAROVSKY OG, MAINETTI LE, ROZADOS VR

Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better

Curr Oncol 2009; 16 (2): 7-15

SEOL JW, CHAUDHARI AA, LEE YJ, KANG HS, KIM IS, KIM NS, PARK JH, KIM TH, SEOL DW, PARK SY

Regulation of DR-5 protein and mitochondrial transmembrane potential by gemcitabine, a possible mechanism of gemcitabine-enhanced TRAIL-induced apoptosis

Oncol Rep 2007; 18 (3): 523-9

SHETTY G, KENDALL C, SHEPHERD N, STONE N, BARR H

Raman spectroscopy: elucidation of biochemical changes in carcinogenesis of oesophagus

Br J Cancer 2006; 94 (10): 1460-4

SHORT KW, CARPENTER S, FREYER JP, MOURANT JR

Raman spectroscopy detects biochemical changes due to proliferation in mammalian cell cultures

Biophys J 2005; 88 (6): 4274-88

- SHORT MA, LAM S, MCWILLIAMS A, ZHAO J, LUI H, ZENG H
Development and preliminary results of an endoscopic Raman probe for potential in vivo diagnosis of lung cancers
Opt Lett 2008; 33 (7): 711-3
- SHORT MA, LUI H, MCLEAN D, ZENG H, ALAJLAN A, CHEN XK
Changes in nuclei and peritumoral collagen within nodular basal cell carcinomas via confocal micro-Raman spectroscopy
J Biomed Opt 2006; 11 (3): 34004
- SULE-SUSO J, FORSTER A, ZHOLOBENKO V, STONE N, EL HAJ A
Effects of CaCl₂ and MgCl₂ on Fourier transform infrared spectra of lung cancer cells
Appl Spectrosc 2004; 58 (1): 61-7
- SULÉ-SUSO J, SKINGSLEY D, SOCKALINGUM GD, KOHLER A, KEGELAER G, MANFAIT M, EL HAG AJ
FTIR microspectroscopy as a tool to assess lung cancer cells response to chemotherapy
Vib Spectrosc. 2005; 38: 179-84
- SUN L, SUNG KB, DENTINGER C, LUTZ B, NGUYEN L, ZHANG J, QIN H, YAMAKAWA M, CAO M, LU Y, CHMURA AJ, ZHU J, SU X, BERLIN AA, CHAN S, KNUDSEN B
Composite organic-inorganic nanoparticles as Raman labels for tissue analysis
Nano Lett 2007; 7 (2): 351-6
- SWAIN RJ, JELL G, STEVENS MM
Non-invasive analysis of cell cycle dynamics in single living cells with Raman microspectroscopy
J Cell Biochem 2008:
- TALEB A, DIAMOND J, MCGARVEY JJ, BEATTIE JR, TOLAND C, HAMILTON PW
Raman microscopy for the chemometric analysis of tumor cells
J Phys Chem B 2006; 110 (39): 19625-31
- TFAYLI A, PIOT O, DERANCOURT S, BERNARD P, MANFAIT M
In vivo Raman analysis of human skin lesions
SPIE - The International Society of Optical Ingeneering, SPIE Newsronn 2006; 10.1117/2.1200604.0215:
- TFAYLI A, PIOT O, PITRE F, MANFAIT M
Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy
Eur Biophys J 2007; 36 (8): 1049-58

THOMAS GJ, JR., BENEVIDES JM, OVERMAN SA, UEDA T, USHIZAWA K, SAITOH M, TSUBOI M

Polarized Raman spectra of oriented fibers of A DNA and B DNA: anisotropic and isotropic local Raman tensors of base and backbone vibrations

Biophys J 1995; 68 (3): 1073-88

THOMAS GJ, JR., HARTMAN KA

Raman studies of nucleic acids. 8. Estimation of RNA secondary structure from Raman scattering by phosphate-group vibrations

Biochim Biophys Acta 1973; 312 (2): 311-32

TRUSSARDI-RÉGNIER A, LAVENUS S, GORISSE M-C, DUFER J

Thalidonide alters nuclear architecture without ABCB1 gene modulation in drug-resistant myeloma cells

Int. J. Oncol.: Under press

UENO H, KIYOSAWA K, KANIWA N

Pharmacogenomics of gemcitabine: can genetic studies lead to tailor-made therapy?

Br J Cancer 2007; 97 (2): 145-51

UZUNBAJAKAVA N, LENFERINK A, KRAAN Y, VOLOKHINA E, VRENSSEN G, GREVE J, OTTO C

Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells

Biophys J 2003; 84 (6): 3968-81

UZUNBAJAKAVA N, LENFERINK A, KRAAN Y, WILLEKENS B, VRENSSEN G, GREVE J, OTTO C

Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells

Biopolymers 2003; 72 (1): 1-9

VELTKAMP SA, PLUIM D, VAN EIJNDHOVEN MA, BOLIJN MJ, ONG FH, GOVINDARAJAN R, UNADKAT JD, BEIJNEN JH, SCHELLENS JH

New insights into the pharmacology and cytotoxicity of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine

Mol Cancer Ther 2008; 7 (8): 2415-25

VERRIER S, NOTINGHER I, POLAK JM, HENCH LL

In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy

Biopolymers 2004; 74 (1-2): 157-62

WANG HP, WANG HC, HUANG YJ

Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid

Sci Total Environ 1997; 204 (3): 283-7

WARD JH

Hierarchical grouping to optimize an objective function

Journal of the American Statistical Association 1963; 58 (301): 236-44

WOLTHUIS R, TRAVO A, NICOLET C, NEUVILLE A, GAUB MP, GUENOT D, LY E, MANFAIT M, JEANNESSON P, PIOT O

IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas

Anal Chem 2008; 80 (22): 8461-9

WONG A, SOO RA, YONG WP, INNOCENTI F

Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine

Drug Metab Rev 2009; 41 (2): 77-88

WONG PT, WONG RK, CAPUTO TA, GODWIN TA, RIGAS B

Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: evidence of extensive structural changes during carcinogenesis

Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (24): 10988-92

XIE W, WANG L, ZHANG Y, SU L, SHEN A, TAN J, HU J

Nuclear targeted nanoprobe for single living cell detection by surface-enhanced Raman scattering

Bioconjug Chem 2009; 20 (4): 768-73

YAN XL, DONG RX, ZHANG L, ZHANG XJ, ZHANG ZW

Raman spectra of single cell from gastrointestinal cancer patients

World J Gastroenterol 2005; 11 (21): 3290-2

YANG Y, SULE-SUSO J, SOCKALINGUM GD, KEGELAER G, MANFAIT M, EL HAJ AJ

Study of tumor cell invasion by Fourier transform infrared microspectroscopy

Biopolymers 2005; 78 (6): 311-7

YANO K, OHOSHIMA S, GOTOU Y, KUMAIDO K, MORIGUCHI T, KATAYAMA H

Direct measurement of human lung cancerous and noncancerous tissues by fourier transform infrared microscopy: can an infrared microscope be used as a clinical tool?

Anal Biochem 2000; 287 (2): 218-25

YU C, GESTL E, ECKERT K, ALLARA D, IRUDAYARAJ J

Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy

Cancer Detect Prev 2006; 30 (6): 515-22

Bibliographie

ZHANG X, YIN H, COOPER JM, HASWELL SJ
Characterization of cellular chemical dynamics using combined microfluidic and Raman techniques
Anal Bioanal Chem 2008; 390 (3): 833-40

VI. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

JACEK PIJANKA, GANESH DHROUVANANDA SOCKALINGUM, ACHIM KOHLER, YING YANG, **FLORENCE DRAUX**, GARY PARKES, KA-PO LAM, DAVE COLLINS, PAUL DUMAS, CHRISTOPHE SANDT, DANIEL GEY VAN PITTIUS, GILL DOUCE, MICHEL MANFAIT, VALERIE UNTEREINER, AND JOSEP SULE-SUSO. “Synchrontron based FTIR spectra of stained single cells. Towards a clinical application in pathology” Laboratory Investigation, Accepted

DRAUX F., JEANNESSON P, GOBINET C, SULÉ-SUSO J, PIJANKA J, SANDT C, DUMAS P, MANFAIT M, , SOCKALINGUM GD. “IR spectroscopy reveals effect of non-cytotoxic doses of antitumor drug on cancer cells” Anal Bioanal Chem DOI 10.1007/s00216-009-3140-y
Published

DRAUX F., JEANNESSON P, BELJEBBAR A, TFAYLI A, FOURRE N, MANFAIT M, SULE-SUSO J, SOCKALINGUM GD. “Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study” Analyst. 2009 Mar;134(3):542-8

TFAYLI A., PIOT O., **DRAUX F.**, PITRE F., MANFAIT M. “Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy : Comparison with excised human skin” Biopolymers 2007 Nov;87(4):261-74.

COMMUNICATION ORALE INTERNATIONALE

DRAUX F., JEANNESSON P., SULE-SUSO J., MANFAIT M., SOCKALINGUM G.D. “Probing Single Live Lung Cancer Cells Using Micro-Raman Spectroscopy”, **SPEC conference**, octobre 2008, Sao Paulo, Brésil.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES INTERNATIONALES

DRAUX F., JEANNESSON P, BELJEBBAR A, -SUSO J., MANFAIT M., SOCKALINGUM G.D. “Probing Single Living Lung Cancer Cells Using Micro-Raman Spectroscopy”, **American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting**, avril 2008, San Diego, USA.

DRAUX F., JEANNESSON P, BELJEBBAR A, TFAYLI A, FOURRE N, MANFAIT M, SULÉ-SUSO J, SOCKALINGUM GD, “Raman Microspectroscopy of single alive lung cancer cells. A feasibility study”, **12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)**, septembre 2007, Paris.

TFAYLI A., PIOT O., **DRAUX F.**, PITRE F., MANFAIT M. “Characterization of reconstructed epidermis model by Raman spectroscopy: comparison with excised human skin”, **12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules (ECSBM)**, septembre 2007, Paris.

MANFAIT M., **DRAUX F.**, SULÉ-SUSO J., FOURRÉ N., TFAYLI A., JEANNESSON P., SOCKALIGUM G.D. “Raman Microspectroscopy of single in-vitro Growing Lung Cancer Cells”, **First Asian Spectroscopy Conference and Asian Biospectroscopy Conference (ASC-2007)**, Department of Inorganic and Physical Chemistry, Indian Institute of Science, janvier 2007, Bangalore, Inde.

DRAUX F., FOURRÉ N., TFAYLI A., JEANNESSON P., MANFAIT M., SULÉ-SUSO J., SOCKALIGUM G.D. “Micro-Raman Spectroscopy of In vitro Growing Single Lung Cancer Cells”, **SPEC conference**, mai 2006, Heidelberg, Allemagne.

COMMUNICATIONS AFFICHEES NATIONALES

DRAUX F, JEANNESSON P, BELJEBBAR A, SULE-SUSO J, MANFAIT M, SOCKALINGUM GD,
“Probing single living lung cancer cells using micro-Raman spectroscopy” **16ème**
Edition des Journées du groupe Français de Spectroscopie Vibrationnelle, juin 2009,
Metz, France.

VII. ANNEXE

Préambule

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Josep Sulé-Suso du Staffordshire Oncology Centre (UK), un article traitant de l'étude de l'effet de différents types de coloration sur les informations spectrales infrarouge issues de cellule isolées a été accepté dans Laboratory Investigation. Les objectifs de cette étude étaient les suivants : tout d'abord, évaluer comment les colorations à l'hématoxyline/éosine (H&E) et de Papanicolau (Pap) affectaient les spectres de cellules isolées, ensuite déterminer si la spectroscopie infrarouge à source synchrotron pouvait permettre de différencier cellules cancéreuses colorées et cellules saines. Les résultats obtenus montrent que les deux types de coloration induisent des changements important dans les régions des lipides et Amide I. Cependant, ces variations spectrales ne sont pas suffisantes pour empêcher la distinction entre cellules cancéreuses colorées et cellules normales.

**SYNCHROTRON BASED FTIR SPECTRA OF STAINED SINGLE CELLS.
TOWARDS A CLINICAL APPLICATION IN PATHOLOGY**

Jacek Pijanka¹, Ganesh Dhruvananda Sockalingum², Achim Kohler^{3,4}, Ying Yang¹, Florence Draux², Gary Parkes⁵, Ka-Po Lam⁶, Dave Collins⁶, Paul Dumas⁷, Christophe Sandt⁷, Daniel Gey van Pittius⁵, Gill Douce⁵, Michel Manfait², Valérie Untereiner², and Josep Sulé-Suso^{1, 8, *}

1. Institute for Science and Technology in Medicine, Guy Hilton Research Centre, Keele University, Thornburrow Drive, Stoke on Trent ST4 7QB, UK.

2. MéDIAN, Université de Reims Champagne-Ardenne, CNRS UMR6237-MEDyC, UFR de Pharmacie, IFR 53, 51 rue Cognacq-Jay, Reims cedex 51096, France.

3. Centre for Biospectroscopy and Data Modeling, Matforsk Nofima Food, Osloveien 1, 1430 Ås, Norway.

4. CIGENE, Center for Integrative Genetics, IMT, University of Life Sciences, 1432 Ås, Norway.

5. Department of Histopathology, Central Pathology Laboratory, University Hospital of North Staffordshire, Stoke on Trent ST4 7PA, U. K.

6. School of Computing and Mathematics, Keele University, Keele, Staffordshire, ST5 5BG, UK.

7. SOLEIL Synchrotron, BP48, L'Orme des Merisiers, 91192 Gif sur Yvette, cedex, France.

8. Cancer Centre, University Hospital of North Staffordshire, Newcastle Rd, Stoke on Trent ST4 6QG, UK.

Running title: FTIR spectroscopy of stained cells.

Address for correspondence:

Dr Josep Sulé-Suso

Institute for Science and Technology in Medicine

Guy Hilton Research Centre

Keele University

Thornburrow Drive

Stoke on Trent

Staffordshire ST4 7QB

United Kingdom

Abstract

Over the last few years, FTIR spectroscopy has ~~revealed~~ become ~~to be~~ a potential analytical ~~tool~~ method in tissue and cell studies for cancer diagnosis. This has opened ~~up~~ ~~the~~ a way towards a clinical applications such as a tool that would scan samples to assess the presence or absence of malignant cells in biopsies, or as an aid to help pathologists to better characterize those cells that are suspicious but not diagnostic for cancer. The latter application has the problem that in order to assess these cells, pathologists would have already ~~looked at~~ dealt with stained samples. Therefore, it is important to understand how staining would affect the spectra of cells. To this purpose, we have carried out this study in order to clarify, first, how haematoxylin and eosin (H&E) and Papanicolau (Pap) stainings affect the spectra of single cells and, second, whether FTIR spectroscopy could differentiate between stained lung cancer cells and their normal counterparts. Furthermore, different cell preparations (cytospin, and smear) used in cytological diagnosis were assessed. Experiments performed using a bright infrared source (synchrotron) showed that both H&E and Pap staining induced marked changes in the lipid and amide II band regions. Despite this, FTIR spectroscopy of already stained cells ~~can readily~~ is capable of differentiating between ~~stained~~ lung cancer cells and their normal counterpart. The clinical applications of this methodology are discussed.

Abbreviations: S-FTIR (Synchrotron based Fourier Transform Infrared Spectroscopy), H&E (haematoxylin and eosin), Pap (Papanicolau), SAM (Spectral Angle Mapper).

Keywords: FTIR spectroscopy, synchrotron, haematoxylin, Papanicolau, cytospin, smear, lung cancer

It is widely accepted that FTIR spectroscopy has a big high potential to become a tool for cancer diagnosis. It uses an infrared beam that, after interacting with the sample, gives highly informative molecular information. Also, spatially resolved biochemical information from cells and tissue samples can be obtained by mapping or imaging techniques. In IR spectroscopy, the frequency of light that is absorbed by a sample depends upon the nature of the bond between the atoms, the atoms involved in the bond, and the type of vibration. The amount of light absorbed by a vibrating bond is linearly related to concentration. Therefore, the IR spectrum of a sample is a direct indicator of its chemical composition. ~~In fact~~, Several studies have shown that FTIR spectroscopy ~~using either synchrotron or benchtop spectrometers~~ can detect differences between cancer cells and their normal counterparts¹. The applications could be twofold, as a technique that could screen tissue or cytology samples for the presence or absence of cancer cells or as a tool that pathologists could use to better characterize individual cells that are suggestive but not diagnostic for malignancy. However, it is important that these clinical applications are not only based on robust algorithms but also should be fast and easily amenable to a Pathology laboratory set up. Obviously, further work will be required to assess the feasibility and what could be the time limit to provide a diagnosis. Nevertheless, ~~However~~, in order to take this technique into its clinical application, the spectral biomarkers for cancer diagnosis need first to be characterized. Up to now, this work has entailed in most cases obtaining the spectra of unstained cells and/or tissue samples. Once the spectra are obtained, the same sample or a mirror sample as in the case of tissue would be stained in order to correlate spectra with histopathological diagnosis^{2,3}. However, this presents the problem that, *a priori*, it is not always possible to assess the presence of malignant cells in a cytology or in a tissue sample before staining. Therefore, a big large number of samples need to be studied with FTIR spectroscopy in order to build a database of spectral biomarkers for tissue/cell diagnosis. On the other hand, it is not unusual to have biopsy samples with small number of cells deemed suspicious but not diagnostic for cancer. In these cases, patients have to undergo further biopsies with all the risks, side effects, and costs that this entails. Therefore, a technique that could further characterize these already stained “abnormal” cells would be of great interest ~~very welcomed~~. To our knowledge, the only example of FTIR spectra obtained from stained

samples was carried out by Dukor⁴ using breast tissue sections mounted on a glass slide and studied with FTIR attenuated total reflectance (ATR) microspectroscopy. However, when bringing the sample close to an ATR crystal care had to be taken to prevent glass interfering with the sample's FTIR spectra. Furthermore, it is more difficult to obtain FTIR spectra of a single, chosen cell using ATR microspectroscopy when compared to FTIR microspectroscopy using transmission or reflection modalities.

One of the possible ways to improve this is to study both cytology and tissue samples already stained with haematoxylin and eosin (H&E) or Papanicolaou (Pap) using FTIR spectroscopy in reflection and/or transmission modes. This would allow researchers to obtain FTIR spectra directly from those cells considered suspicious but not diagnostic for cancer. However, the problem lies in any spectral changes caused by the stains themselves and/or the procedure to stain these samples. To this purpose, we have carried out the present study in order to assess whether it was feasible to obtain good quality FTIR spectra of good quality from already stained single cells. We studied both H&E and Pap stained cells as these two staining techniques are widely used in pathology departments. On the other hand, we chose to use Synchrotron based FTIR (S-FTIR) microspectroscopy in view of its intrinsic high brightness which allows to record high quality spectra at diffraction-limited spot sizes. Synchrotrons are accelerator facilities that provide extremely high-flux and high-brightness electromagnetic radiation, at energies ranging from the infrared through the ultraviolet to the X-ray regions. The use of synchrotron in infrared microspectroscopy has allowed the study of biological samples at both cellular and subcellular levels^{5, 6}. Furthermore, synchrotron infrared radiation is not damaging for cells⁷⁻⁹. The results presented here will lead towards the study of already stained both cell and tissue samples with FTIR spectroscopy paving the way towards the clinical application of FTIR spectroscopy in the diagnosis of cancer.

Materials and Methods

Cell lines

The lung epithelial cell line NL20 and the epidermoid lung cancer cell line CALU-1, purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Teddington, UK) and the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK), respectively, were used in this study. NL 20 cells were kept in culture in Ham's F12 (Lonza, U. K.) supplemented with 4% Foetal Calf Serum, insulin, epidermal growth factor, transferrin and hydrocortisone according to the provider's instructions. CALU-1 cell line was kept in culture in DMEM with 10% Foetal Calf Serum. Cells were incubated at 37°C in 5% CO₂ in tissue culture flasks (Sarstedt, Leicester, U. K.).

Cell growth on MirrIR low-e microscope slides

Cell growth on MirrIR low-e microscope slides (Kevley Technologies, Chesterland, Ohio, USA) has been previously described⁶. Briefly, cells growing in tissue culture flasks were detached before reaching confluence with trypsin/EDTA (Sigma, UK) and collected by centrifugation at 1200 rpm for 7 minutes. Supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in 5 ml of culture media. Cell viability was assessed using the trypan blue exclusion method. Cells were then seeded at 5×10^4 cells in 200 μ L of complete media on MirrIR low-e microscope slides and incubated for 24 hours at 37 °C and 5% CO₂. Cytospins were prepared by seeding 10^5 cells/mL on a cytospin funnel and spun at 1500 rpm for 1 minute onto a MirrIR low-e microscope slide, fixed and allowed to dry. Smears were prepared by seeding 10^5 cells on MirrIR low-e microscope slides and spreading them out using a glass slide. They were then fixed and allowed to dry.

In order to confirm that exactly the same cells were studied with S-FTIR spectroscopy pre- and post-staining, a grid was drawn on MirrIR low-e microscope slides using a diamond pen (Figure 1). This method allowed identification and localization of each individual cell based on row and column numbers.



Figure 1: Image of a MirrIR low-e microscope slide with a grid drawn on it containing NL20 cells (x4 magnification).

Cell Staining

Both normal and lung cancer cells were seeded on MirrIR low-e microscope slides as described above. After 24 hours incubation, cells were washed and fixed as previously described⁶. Samples were then stained with either H&E or Papanicolaou (Pap) using the same standard staining protocols at the Pathology Departments at the University Hospital of North Staffordshire (UHNS) and at the Reims University Hospital. H&E includes a first step staining with haematoxylin and then eosin while Pap staining includes staining with haematoxylin, Orange G, and EA50 in this order. More important, H&E staining includes one washing with ethanol after eosin staining but not after haematoxylin. However, Pap staining includes ethanol washings after haematoxylin, Orange G, and EA50 stains are added to the sample. This has important implications to understand some of the data presented here (*vide infra*).

Synchrotron FTIR microspectroscopy

S-FTIR spectra of Calu-1 and NL20 cells were recorded at the SMIS beamline $\phi 7$ at the Soleil Synchrotron facilities (Saint-Aubin, France). A Nicolet Nexus FTIR spectrometer coupled to a Nicolet Continuum XL IR microscope fitted with 32x infinity corrected Schwarzschild objective and equipped with liquid nitrogen cooled MCT/A detector was

used. Spectra were collected at 4 cm^{-1} resolution using a double path single masking aperture size of $15 \times 15 \text{ }\mu\text{m}^2$. Spectra were processed and corrected for the Mie scatter using Extended Multiplicative Signal Correction¹⁰. Principal Components Analysis of the whole spectral region was performed using The Unscrambler v9.8 (CAMO software AS, Oslo, Norway).

Statistical analysis

The statistical properties of the data samples ~~collected~~ sets collected were examined using the Student's *t*-test. To facilitate our analysis, characteristics of the sample spectra must somehow be described in the form of univariate distributions. Here, individual spectra representing independent measurements of a sample are investigated by means of the spectral similarity measure of SAM (Spectral Angle Mapper) that is widely used for material identification and image classification in the remote sensing community¹¹. Using SAM, our tests were constructed based on a mathematically vigorous framework of multi-spectral signatures which determined the similarity of sample spectra by attributing a unique fingerprint, or reference signature, to the spectral responses or measurements of the individual sample set¹². The advantages are four-fold; (1) SAM is insensitive to illumination measured at the individual spectral bands (or wavenumbers), particularly in cases of high data dimensionality where *M* is large (~ 1600 in our case), since the algorithm uses only the multidimensional vector direction and not its length. (2) Whilst pattern classification and hypothesis testing address problems that are somewhat different, they are closely related under the formalism of SAM. (3) Broadly speaking, SAM shares the same data reduction principle of projection pursuit of which the widely used PCA method is a special case, whilst other, more sophisticated component analytic procedures yield curved surfaces embedded in the full multidimensional space on to which arbitrary (spectral) patterns can be projected^{13, 14}. (4) The theoretical framework of SAM can readily be extended to incorporate advanced data analytics, including Spectral Information Divergence that has been shown to be more robust when the sample sizes are limited¹².

Furthermore, the angular distances as measured by SAM between individual spectra (or measurements) of a sample and its corresponding reference signature followed a log-normal distribution (data not shown). Consequently, the logarithm function must first be applied to the random variable of the *t*-test procedure.

Results

~~As~~ The aim of this study was to assess the effects of staining on the FTIR spectra of the same single lung cells pre- and post-staining and, therefore carried out at different time points. Therefore, it was important for us to confirm that ~~the same~~ spectra were acquired from the same cells scanned at different days did not vary. To this purpose, we used control cells. First, we obtained ~~first~~ the spectra of both NL20 and Calu-1 control cells on day 1, i. e. the same day we collected the S-FTIR spectra of pre-stained cells. The control cells were then taken together with the other samples to be stained with either H&E or Pap to the Pathology Department at the Reims University Hospital. Unstained control cells were then taken back to Soleil synchrotron and the S-FTIR spectra of exactly the same individual control cells were acquired again and in parallel to obtaining the spectra of stained cells. Figures 2a and b show, respectively, the mean S-FTIR spectra of control Calu-1 and NL20 cells obtained at different time points. PCA analysis confirmed that there was no major difference between the spectra of CALU-1 cells obtained at different time points. ~~Furthermore~~ Similarly, the same applied for NL20 cells. Also, no statistically significant differences were ~~seen~~ observed between the spectra of control CALU-1 and NL20 cells obtained at different time points ($p= 0.119$ for Calu-1 and $p= 0.892$ for NL20).

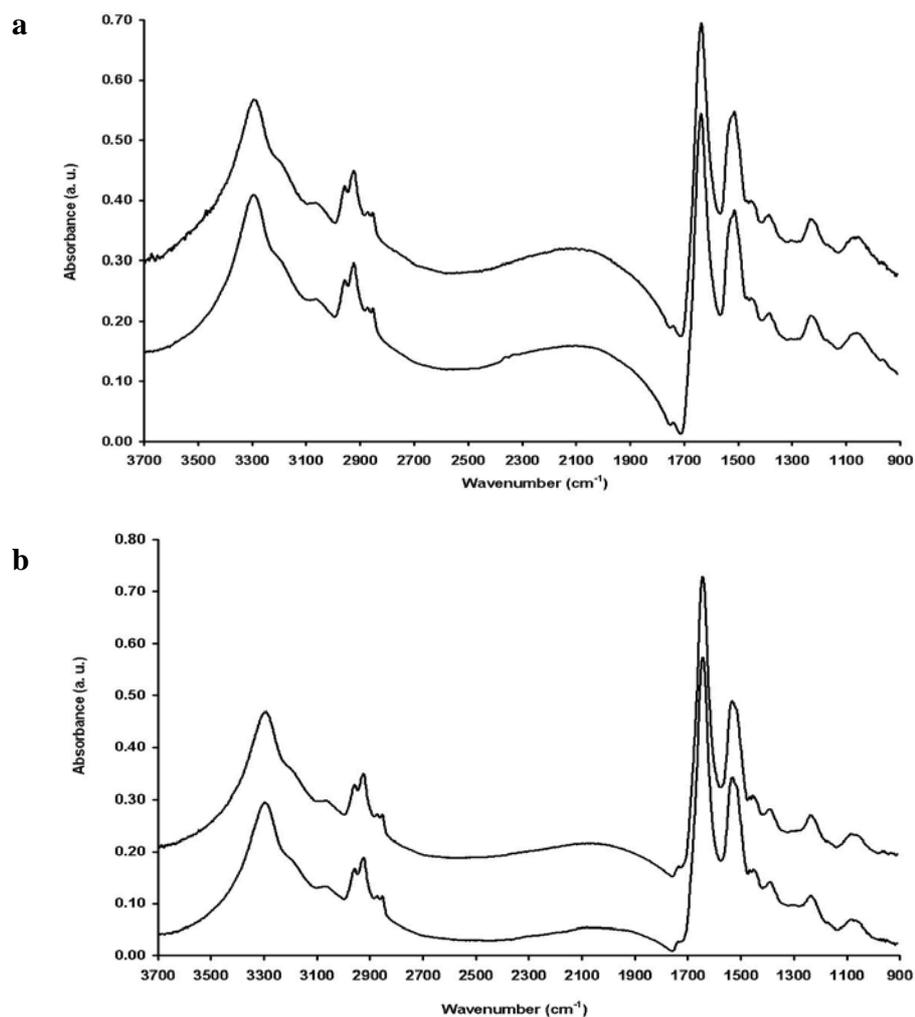


Figure 2: Mean S-FTIR spectrum of the same 50 individual control Calu-1 cells (a) and 50 NL20 cells (b) on day 1 (bottom spectrum) and on day 3 (top spectrum). Spectra are offset for clarity.

Also, On the other hand, we recorded reference spectra of both H&E and Pap stains (Figures 3a and b). The chemical compound causing responsible for the stronger peaks was haematoxylin in both H&E and Pap staining with the strongest peak at 1050 cm^{-1} .

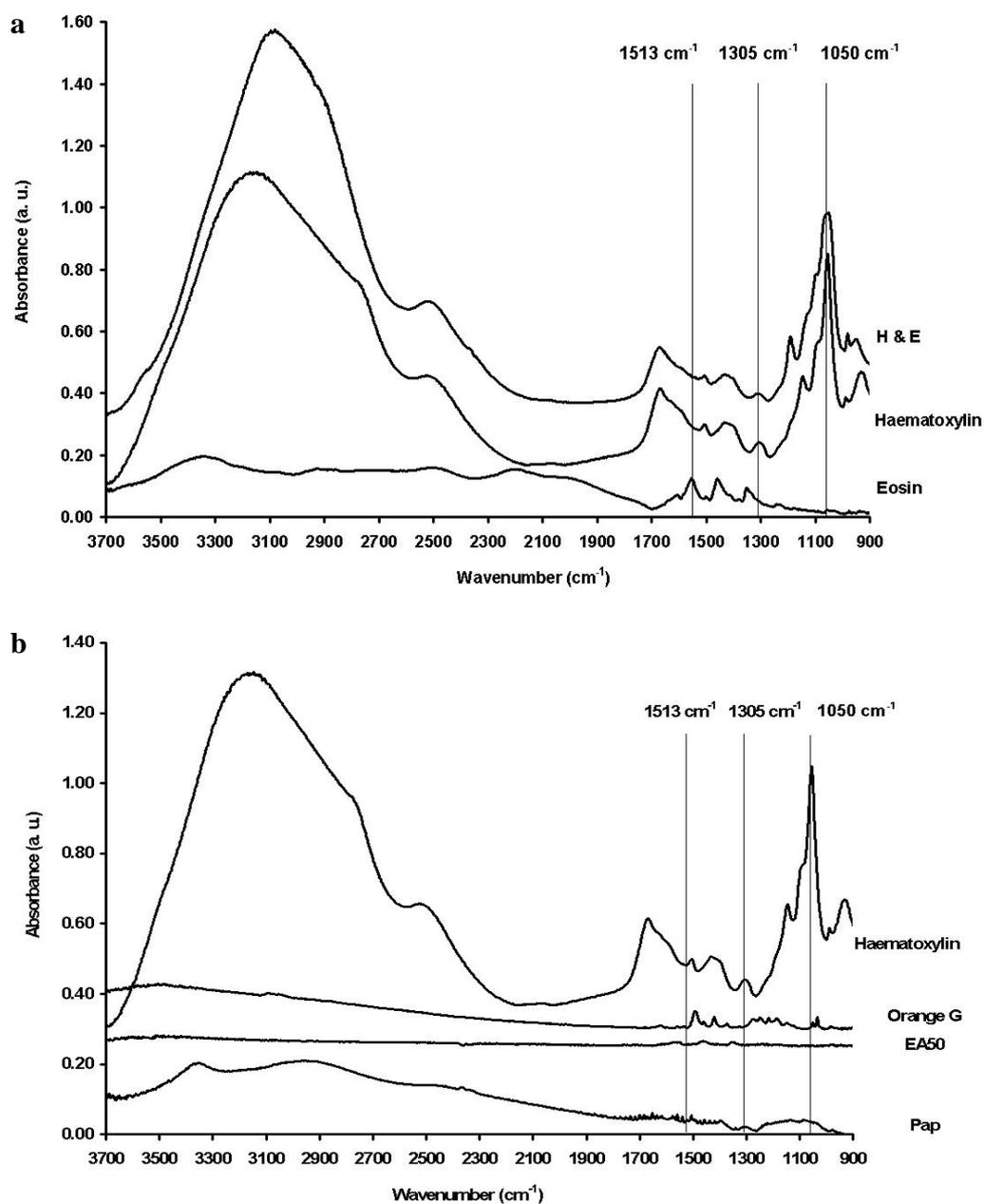


Figure 3: Mean of 10 S-FTIR spectra of H & E stain (a) and its individual components, and Pap stain (b) and its individual components. Spectra are offset for clarity.

Following this preliminary work, we studied whether and how H&E and/or Pap staining could affect the spectra of both lung cancer and epithelial cells. H&E and Pap staining caused changes in the lipids and in the fingerprint area in the spectra of both cell lines (Figures 4 to 7). Regarding lipids, both staining procedures caused a decrease of the peaks around 2920 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} in both study cell lines. In the fingerprint area, there was a decrease in intensity of the band around 1740 cm^{-1} in both cell lines following staining with either H&E or Pap. Also, there was a shift of the Amide II band from around 1530 cm^{-1} to 1513 cm^{-1} in both Calu-1 and NL20 cell lines after staining with either H&E or Pap. Furthermore, ~~there was the appearance of~~ a stronger band appeared around 1305 cm^{-1} in both cell lines following staining with H&E (Figures 4 and 5). However, this band was ~~not so clear~~ less visible when cells were stained with Pap (Figures 6 and 7).

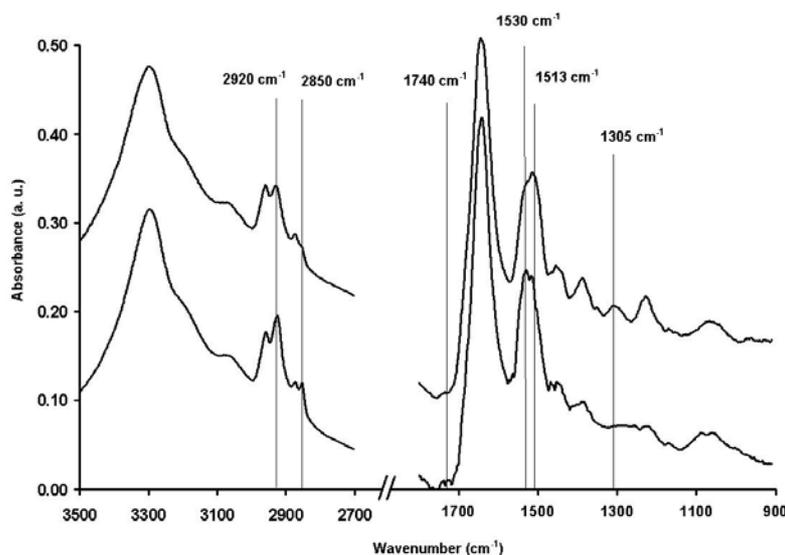


Figure 4: Mean of 50 S-FTIR spectrum of the same 50 individual Calu-1 cells pre-H&E staining (bottom spectrum) and post-H&E staining (top spectrum). Spectra are offset for clarity.

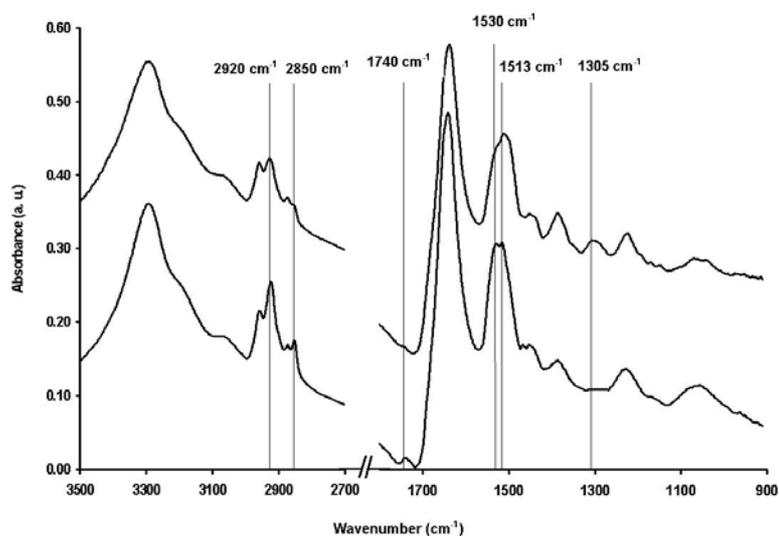


Figure 5: Mean of 50 S-FTIR spectrum of the same 50 individual NL20 cells pre-H&E staining (bottom spectrum) and post-H&E staining (top spectrum). Spectra are offset for clarity.

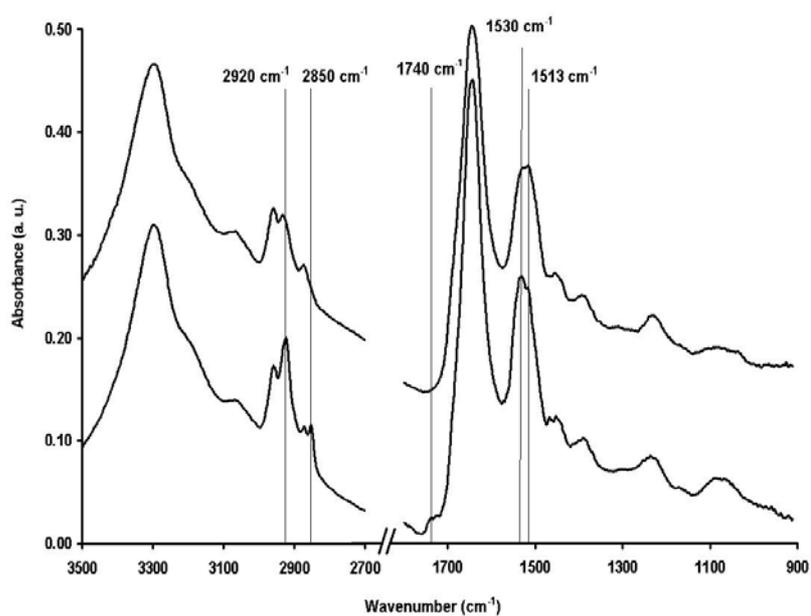


Figure 6: Mean of 50 S-FTIR spectrum of the same 50 individual Calu-1 cells pre-Pap staining (bottom spectrum) and post-Pap staining (top spectrum). Spectra are offset for clarity.

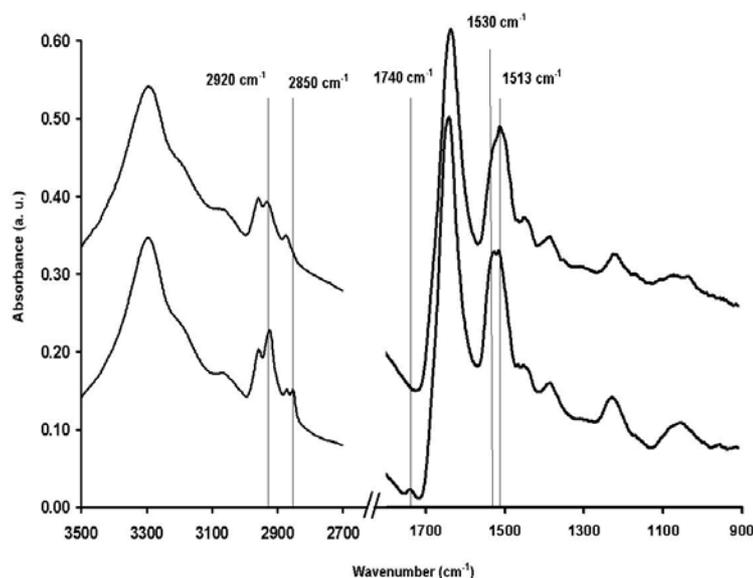


Figure 7: Mean of 50 S-FTIR spectrum of the same 50 individual NL20 cells pre-Pap staining (bottom spectrum) and post-Pap staining (top spectrum). Spectra are offset for clarity.

One of the conditions for FTIR spectroscopy to become a standard tool in cancer diagnosis is the confirmation that different samples prepared at different centres give the same information using the same instrument. To this purpose, we also carried out H&E and Pap staining on both Calu-1 and NL20 cell lines at the Histopathology Department at the University Hospital of North Staffordshire (UHNS), Stoke on Trent, U. K. The aim was to compare, using S-FTIR spectroscopy, the data obtained from the same type of cells but prepared at two different centres (UHNS and Reims University Hospital). Neither PCAs nor statistical analysis showed any differences when comparing NL20 stained with H&E ($p=0.485$) or Pap ($p=0.417$) at either centre, and Calu-1 cells stained with Pap at either centre ($p=0.33$). However, this was not the case for spectra of Calu-1 cells stained with H & E where we saw a statistically significant difference ($p=0.031$) between samples prepared at UHNS and Reims University Hospital. This has important clinical implications as it emphasizes the importance of standardising the way samples are prepared.

Another important issue in pathology is the way samples are prepared for cytology, ~~Most samples are prepared as~~ being in most cases cytopspins or smears. While cytopspins are ~~used~~ more commonly used to study the presence of tumours in fluids (apart from urine), smears are used in fine needle aspirations. Therefore, we studied whether S-FTIR spectroscopy could also be applied to cytology samples prepared in either cytopspin or smear form that had already been stained with H & E or Pap. Figures 8 and 9 show the spectra of Calu-1 cells prepared either as a cytopspin or smear ~~preparation~~, respectively. Interestingly, the peaks around 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} decrease in intensity in either cytopspin or smear samples that have been stained with Pap but their intensity remains similar to control ~~non~~ un-stained samples when cytopspins or smears are stained with H&E. Within the fingerprint area, the peak around 1740 cm^{-1} also disappeared when samples had been stained with Pap but not with H&E. Furthermore, while no major changes are seen in the amide II peak when either cytopspin or smear samples are stained with H&E, the staining with Pap caused a broadening of the amide II peak.

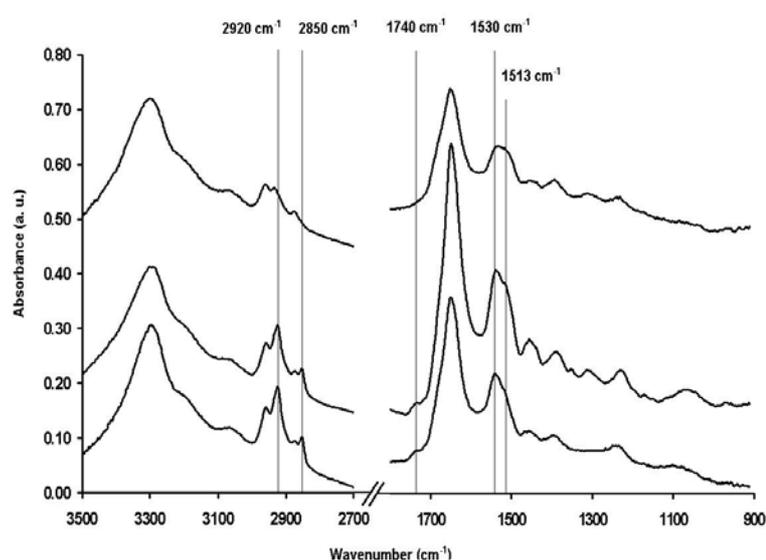


Figure 8: Mean of 50 S-FTIR spectrum of 50 individual Calu-1 cells as cytopspin unstained (bottom spectrum), H&E stained (middle spectrum) and Pap stained (top spectrum). Spectra are offset for clarity.

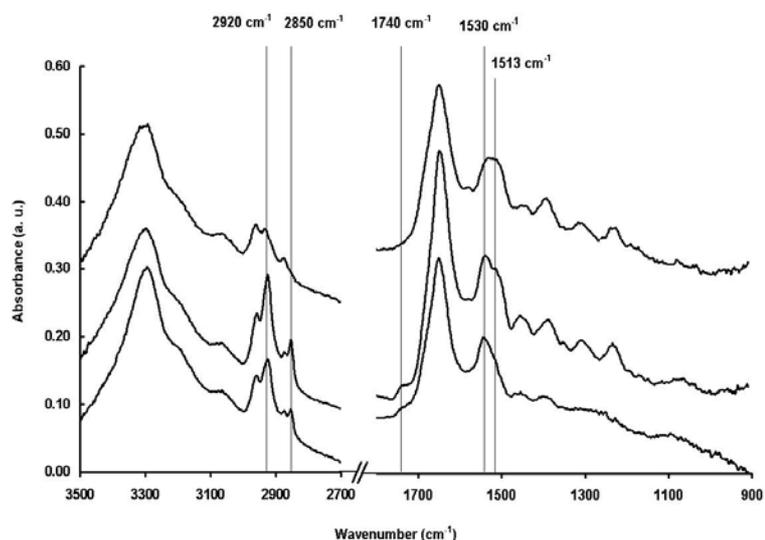


Figure 9: Mean ~~of 50~~ S-FTIR spectrum of 50 individual Calu-1 cells as smear unstained (bottom spectrum), H&E stained (middle spectrum) and Pap stained (top spectrum). Spectra are offset for clarity.

The ultimate aim of such a study is to be able to differentiate between lung cancer cells and their normal counterpart following staining of each individual sample. To this purpose, we carried out PCA analysis of S-FTIR spectra of Calu-1 and NL20 cells following staining with either H&E or Pap. As can be seen in Figures 10a and b, PCA analysis showed different clustering for each cell line which was clearer when cells were stained with Pap. Statistical analysis confirmed a difference between Calu-1 cells and NL20 cells stained with either H&E ($p=0.012$) or Pap ($p=0.00003$). Furthermore, PCA analysis also showed some clustering between unstained Calu-1 and NL20 cells (Figure 11) which was statistically significant ($p=0.0012$).

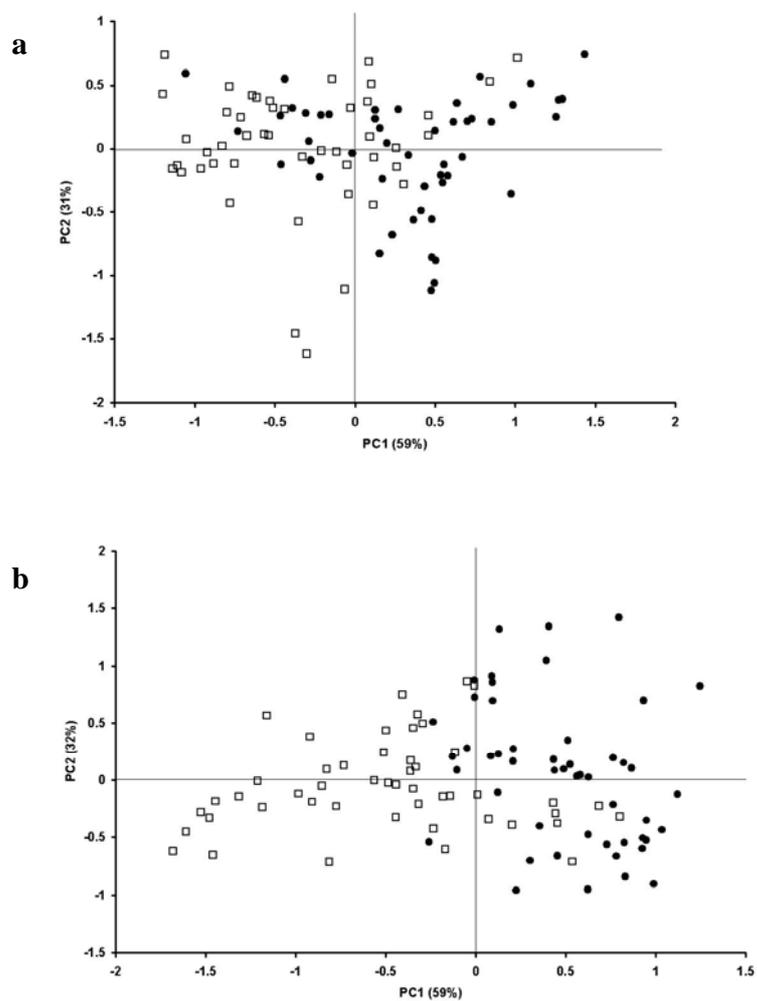


Figure 10: PCA analysis of Calu-1 cell line (circles) and NL20 cell line (open squares) stained with H&E (a) or Pap (b).

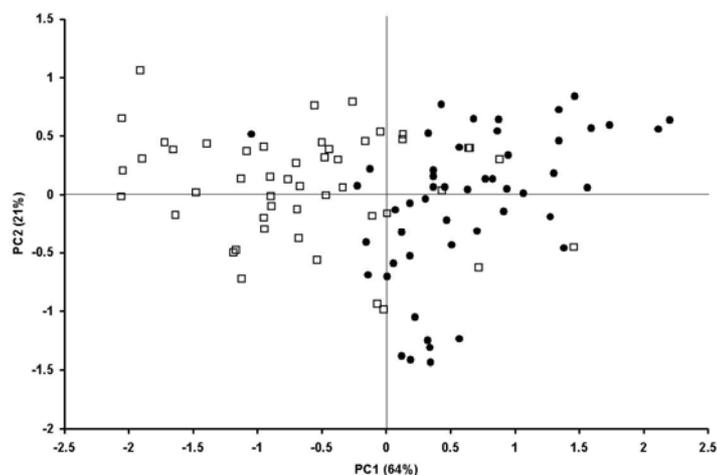


Figure 11: PCA analysis of Calu-1 cell line (circles) and NL20 cell line (open squares) prior to staining.

Discussion

One of the problems facing pathologists when dealing with cancer diagnosis is to assess the presence of cancer cells in those samples (cytology and/or tissue) that ~~either~~ contain either a small number of cells, or abnormal cells considered suggestive but not diagnostic for cancer. It could be hypothesized that spectral markers present in cancer cells might also be present, albeit in smaller intensity in cells that could be suggestive but not diagnostic of cancer. Therefore, a tool that could study and further characterize single cells helping pathologists to reach a diagnosis would be very welcomed. However, this needs to be achieved with already stained samples as it is not possible without staining to figure out which cytology and/or tissue samples could pose such a diagnostic problem.

So far, FTIR spectroscopy using synchrotron or benchtop spectrometers has concentrated on the study of dried or fixed cells^{15,16}, and tissue either frozen^{17, 18}, in paraffin^{18,19}, deparaffinised^{3,20} or prepared by touch imprint cytology²¹. However, in all these cases, samples had been studied without ~~previous~~ prior staining. Therefore, from the pathologist point of view, it would be easier to have a tool that could characterize cells in already stained samples. One of the problems to achieve this is to know how stains could affect

the FTIR spectra and whether such a methodology would be feasible. In order to answer this question, we recorded S-FTIR spectra of single lung cancer cells and their normal counterpart, lung epithelial cells, prior and following staining with either H&E or Pap.

To carry out this work, it was vital to obtain the S-FTIR spectra ~~pre- and post-staining~~ from exactly the same individual cells pre- and post-staining. To do this, cells were cultured on MirrIR low-e slides onto which a grid had manually been drawn (Figure 1). Unstained cell samples were taken to the Soleil Synchrotron facilities and their S-FTIR spectra obtained. Following this, samples were stained at the Pathology Department at Reims University Hospital. However, this posed the problem to figure out whether any differences in the spectra of single cells pre- and post-staining were indeed due to staining or to the transportation of samples from Soleil synchrotron to Reims University Hospital and back to Soleil synchrotron. Furthermore, although the stability of the beam at Soleil synchrotron is such that the same sample should ~~give~~ have the same S-FTIR spectra obtained at different time points, we also wished to confirm that this was the case and that no differences were found in the spectra of these cells caused by the fact that S-FTIR spectra were obtained at different time points. As can be seen in Figures 2a and b, there were no differences in the S-FTIR spectra of the same individual cells for both NL20 and CALU-1 cells when spectra were obtained at different days. This observation was supported by both PCA and statistical analysis showing no differences ($p= 0.119$ for Calu-1, and $p= 0.892$ for NL20). This preliminary work confirms that any possible differences between the spectra of both normal and lung cancer cells pre- and post-staining are not due to transportation or to changes in the synchrotron's beam stability.

The next step was to assess the effects of staining on the S-FTIR spectra of individual NL20 and Calu-1 cells. We used both H & E and Pap staining as these are widely used in histopathology, although Pap is more commonly used for cytology samples. Spectra of ~~not only~~ both stains (H&E and Pap) ~~but also~~ and of the different components of each stain showed that the strongest peaks were caused by haematoxylin, a component present in both staining techniques (Figures 3a and b). On this basis, we studied the changes in the spectra of both Calu-1 and NL20 cell lines following staining with H&E and Pap. As

can be seen in Figures 4 to 7, the main changes in the lipids area correspond to the disappearance of the peaks around 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} in both cell lines and following staining with either H&E or Pap. The peaks at 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} correspond mainly to CH_2 stretching modes of methylene chains in membrane lipids²²⁻²⁴. The use of ethanol in both H&E and Pap staining procedures would explain the decrease in intensity of these two peaks^{15,16,25}. This is further confirmed by the fact that physical removal of membrane and cytoplasmic lipids caused a reduction in the intensity of these two peaks⁶. On the other hand, we did not see any differences in the bands around 2870 cm^{-1} and 2960 cm^{-1} which ~~are made up~~ originate from the CH_3 groups not only of lipids and proteins but also of nucleic acids^{23,26}. In fact, the physical removal of both membrane and cytoplasmic lipids does not cause changes in the intensity of those peaks⁶. Another change that can be associated with the use of ethanol in both H&E and Pap staining procedures is the band at 1740 cm^{-1} (Figures 4 to 7). Absorptions in this spectral region arise from the carbonyl $\text{C}=\text{O}$ stretching mode of phospholipids^{27,28}. It has been described that upon washing with ethanol, phospholipids together with other membrane lipids are removed from the sample and thus their intensity decreased in the spectrum¹⁵. This corroborates the changes observed above for CH_2 modes. Further changes were seen in the fingerprint region. As can be seen in Figures 4 to 7, the main changes were a shift of the amide II band to lower wavenumbers, and the appearance of a stronger band at around 1305 cm^{-1} in cells stained with H&E. It has been previously described that ethanol can cause changes in both amide bands and shifts to lower wavenumbers²⁹. The fact that this shift occurred in the two cell lines and in both H&E and Pap stained samples would indicate that the shift is caused by the staining procedure rather than the stains themselves. This can be confirmed as haematoxylin which causes the strongest peaks in both H&E and Pap does not have a strong band at 1513 cm^{-1} (Figures 3a and b). On the other hand, the region around 1305 cm^{-1} is associated to the amide III band³⁰. However, the spectra of haematoxylin have a distinctive peak at 1305 cm^{-1} (Figures 3a and b). While this peak is less intense when compared to other peaks such as 1050 cm^{-1} , we could assume that haematoxylin itself can give a contribution to the stronger appearance intensity of the 1305 cm^{-1} peak. Furthermore, we do not see such a strong 1305 cm^{-1} peak in the spectra of cells stained with Pap. ~~which could~~ This may be explained by the fact

that in this case, cells undergo 3 washings with ethanol which could remove more haematoxylin from the final stain.

Another important issue in the development of FTIR spectroscopy as a tool to be used in the diagnosis of cancer is to confirm that samples stained at different pathology departments give similar spectra without any statistically significant differences. PCA and statistical analysis showed no differences in the spectra of Calu-1 and NL20 cells stained with H&E or Pap at either the UHNS or the Reims University Hospital apart from the case of Calu-1 cells stained with H & E where we saw a statistically significant difference ($p=0.031$). This shows that S-FTIR spectroscopy could detect differences in sample preparation not seen at the microscope. More important, it highlights that before such a technique could become standard in pathology, the way samples are prepared has to be highly standardized.

A further issue that may affect spectral signatures of cells are the different ways cytology samples are prepared in Pathology Departments. The most common methods are cytospin and smear. Therefore, it was important in this study to confirm that good FTIR spectra could be obtained from stained cytospin and smear samples. Figures 8 and 9 confirmed this observation ~~showed that this was the case~~. However, in the case of the lipid absorption area, while the 2850 cm^{-1} and the 2920 cm^{-1} bands decreased in intensity following the staining with Pap, this was not the case following ~~staining with~~ H&E staining. We have previously mentioned that the disappearance of these 2 bands is due to the effect of ethanol on cells during the staining procedure. It is important to remember that H&E staining includes ~~less~~ fewer steps containing ethanol washings than Pap staining. Therefore, we can assume that the additional steps in the latter caused the decrease in the intensity of these bands. More important, this occurs in both cytospin and smear samples, confirming that these changes are not due to sample preparation (cytospin versus smear) but rather to the staining procedure itself. Similarly, the band around 1740 cm^{-1} also decreases in intensity in cytospin and smear samples that have been stained with Pap while no major changes were ~~are~~ seen following H&E staining. The same reason for the changes in the lipid CH_2 absorption range can be applied to explain the

changes in the 1740 cm^{-1} band. It has been previously described that ethanol may remove lipids that have not been appropriately fixed by formalin¹⁶. While the fixation protocol of cells growing on MirrIR low-e microscope slides was the same as the fixation protocol for cytopins and smears, it could be argued that fixation of lung cancer cells might have been more successful in the case of cytopin and smear rather than in cancer cells growing on low ~~MIRR~~ MirrIR IR slides.

Finally, if this technique is to make it in the clinical practice as a diagnostic tool in pathology, it has to be able to differentiate between cancer cells and their normal counterparts. The data presented here shows this is the case even in stained samples. This was confirmed not only with PCAs (Figures 10 and 11) but also with *t*-test which ~~confirmed~~ showed a statistical difference between lung cancer cells and lung epithelial cells stained with H&E ($p=0.012$), or Pap ($p=0.00003$), and unstained ($p=0.0012$). The data presented here confirms the potential of this technique in cancer diagnosis. Further work is now being carried out to assess whether similar spectra can be obtained from the same stained samples using benchtop spectrometers. The latter will be a logical step to bring this technique to Pathology Departments to be used in the diagnosis of cancer.

Acknowledgements

We acknowledge SOLEIL synchrotron for provision of synchrotron radiation facilities at beamline SMIS (proposal number 20080402) and the Pathology Department at Reims University Hospital. Financial support from The Harold Hyam Wingate Foundation, the M Gibbons Memorial Fund, Mr C. Micallef and friends, the Norwegian Food Research Foundation, the French “Ligue Contre le Cancer”, and the “Conseil Régional de Champagne-Ardenne” is also greatly acknowledged.

References

1. Andrus PG. Cancer monitoring by FTIR spectroscopy. *Technol Can Res Treat* 2006; 5: 157- 167.
2. Lasch P, Haensch W, Naumann D, et al. Imaging of colorectal adenocarcinoma using FTIR microspectroscopy and cluster analysis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1688: 176-186.
3. Gazi E, Baker M, Dwyer J, et al. A Correlation of FTIR Spectra Derived from Prostate Cancer Biopsies with Gleason Grade and Tumour Stage. *Eur Urol* 2006; 50: 750-761.
4. Dukor RK, Liebman MN, and Johnson BL. A new, non-destructive method for analysis of clinical samples with DT-IR microspectroscopy. Breast cancer tissue as an example. *Cell Mol Biol* 1998; 44: 211-217.
5. Dumas P, Sockalingum GD, and Sulé-Suso J. Adding synchrotron radiation to infrared microspectroscopy: what's new in biomedical applications? *Trends Biotechnol* 2007; 25: 40-44.
6. Pijanka J, Kohler A, Yang Y, et al. FTIR Microscopy. Spectroscopic Signatures of Single, Isolated Cancer Cell Nuclei using Synchrotron Infrared microscopy. *Analyst* 2009; 134: 1176-1181.
7. Dumas P, Jamin N, Teillaud JL, et al. Imaging capabilities of synchrotron infrared microspectroscopy. *Faraday Discuss* 2004; 126: 289–302.
8. Holman H-YN, Bjornstad KA, McNamara MP, et al. Synchrotron infrared spectromicroscopy as a novel bioanalytical microprobe for individual living cells: cytotoxicity considerations. *J Biomed Opt* 2002; 7: 417-424.

9. Martin MC, Tsvetkova NM, Crowe JH, et al. Negligible sample heating from synchrotron infrared beam. *Appl Spectrosc* 2001; 55: 111–113.
10. Kohler A, Sulé-Suso J, Sockalingum GD, et al. Estimating and correcting Mie scattering in synchrotron-based microscopic FTIR spectra by extended multiplicative signal correction (EMSC) *Appl Spectrosc* 2008; 62: 259-266.
11. Chang CI, *Hyperspectral Imaging: Techniques for Spectral Detection and Classification*: Kluwer Publishers, 2003.
12. Lam KP, Austin J, and Day CR. A Coarse-Grained Spectral Signature Generator, *Proceedings of SPIE* 2007; 6356: 62560S1-12.
13. Friedman JH and Tukey JW. A projection pursuit algorithm for exploratory data analysis. *IEEE Trans. Computers* 1974; 23: 881–889.
14. Lam KP and Emery R, Image pixel guided tours – A software platform for non-destructive x-ray imaging. *Proceedings of SPIE/IS&T* 2009; 724: 72450N1-10.
15. Pacifico A, Chiriboga LA, Lasch P, et al. Infrared spectroscopy of cultured cells II. Spectra of exponentially growing, serum deprived and confluent cells. *Vibr Spectrosc* 2003; 32: 107-115.
16. Gazi E, Dwyer J, Lockyer NP, et al. Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *Biopolymers* 2005; 77: 18-30.
17. Bird B, Miljkovic M, Romeo MJ, et al. Infrared micro-spectral imaging: distinction of tissue types in axillary lymph node histology. *BMC Clin Pathol* 2008; 8: 8.

18. Untereiner V, Piot O, Diebold M-D, et al. Optical diagnosis of peritoneal metastases by infrared microscopic imaging. *Anal Bioanal Chem* 2009; 393: 1619-1627.
19. Tfayli A, Piot O, Durlach A, et al. Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using FTIR microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1724: 262-269.
20. Bird B, Bedrossian K, Laver N, et al. Detection of breast micro-metastases in axillary lymph nodes by infrared micro-spectral imaging. *Analyst* 2009; 134: 1067-1076.
21. Das K, Kendall C, Isabelle M, et al. FTIR of touch imprint cytology: a novel tissue diagnostic technique. *J Photochem Photobiol B*. 2008; 18:160-164.
22. Lasch P, Boese M, Pacifico A, et al. FT-IR spectroscopy investigations of single cells on the subcellular level. *Vibrat Spectrosc* 2002; 28: 147-157.
23. Gao T, Feng J, and Ci Y, Human breast carcinoma tissues display distinctive FTIR spectra: implications for the histological characterisation of carcinomas, *Anal Cell Pathol* 1999; 18: 87-93.
24. Zhou J, Wang Z, Sun S, et al. A rapid method for detecting conformational changes during differentiation and apoptosis of HL60 cell by Fourier Transform infrared spectroscopy, *Biotechnol Appl Biochem* 2001; 33: 127-132.
25. Beljebbar A, Amharref N, Lévèques A, et al. Modeling and Quantifying Biochemical Changes in C6 Tumor Gliomas by Fourier Transform Infrared Imaging. *Anal Chem* 2008; 80: 8406-8415.

26. Neviliappan S, Fang Kan L, Tiang L, et al. Infrared spectral features of exfoliated cervical cells, cervical adenocarcinoma tissue and adenocarcinoma cell line (SiSo). *Gynecol Onco*, 2002; 85: 170–174.
27. Jamin N, Dumas P, Moncuit J, et al. Highly resolved chemical imaging of living cells by using synchrotron infrared microspectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 4837-4840.
28. Holman H-YN., Martin MC, Blakely EA, et al. IR spectroscopic characteristics of cell cycle and cell death probed by synchrotron radiation based Fourier transform IR spectromicroscopy, *Biopolymers* 2000, 57: 329–335.
29. Pleshko NL, Boskey AL, and Mendelsohn R. An FTIR microscopic investigation of the effects of tissue preservation on bone. *Calcif Tissue Int* 1992; 51: 72-77.
30. Fujioka N, Morimoto Y, Takeuchi K, et al. Difference in infrared spectra from cultures cells dependent on cell-harvesting methods. *Appl Spectroscopy* 2003; 57: 241-243.

Florence DRAUX

PROBING TUMOR CELL AND ITS INTERACTION WITH AN ANTICANCER AGENT: A BIOPHOTONIC APPROACH USING RAMAN AND INFRARED MICROSPECTROSCOPIES

Th. Pharm. Univ. : Reims : 2009

Abstract :

The objectives of this work is two-fold : the development of biophotonic approaches at the single cell level, and the study of anticancer drug/cell interaction using a non-small-cells lung cancer model. Using Raman microspectroscopy, we acquired and discriminated spectral information from nucleus, cytoplasm, and membrane networks of single living cells, using the structural and distribution differences in nucleic acids, proteins, and phospholipids. The impact of several sample preservation methods were studied and characterized based on the spectral features of these macromolecules. Finally, we detected spectral features associated with the effect of low doses of an anticancer drug, gemcitabine, cell populations using high-throughput infrared spectroscopy. These observations were confirmed at the single cell level using synchrotron infrared microspectroscopy, and on single living cells using Raman microspectroscopy.

These results show the potentials of infrared and Raman microspectroscopies as future tools for high-throughput spectral cytology. They play an important role in the understanding of biological phenomena at the cellular level. The effect of a drug can be rapidly assessed via such new biophotonic methods and consequently move from a "one for all" treatment to a more personalised strategy.

Mots clés : Raman and infrared spectroscopies, cells, anticancer agent, spectral imaging, synchrotron

JURY

Rapporteurs: Pr. Igor CHOURPA
Pr. Erik GOORMAGHTIGH
Examineurs: Pr. Michel MANFAIT
Dr. Josep SULE-SUSO
Pr. Pierre JEANNESSON
Dr. Ganesh D.SOCKALINGUM

Florence DRAUX

ANALYSE DE LA CELLULE Tumorale ET DE SON INTERACTION AVEC UN AGENT ANTICANCEREUX : APPROCHE BIOPHOTONIQUE PAR MICROSPECTROSCOPIES RAMAN ET INFRAROUGE

Th. Pharm. Univ. : Reims : 2009

Résumé :

Ce travail visait un double objectif ; la mise au point d'une approche biophotonique à l'échelle de la cellule isolée, et l'étude de l'interaction cellule/médicament dans un modèle cellulaire de cancer bronchique non-à-petites cellules. En microspectroscopie Raman, nous avons montré, à l'échelle de la cellule vivante isolée, qu'il est possible d'acquérir et de différencier des informations spectrales issues du noyau, du cytoplasme et des réseaux membranaires en se basant sur les différences de répartition et de structure des acides nucléiques, protéines et phospholipides. Nous avons également caractérisé l'impact sur l'information spectrale des macromolécules cellulaires de différents modes de préparation utilisés en routine en biologie cellulaire. Dans le domaine de la pharmacologie spectrale à l'échelle cellulaire, nous avons détecté l'effet de faibles doses d'un agent anticancéreux, la gemcitabine, sur les profils spectraux de populations cellulaires par spectroscopie infrarouge à haut débit. Les effets observés ont été confirmés au niveau unicellulaire par microspectroscopie infrarouge à source synchrotron, et sur cellules vivantes isolées par microspectroscopie Raman.

Ces résultats montrent que les microspectroscopies infrarouge et Raman ont un fort potentiel dans le développement de nouvelles méthodes optiques pour la cytologie spectrale à haut débit. Ces méthodologies joueront un rôle important dans la compréhension de phénomènes biologiques au niveau cellulaire. L'action d'un médicament pourra être abordée par ces nouvelles voies biophotoniques, permettant ainsi d'évoluer d'un schéma de traitement "un pour tous" vers un modèle plus personnalisé.

Mots clés : imagerie spectrale, cellules, anticancéreux, spectroscopie Raman, spectroscopie fourier infrarouge, synchrotrons

JURY

Rapporteurs: Pr. Igor CHOURPA
Pr. Erik GOORMAGHTIGH

Examineurs: Pr. Michel MANFAIT
Dr. Josep SULE-SUSO
Pr. Pierre JEANNESSON
Dr. Ganesh D.SOCKALINGUM