

## BROADBAND COHERENT ANTI-STOKES RAMAN SCATTERING HIGHLIGHTS STATE OF CHROMATIN CONDENSATION IN THE HIGH WAVENUMBER.

Tiffany Guerenne-Del Ben<sup>\*1</sup>, Philippe Leproux<sup>2</sup>, Vincent Couderc<sup>2</sup>, Vincent Sol<sup>1</sup>,  
Jean-Michel Petit<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EA 7500 PEIRENE, <sup>2</sup>XLIM UMR 7252, University of Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges

**Abstract:** Our study aims to identify vibrational differences associated with the cell cycle by multiplex CARS micro spectroscopy in the CH zone. For this purpose, a human cell line HEK293 is used and blocked either in interphase or prophase and then analysed by CARS mapping on the vibration modes associated with proteins and lipids. We have shown that using the vibrational mode of proteins, we can characterize the state of chromatin condensation, moving from a low condensed state (interphase) to hypercondensed (mitosis). This hypercondensation is ensured by the binding of condensins to chromatin, proteins that are associated with chromatin to promote compaction.

**Keywords:** Coherent Anti-Stokes Raman Scattering microspectroscopy, Human cell line HEK293, High wavenumber spectral region, state of chromatin condensation

### 1. INTRODUCTION

L'analyse d'échantillons biologiques sans marquage préalable est devenue un enjeu majeur dans la recherche voire dans le diagnostic. Parmi les nouvelles technologies en plein essor, la microspectroscopie vibrationnelle est un bon candidat pour l'analyse d'échantillons biologiques. Depuis les années 2000, la microspectroscopie Raman (MSR) est devenue un outil de base pour des analyses cellulaires sans marquage [1]. Pour cela, une source lumineuse monochromatique est envoyée sur l'échantillon. Il en résulte trois types de photons réémis selon l'interaction entre les photons incidents et l'échantillon : (1) Une diffusion élastique correspondant à des photons réémis avec la même énergie que les photons incidents ; (2) une diffusion inélastique où les photons réémis ont soit perdu de l'énergie (diffusion inélastique Stokes) ou gagné de l'énergie (diffusion inélastique anti-Stokes). Dans le cas de la MSR, seule la diffusion inélastique Stokes est prise en compte car la diffusion anti-Stokes est trop faible pour être mise en évidence [2]. Ces photons résultants seront analysés par un spectroscope qui va pouvoir déterminer la différence d'énergie entre le photon incident et le photon réémis. Cette différence d'énergie correspondra à la capacité de vibration d'une liaison chimique. Il en résulte un spectre Raman, exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ , où chaque raie correspond à la vibration d'une liaison. Le spectre Raman comporte trois zones : (1) la zone dite d'empreinte biologique, comprise entre 400 et 1800  $\text{cm}^{-1}$ , où seules les liaisons associées aux échantillons biologiques peuvent vibrer ; (2) la zone dite blanche entre 1800 et 2500  $\text{cm}^{-1}$ , où aucune liaison associée au biologique vibre ; (3) la zone dite CH entre 2500 et 3200  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la vibration de toutes les molécules comportant des hydrogènes liés à des carbones ( $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ) [3].

La MSR a été utilisée pour discriminer des cellules saines des cellules tumorales [4-6]. Cependant, l'un des inconvénients majeurs de la MSR reste le temps d'analyse (nombreuses minutes) bien trop long pour une expérimentation sur des cellules vivantes ou du matériel biologique, avec des résultats parfois peu discriminants en raison d'un fort rapport signal sur bruit. Récemment, une version « améliorée », la microspectroscopie CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering), a été mise en place. Elle donne les mêmes informations que la MSR mais de manière plus rapide et plus sensible [7].

Cette nouvelle technologie est souvent utilisée dans la zone spectrale associée à la signature des liaisons CH. Deux modes vibrationnels sont principalement utilisés : 2850  $\text{cm}^{-1}$  et 2940  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux modes de

---

\* Tiffany.guerenne-del\_ben@unilim.fr

vibration des CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>, respectivement associés aux lipides et aux protéines [8,9]. Des études ont porté sur la signature correspondant aux lipides, et mettent en évidence de nombreux processus biologiques.

Néanmoins, très peu d'études prennent en considération l'influence du cycle cellulaire sur l'origine des signaux CARS. En effet, durant leur prolifération, les cellules sont réparties dans les différentes phases du cycle cellulaire, provoquant des changements morphologiques, de répartition des biomolécules et d'organisation des organites. Ces études ont, pour l'instant, seulement été réalisées par la MSR et se limitent à la zone biologique [10,11].

Le but de notre étude sera d'identifier les changements vibrationnels associés aux phases du cycle cellulaire par la microspectroscopie CARS, dans la zone CH. Pour ce faire, le type de microspectroscopie CARS utilisé est dit « multiplexe » du fait qu'il permet de sonder plusieurs modes vibrationnels simultanément couplé à un spectromètre de haute résolution ( $< 1 \text{ cm}^{-1}$ ). Pour l'étude du cycle cellulaire, la lignée humaine HEK293 sera bloquée dans deux phases précises du cycle cellulaire, qui sont à l'origine de la plus grande variabilité cellulaire : la fin de la phase G1 (interphase) et le début de la mitose (prophase). Ces cellules seront cartographiées par microspectroscopie CARS pour mettre en évidence des différences de signaux vibrationnels en lien avec le cycle cellulaire. Pour finir, l'influence de la fixation cellulaire sur les signaux CARS sera aussi évaluée, en comparaison avec des cellules vivantes.

## 2. Résultat et discussion

### 2.1. Méthodologie

La microspectroscopie CARS multiplexe comprend : Un laser 1064 nm utilisé pour générer la radiation pompe. En utilisant une lame demi-onde et un polariseur, une partie de la pompe est injectée dans une fibre photonique permettant la génération d'un faisceau Stokes supercontinuum (1100-1650 nm). Concernant le faisceau pompe monochromatique (1064 nm), ce dernier suit une ligne à retard pour rejoindre le faisceaux pompe au même endroit. Par la suite, les deux faisceaux sont envoyés sur l'échantillon. Les photons résultants sont conduits jusqu'au spectromètre qui va pouvoir analyser la différence d'énergie entre les photons incidents et résultants. Cette analyse spectrale se fera dans la zone de vibration CH ( $2500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$ ) [12].

Les cellules sont scannées par les deux faisceaux sur une zone quadrillée déterminée à l'avance (pas de  $0.3 \mu\text{m}$ ). Il en résulte que chaque point du quadrillage correspondra à un spectre CARS. Sur ce spectre, nous nous concentrons principalement sur deux plages spectrales : de  $2845$  à  $2855 \text{ cm}^{-1}$  permettant la mise en évidence des liaisons CH<sub>2</sub> et de  $2930$  à  $2940 \text{ cm}^{-1}$  pour les liaisons CH<sub>3</sub>. Chaque spectre de la cartographies est traité par la méthode d'Entropie Maxium (MEM) pour éliminer la partie imaginaire de la susceptibilité non linéaire du troisième ordre ( $\text{Im}\{\chi(3)\}$ ) [13,7]. Cela permet l'obtention de cartographie cellulaire qui révèle les vibrations correspondant aux lipides et aux protéines. En parallèle, les noyaux des cellules seront marqués par un fluorophore spécifique de l'ADN, le DAPI, qui nous permet de valider notre hypothèse. Pour cela, un filtre d'excitation et d'émission seront utilisés à l'entrée et à la sortie du microspectroscope CARS et illuminé par lumière blanche.

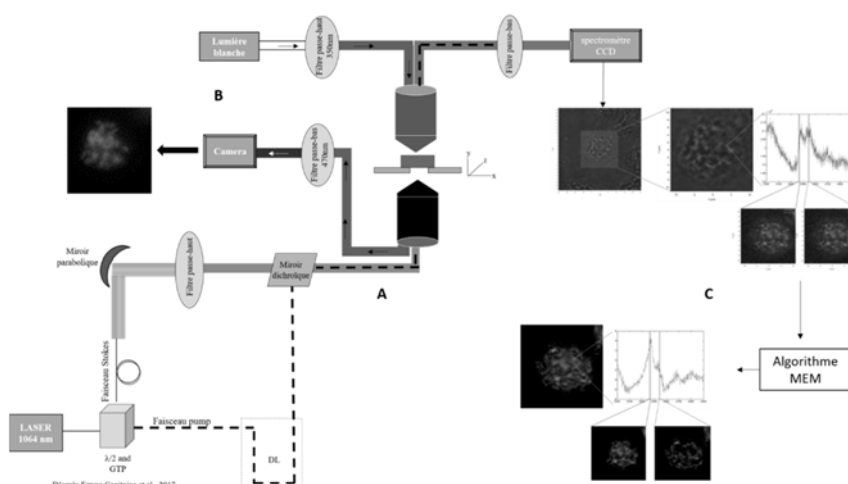


Figure 1. Procédure d'analyse cellulaire par la microspectroscopie CARS multiplexe et traitement des données.

Il est présenté un schéma récapitulatif de l'outil CARS (A) avec le système de détection du DAPI (B) et la procédure d'analyse et de traitement des cartographies CARS (C).

## 2.2. Mise en évidence de l'état de condensation de la chromatine par l'intermédiaire de la signature vibrationnelle des liaisons CH<sub>3</sub>.

Pour identifier des différences spectrales associées au cycle cellulaire, la lignée humaine HEK293 a été utilisée. Les cellules ont été bloquées dans deux phases distinctes du cycle cellulaire (interphase et prophase) puis fixées avant l'analyse par la microspectroscopie CARS. Les plages correspondantes aux protéines (liaison CH<sub>3</sub>) et aux lipides (liaison CH<sub>2</sub>) sont montrées dans la figure 2. On constate une différence de localisation des signatures des liaisons CH selon la phase du cycle cellulaire étudiée.

Dans un premier temps, le blocage en prophase a bien été opéré car les cellules sont plutôt de forme arrondie avec un noyau peu visible. A l'opposé, les cellules en interphase ont une morphologie différente, elles sont étalées avec un noyau parfaitement délimité dans lequel les nucléoles sont visibles.

Concernant les signatures CARS, nous constatons une nette différence d'intensité et de localisation concernant les vibrations associées aux modes CH<sub>3</sub> et CH<sub>2</sub>. Pour la liaison associée aux CH<sub>3</sub>, en interphase, elle est diffuse dans le noyau avec une surintensité qui correspond au nucléole. Pour les cellules en prophase, elle est plus condensée dans une zone de la cellule, de forte intensité à associer à l'hypercondensation de la chromatine. Pour la signature des CH<sub>2</sub>, que ce soit pour les cellules en interphase ou en prophase, elle est majoritairement présente dans le cytoplasme, avec une intensité plus forte et une organisation plus structurée pour les cellules en prophase.

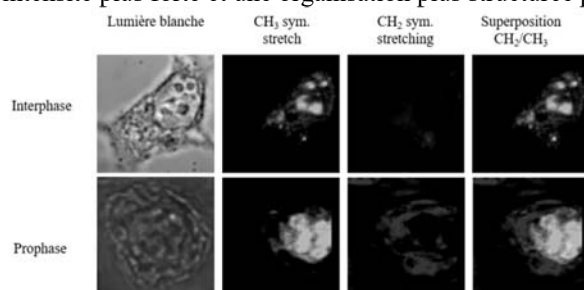


Fig 2. Cartographie CARS de cellules HEK293 fixées et bloquées soit en interphase ou en prophase. Mise en évidence des modes vibrationnels des liaisons CH<sub>3</sub> (2940 cm<sup>-1</sup>) et CH<sub>2</sub> (2855 cm<sup>-1</sup>).

Au vu des résultats et de la littérature, nous pouvons supposer que la signature associée au CH<sub>2</sub> correspond principalement à des structures riches en lipides présentes dans le cytoplasme. Nous constatons que lorsque les cellules sont en prophase, la structure réticulée observée peut être due aux modifications du réticulum endoplasmique qui change de conformation durant la mitose, passant de forme principalement tubulaire à une forme exclusivement en feuillet donnant un aspect réticulé au cytoplasme. Concernant la signature des CH<sub>3</sub>, principalement associée aux protéines, elle est majoritairement présente dans le noyau des cellules. Il semblerait que la microspectroscopie CARS puisse mettre en évidence l'état de la chromatine. Durant les phases G1 et S du cycle cellulaire, la chromatine sera majoritairement sous forme d'euchromatine, structure plus diffuse dans le noyau et faiblement visible par la signature des CH<sub>3</sub>. A l'inverse, durant la mitose, de par le recrutement de nombreuses protéines, la chromatine se retrouvera dans un état hypercondensé dans une zone restreinte de la cellule. Cela provoquera une zone très riche en protéines, identifiable par la microspectroscopie CARS. Ainsi, de par l'état de condensation de la chromatine, la microspectroscopie CARS sera capable de discriminer grâce aux différences de localisation vibrationnelle des cellules en interphase des cellules en mitose.

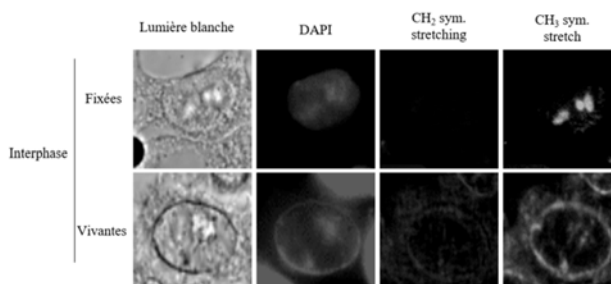


Fig 3. Cartographie CARS de cellules HEK293 bloquées en interphase fixées ou vivantes. Mise en évidence des noyaux par coloration DAPI ainsi que des modes vibrationnels des liaisons CH<sub>3</sub> (2940 cm<sup>-1</sup>) et CH<sub>2</sub> (2855 cm<sup>-1</sup>).

### 2.3. Influence de la fixation sur les signatures CARS.

L'influence de l'état des cellules vivantes ou mortes (fixation) a ensuite été évaluée par la microspectroscopie CARS. Pour cela, les cellules HEK293 ont été bloquées en interphase puis analysées vivantes ou fixées avec du PFA avant analyse. Les signatures associées aux lipides et aux protéines ainsi que la coloration du noyau par le DAPI sont montrés dans la figure 3. Nous mettons en évidence que la signature associée au  $\text{CH}_2$ , en terme d'organisation et d'intensité, semble être assez proche entre des cellules fixées et vivantes. A l'inverse, celle associée aux  $\text{CH}_3$  montre une organisation différente qui permet de visualiser le contour du noyau certainement via l'hétérochromatine accolée à l'enveloppe nucléaire, ceci uniquement pour les cellules vivantes.

Notre hypothèse étant que le mode de vibration des liaisons  $\text{CH}_3$ , associés aux protéines, nous permet de mettre en évidence l'état de condensation de la chromatine par la microspectroscopie CARS. Il est possible que le traitement chimique de fixation provoque une déstructuration de l'enveloppe nucléaire libérant l'hétérochromatine. Ainsi lorsque les cellules sont fixées avec le PFA, seul « fixateur » qui autorise des analyses par microspectroscopie CARS, nous constatons une perte d'information au niveau de la structure du noyau.

### 3. CONCLUSIONS

En conclusion, la microspectroscopie CARS multiplexe, utilisée dans les hautes longueurs d'onde permet de distinguer la position des cellules dans le cycle cellulaire par l'intermédiaire des protéines de condensation de la chromatine grâce à la vibration associée aux  $\text{CH}_3$ . De plus, cette technologie permet de révéler indirectement la morphologie du noyau mais seulement pour les cellules vivantes.

### RÉFÉRENCES

- [1] Rodriguez, L. G., Lockett, S. J., Holtom, G. R. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: A biological review, *Cytometry Part A*, vol. 69A, no. 8, 2006, 779–791.
- [2] Felidj, N. Introduction à... La spectroscopie Raman et la diffusion exaltée de surface, *Photoniques*, vol. 81, no. 81, 2016, 46–49.
- [3] Ramos, I. R. M., Malkin, A., Lyng, F. M. Current Advances in the Application of Raman Spectroscopy for Molecular Diagnosis of Cervical Cancer. *BioMed Research International*, vol. 2015, no. 561242, 2015, 1–9.
- [4] Bi, X., Rexer, B., Arteaga, C. L., Guo, M., Mahadevan-Jansen, A., Evaluating HER2 amplification status and acquired drug resistance in breast cancer cells using Raman spectroscopy, *Journal of Biomedical Optics*, vol. 19, no. 2, 2014, 025001.
- [5] Crow, P., Stone, N., Kendall, C. A., Uff, J. S., Farmer, J. A. M., Barr, H., Wright, M. P. J., The use of Raman spectroscopy to identify and grade prostatic adenocarcinoma in vitro, *British Journal of Cancer* vol. 89, no. 1, 2003, 106–108.
- [6] Yosef, H. K., Mavarani, L., Maghnouj, A., Hahn, S., El-Mashtoly, S. F., Gerwert, K., In vitro prediction of the efficacy of molecularly targeted cancer therapy by Raman spectral imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 407, no. 24, 2015, 8321–8331.
- [7] Day, James P. R., Katrin F. Domke, Gianluca Rago, Hideaki Kano, Hiro-o Hamaguchi, Erik M. Vartiainen, et Mischa Bonn, Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy, *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 115, no. 24, 2011, 7713–25.
- [8] Levchenko, S. M., Peng, X., Liu, L., Qu, J., The impact of cell fixation on coherent anti-stokes Raman scattering signal intensity in neuronal and glial cell lines., *Journal of Biophotonics*, vol. 12, no. 1, 2019, e201800203.
- [9] Tipping, W. J., Lee, M., Serrels, A., Brunton, V. G., Hulme, A. N., Stimulated Raman scattering microscopy: an emerging tool for drug discovery., *Chemical Society Reviews*, vol. 45, no. 8, 2016, 2075–2089.
- [10] Matthäus, C., Boydston-White, S., Miljković, M., Romeo, M., Diem, M., Raman and Infrared Microspectral Imaging of Mitotic Cells., *Applied Spectroscopy*, vol. 60, no. 1, 2006, 1–8.
- [11] Swain, R. J., Jell, G., Stevens, M. M., Non-invasive analysis of cell cycle dynamics in single living cells with Raman micro-spectroscopy, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 104, no. 4, 2008, 1427–1438.
- [12] Capitaine, Erwan, Nawel Ould Moussa, Christophe Louot, Sylvia M. Bardet, Hideaki Kano, Ludovic Duponchel, Philippe Lévêque, Vincent Couderc, et Philippe Leproux, Fast Epi-Detected Broadband Multiplex CARS and SHG Imaging of Mouse Skull Cells, *Biomedical Optics Express*, vol. 9, no 1, 2018, 245.
- [13] Segawa, Hiroki, Yuichi Kaji, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Takeaki Ozawa, Tetsuro Oshika, et Hideaki Kano, Multimodal and Multiplex Spectral Imaging of Rat Cornea Ex Vivo Using a White-Light Laser Source, *Journal of Biophotonics*, vol. 8, no. 9, 2015, 705–13.