



Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

**PEIRENE (EA 7500), équipe « Glycosylation et Différenciation
Cellulaire »**

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par
Tiffany GUERENNE-DEL BEN

Le 20 décembre 2019

La microspectroscopie CARS appliquée au suivi de l'activation d'un récepteur associé à la cancérogenèse

Thèse co-dirigée par le Pr. Jean-Michel PETIT et le Pr. Vincent SOL

JURY :

Président

M. Ludovic DUPONCHEL, Professeur, Université de Lille

Rapporteurs

M. Laurent MOREL, Professeur, Université de Clermont-Ferrand

M. Olivier PIOT, Directeur de Recherche, Université de Reims

Examineurs

M. Jean-Michel PETIT, Professeur, Université de Limoges

M. Vincent SOL, Professeur, Université de Limoges

M. Philippe LEPROUX, Maître de conférences, Université de Limoges



À mon « cœur » de famille

« Le travailleur véritablement courageux est celui qui ne craint pas de se coucher à côté de son travail pour bien lui montrer qu'il n'a pas peur de lui »
Pierre Dac

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury. Aux rapporteurs Monsieur Ludovic Duponchel, Professeur à l'Université de Lille, Monsieur Laurent MOREL, Professeur à l'Université de Clermont-Ferrand et Monsieur Olivier Piot, Directeur de recherche à l'Université de Reims Champagne-Ardenne d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'avoir consacré du temps pour évaluer ces travaux.

Je tiens à remercier mes deux co-directeur de thèse, Monsieur Jean-Michel Petit et Monsieur Vincent Sol, Professeurs à l'Université de Limoges pour leurs encadrements, leurs aides, leurs disponibilités ainsi que leurs soutiens durant ces trois années de thèse. Un grand merci particulièrement au Professeur Jean-Michel Petit. Nous avons commencé à travailler ensemble à la suite des problématiques liées à mon stage de Master 2 à Lyon. Vous ne m'aviez pas seulement trouvé une opportunité de faire mon stage de Master 2, vous m'avez pris sous votre aile. Nous avons commencé ensemble ce nouveau projet de recherche pluridisciplinaire, en collaboration avec Xlim. Le travail était compliqué mais grâce à un acharnement et une envie de réussite conjoint, nous sommes parvenu à donner de la valeur à ce projet. Durant ces trois années, il est possible que nous avons eu des divergences d'idées, mais ma façon de penser, d'imaginer les manipulations et hypothèses ont toujours été prises en compte. Cela nous a bien donnée de nombreuses heures de discussion intense, ouvrant toujours le champ à de nouvelles interrogations et nouvelles pistes de travail. J'espère sincèrement que cette collaboration et ce projet perdureront dans le temps. Je vous remercie pour ces années auprès de vous, le partage de votre savoir, votre implication concernant mon futur professionnel, la réponse à mes multiples questions mais aussi les nombreuses conversations que nous avons eues. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés. Je vous remercie d'avoir cru en moi pour être la « porteuse » de ce travail.

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur Philippe Leproux, Maître de Conférences à l'institut d'Xlim. Ton engouement et ton aide précieuse durant toutes ces années m'ont permis d'acquérir des notions d'optique mais aussi de traitement de données. La pluridisciplinarité n'est pas une chose aisée, ce fut difficile avec des moments de doutes mais je savais que je n'étais pas seule. Cela m'a apporté une ouverture d'esprit montrant que la recherche en biologie est conjointement liée au développement physique/optique/traitement de données. Ta passion pour le monde de la recherche m'a permis de ne jamais baisser les bras. Je te remercie pour ton soutien et ces nombreuses conversations durant mon travail. Merci de m'avoir pris sous ton aile, une « biologiste » dans le monde de l'optique, avec ses quelques bases de physiques datant de nombreuses années.

Je remercie également toutes les personnes d'Xlim qui ont travaillé de près ou de loin avec moi

Marc Fabert, tu fus mon premier interlocuteur à Xlim durant mon stage de Master 2. Tu es le premier à m'avoir ouvert les portes d'Xlim et m'avoir parlé de la spectroscopie Raman. Travailler et discuter avec toi fut un réel et agréable plaisir. Ta capacité à expliquer des phénomènes optiques de façon simple m'a permis de comprendre avec une grande facilité les bases, encore merci.

Lova, merci pour tous les alignements du CARS réalisés. Il a souvent fallu que le CARS soit aligné très tôt le matin, mais tu as toujours été disponible pour moi, avec ta bonne humeur et ton sourire.

Julien Brevier et Sylvia Bardet-Coste, merci pour les nombreux tests réalisés avec la microscopie biphotonique.

Pour finir, Erwan Capitaine, même si tu n'es pas présent à cette soutenance de thèse, merci du temps passé avec moi sur la mise au point de la spectroscopie CARS, des traitements de données par MSC ainsi que leurs analyses. A cette époque, tu étais en fin de thèse et je me rends compte à quel point la situation ne devait pas être facile pour toi. Alors, merci de tout ce travail qui m'a permis de réaliser ma thèse.

Je remercie aussi tous mes collègues de travail du laboratoire PEIRENE avec qui ce fut un réel plaisir de travailler.

Julien Chabanais, nous avons commencé ensemble et nous finissons ensemble. Merci d'avoir été présent, de ton aide et des nombreuses pauses, sans lesquelles, nous aurions craqué depuis longtemps. Je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites. Penses à nous durant ton tour du monde !

Marlène Deschuytere, nouvellement venu mais déjà très impliquée dans la vie au laboratoire. Aux vues de ton acharnement au travail, je ne doute pas de ta réussite. Ne lâche rien et bats-toi. Continue de faire vivre le laboratoire (et mes plantes !!!)

Alexis Parenté, tu ouvres la voie des soutenances de cette fin d'année. Je te souhaite le meilleur et tu le mérites amplement. On se voit en janvier, collègue ATER.

Caroline Verger, collègue de bureau, merci pour ces nombreuses discussions, sorties en ville et aide dans mon travail. Je te souhaite le plus grand bonheur dans ta vie professionnelle mais surtout personnelle. Vas au bout de tes rêves.

Nelly Vallat, nouvellement arrivée mais un tel bonheur de travailler avec toi. Ton organisation et ta bonne humeur sont un réel plaisir.

Et pour finir, je remercie Florian Pennarubia, ancien doctorant. Triste que tu ne puisses être présent mais tellement contente pour toi pour ton post-doctorat. Tu es devenu un vrai modèle d'acharnement et de réussite. Encore merci pour ton aide dans mon travail, sans qui, je n'aurais toujours pas créé mon vecteur de surexpression.

Un remerciement chaleureux pour Sebastien ... pour nos discussions sur les manipulations, mes interrogations sur mon futur professionnel et de la vie, tout simplement. Merci d'être si présent pour nous, doctorant.

Je remercie également tous le personnel de PEIRENE, qui a contribué à mon travail, que ce soit par sa gentillesse, ses encouragements ou juste des discussions : Odile Duval, Fabienne Baraige (la déesse d'ImageJ !!), Nathalie Duprat, Emilie Pinault, Lionel Forestier, Karine et tous ceux que j'ai pu oublier.

Mes derniers remerciements vont à ma famille. Chacun de vous avez participé à ma réussite. Merci de m'avoir soutenue durant ces trois années. D'être présent dans les moments de doutes, de tristesse mais aussi de joie et d'euphorie. Ce fut difficile pour moi, mais tout autant pour vous.

Les filles, Manon et Elisa, oui, vous faite partie de ma famille et vous méritez tellement de remerciements. Merci d'être toujours présente pour moi, autant dans les problèmes personnels que professionnels, mais aussi dans les moments de joies. Depuis notre rencontre en L3, nous avons avancé ensemble, chacune dans des directions différentes, mais toujours ensemble avec un soutien mutuel. Merci de votre présence !

Merci également à toutes la famille Aydin, pour votre bonne humeur, votre soutient infailible, depuis le début. Merci pour vos nombreux petits plats, nos soirées thés et nos nombreuses discussions.

Nicolas, mon grand frère, j'y suis arrivée ! Nous y sommes arrivées. Tout est possible du moment que l'on se bat avec vigueur. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Depuis que nous sommes petits, nos combats dans la vie ne se font jamais seul, car on sait très bien que l'autre est juste derrière, un soutien infailible. Merci de m'avoir aidé, soutenue, remonté le moral et poussée toujours plus loin. Cette réussite, je te la dois, sans toi, je n'y serai jamais arrivé.

Lorraine, ma petite sœur, que je t'aime fort. Accroche-toi à tes passions et les difficultés seront moins compliquées. La famille sera toujours présente pour toi, je serai toujours là pour toi. Bats-toi comme une lionne pour arriver à ton but final. Je t'aime fort petite sœur.

Eric, tu as aussi dû me supporter, et « Dieu » sait à quel point c'est difficile. Merci d'avoir toujours été présent et d'être si gentil. Merci pour tes nombreuses conversations philosophiques qui remettent les éléments à leur place et permettent de voir les choses différemment. Nous avons une nouvelle occasion de sortir la gniole de Papi.

Ma petite Maman que dire à part que je te dois tout. Cette réussite, depuis le début, je te la dois. Jamais, je n'aurais pu arriver à ce niveau sans toi. Merci de m'avoir toujours poussée, soutenue, encouragée et surtout d'avoir cru en moi, et ce depuis le début. Tu m'as permis de faire des études et je me suis toujours battue pour ne jamais te décevoir. Tu m'as rendue forte, autonome et déterminée (et certainement très têtue !! C'est les Del Ben ça !!). Tu es et restera toujours mon pilier, l'ancre à laquelle je pourrais toujours me rattacher. Je t'aime tellement fort. Comme on dit chez nous, « tu m'as fait les yeux », j'espère que ce que tu vois au travers des miens te comble de bonheur.

Pour finir, Omer, merci d'avoir vécu ces trois années, comme si de rien n'était. Merci d'avoir réussi à me faire quitter le labo en allant voir l'océan quand le stress était trop présent, de m'avoir fait marcher des heures et des heures pour me faire penser à autre chose et de toujours vouloir me faire rire, alors que je vivais des périodes difficiles. Merci d'avoir essayé de me faire voir les choses du bon côté plutôt que du mauvais. Tu as toujours été là, depuis le début de mes études, que ce soit dans une autre ville durant mon DUT, voir même à l'étranger durant mon stage au Canada. Merci d'être venu à mon secours durant mon « stage » de Master à Lyon. Tu as toujours supporté les contraintes de mon travail et les impacts qu'elles avaient sur moi, et donc sur nous. Merci de m'avoir toujours soutenue et poussée vers l'avant. Merci d'être là. Je t'aime fort.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Résumé.....	31
Abstract.....	33
Publications et communications	35
Avant-propos.....	39
Chapitre I. Exposé bibliographique	45
I. La microscopie.....	45
1. Microscopie en lumière blanche et à contraste de phase	47
2. Microscopie à force atomique.....	47
3. La microscopie de fluorescence	49
4. La microscopie vibrationnelle	51
a. La microscopie d'absorption à infrarouge.....	53
b. La microscopie par diffusion Raman	53
II. La microspectroscopie vibrationnelle Raman	55
1. Processus de diffusion Raman spontané	55
2. Méthodes de traitement.....	59
a. L'analyse en composantes principales ou ACP	61
b. L'analyse de clustering	63
i. Méthode de traitement par clustering k-mean.....	63
ii. Méthode de traitement par HCA.....	67
3. Avantages et inconvénients.....	71
III. La microspectroscopie vibrationnelle Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)	73
1. Processus vibrationnel	73
2. Imagerie cellulaire en mono-bande ou plusieurs bandes (Multiplexage).....	75
3. Le bruit de fond non résonnant.....	77
4. Méthode de traitement	79
IV. Application de la spectroscopie vibrationnelle à biologie cellulaire	81
1. Analyse du contenu cellulaire	81
2. Mise en évidence de processus biologiques.....	87
3. Détection de cellules tumorales.....	91
a. Processus cancéreux.....	91
b. Métabolisme lipidique et cancer.....	95
c. Métabolisme lipidique, microspectroscopie vibrationnelle et cancer.....	97
d. Traitement anti-cancéreux et analyse vibrationnelle	103
V. Le cycle cellulaire	107
1. Les étapes du cycle cellulaire.....	107
a. Interphase.....	107
b. Mitose.....	109
2. La régulation du cycle cellulaire.....	111
3. Le cycle cellulaire et la microspectroscopie vibrationnelle	113
Chapitre II. Projet de thèse	121
Chapitre III. Résultats préliminaires	127
I. Analyse spectrale	127
1. Différentes mesures pour un même organite.....	127

2. Analyse comparative entre deux compartiments cellulaires.....	129
II. Analyse par microspectroscopie CARS.....	131
1. Première cartographie de cellules	131
2. Analyse par microspectroscopie CARS de cellules d'une même lignée cellulaire.....	133
3. Analyse par ACP des cartographies cellulaires	133
III. Matériel et méthode.....	137
1. Culture cellulaire	137
1. MCARS microspectroscopy.....	137
2. Algorithmes pour les traitements	139
Chapitre IV. Publication 1	141
Chapitre V. Publication 2	173
Chapitre VI. Discussion générale	235
Chapitre VII. Perspectives	255
Références bibliographiques	257
Annexes	273

Abréviations

ACAT : Acyl-CoA cholestérol
AcylTransférase

ACP : Analyse en Composantes
Principales

AFM : Atomic Force Microscopy

ATP : Adénosine-TriPhosphate

BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

CARS : Coherent Anti-Stokes Raman
Scattering

CCR : Cancer ColoRectal

CCT : Cellules Circulantes Tumorales

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CDKi : cyclin-dependent kinase inhibitor

COMT : Centre Organisateur des
MicroTubules

CP : Composantes Principales

DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole

DGAT : DiacylGlycerol AcylTransferase

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's
Medium

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FRET : Fluorescence Resonance Energy
Transfer

GFP : Green Fluorescent Protein

HCA : Hierarchical Cluster Analysis

HEK : Human Embryonic Kidney

HER2 : Human Epidermal Growth Factor
Receptor 2

IAM : Indexe d'Activité Mitotique

LPS : LipoPolySaccharide

MCARS : Multiplex Coherent Anti-Stokes
Raman scattering

MEM : Maximum Entropy Method

MSC : Correction multiplicative de signal

ORO : Oil Red O

PFA : ParaFormAldehyde

RE : Réticulum Endoplasmique

RFP : Red Fluorescent Protein

ROS : Reactive Oxygen Species

SRS : Stimulated Raman Scattering

SVF : Sérum de Vœu Fœtal

TrkB : Tyrosin receptor kinase B

Table des illustrations

Figure 1 : Présentation de différentes images obtenues en fonction des types de microscopes utilisés.	48
Figure 2 : Schéma explicatif du processus Raman.	54
Figure 3 : Exemple de spectre Raman de 400-3500 cm ⁻¹ avec l'assignation de certains composés biochimiques.	58
Figure 4 : Identification de cellules de lignées cellulaires issues de cancers colorectaux.	60
Figure 5 : Détection par spectroscopie Raman de cellules hématopoïétiques normales et cancéreuses.	62
Figure 6 : Comparaison de cartographies Raman avec ou sans traitement en composantes principales.	64
Figure 7 : Analyse par clustering <i>k</i> -mean d'une cellule de carcinome de poumon humain (lignée cellulaire A549).	66
Figure 8 : Apport de traitements par HCA après analyse par microspectroscopie Raman d'un érythrocyte infecté par <i>Plasmodium falciparum</i>	68
Figure 9 : Comparaison de cartographies Raman suite à différents traitements	70
Figure 10 : Représentation du processus CARS sous forme de diagramme énergétique.	72
Figure 11 : Mécanisme du multiplexage dans le cas de la microspectroscopie CARS multiplexe (ou large bande) et les avantages/inconvénients associés.	74
Figure 12 : Représentation schématique de la génération du signal CARS.	76
Figure 13 : Comparaison de spectres Raman et CARS.	78
Figure 14 : Évolution du nombre de publications entre 1949 et 2019 avec les mots clefs « Raman » et « cells » sur PubMed.	80
Figure 15 : Analyse par la microspectroscopie CARS de cellule 3T3-L1 différenciée en cellule adipeuse.	80
Figure 16 : Analyse de fibroblastes pulmonaires par la microspectroscopie Raman suivie d'un traitement par clustering.	82
Figure 17 : Analyse par microspectroscopie Raman de cellule HeLa.	84
Figure 18 : Analyse par la microspectroscopie Raman de trois lignées cellulaires : NIH3T3 (fibroblastes de souris), EPH4 (cellules épithéliales mammaires) et Hepa1-6 (cellules hépatocytaires).	84
Figure 19 : Détection de l'insuline et du glucagon dans des cellules de Langerhans par microspectroscopie Raman.	86
Figure 20 : Observation de la différenciation de trois lignées cellulaires.	86
Figure 21 : Mise en évidence de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses.	88

Figure 22 : Etude de la différenciation myogénique par la microspectroscopie Raman.	88
Figure 23 : Analyse de fibroblastes pulmonaires par la microspectroscopie Raman.	90
Figure 24 : Mise en évidence de l'apoptose suite à un traitement avec du plasma activé par la microspectroscopie CARS multiplexe.	90
Figure 25 : Observation de l'activation des cellules de la microglie suite à un traitement avec des lipopolysaccharides (LPS) par la microspectroscopie CARS.	92
Figure 26 : Les différentes étapes d'évolution d'un cancer.	92
Figure 27 : Liste non exhaustive des caractéristiques pouvant acquérir les cellules cancéreuses au cours du processus tumoral. D'après Hanahan and Weinberg, 2011.	94
Figure 28 : Étapes de la biogenèse d'une gouttelette lipidique.	94
Figure 29 : Composition d'une gouttelette lipidique.	96
Figure 30 : Évaluation de la quantité de gouttelettes lipidiques dans des cellules cancéreuses colorectales par la microspectroscopie Raman.	96
Figure 31 : Analyse des différents grades du cancer du sein par la microspectroscopie Raman.	98
Figure 32 : Analyse par microspectroscopie Raman de sept lignées cellulaires représentant les différents grades du cancer du sein.	98
Figure 33 : Processus de génération de métastases par l'intermédiaire des cellules circulantes tumorales (CCT). D'après Wu et al., 2017.	100
Figure 34 : Analyse du contenu lipidique de CCT et leucocytes sains (extrait de sang de patient atteint d'un cancer de la prostate).	100
Figure 35 : Relation entre le nombre de CCT, leur contenu lipidique et le régime alimentaire.	102
Figure 36 : Influence d'un traitement anticancéreux sur des cellules de cancer du poumon humain (lignée Calu-1).	102
Figure 37 : Localisation de l'erlotinib dans des cellules cancéreuses colorectales par microspectroscopie Raman.	104
Figure 38 : Influence du traitement à l'erlotinib sur des cellules cancéreuses colorectales.	104
Figure 39 : Influence de traitement aux polyphénols sur des cellules de tumeurs mammaires.	106
Figure 40 : Avancement d'une cellule dans le cycle cellulaire.	106
Figure 41 : Représentation de l'organisation des chromosomes	108
Figure 42 : Cycle cellulaire présentant les 4 phases (phase G1, phase S, phase G2 et la mitose) ainsi que les 4 points de contrôles majeurs (en gris). D'après Harper and Brooks, 2004.	110
Figure 43 : Traitements applicables pour bloquer les cellules en divers points du cycle cellulaire. D'après Jackman and O'Connor, 1998.	112

Figure 44 : Étude des différentes sous phases de la mitose par microspectroscopie Raman.	114
Figure 45 : Modification de la localisation de différents composés biochimiques en fonction du cycle cellulaire observée par la microspectroscopie CARS.	116
Figure 46 : Identification d'un nouveau décalage Raman correspondant à l'ADN dans la zone CH.	116
Figure 47 : Analyse du cycle cellulaire par la microspectroscopie CARS multiplexe.	118
Figure 48 : Représentation du super enroulement de l'ADN jusqu'à la formation de chromosome métaphasique.	118
Figure 49 : Analyse en 5 points différents du noyau d'une cellule HEK.	126
Figure 50 : Analyse par spectroscopie CARS en différents points du noyau d'une cellule HEK.	128
Figure 51 : Comparaison des spectres CARS de noyaux de cellules HEK.	130
Figure 52 : Analyse en composantes principales des spectres associés au noyau et au cytoplasme des cellules HEK.	132
Figure 53 : Analyse par microspectroscopie CARS de cellule HEK.	134
Figure 54 : Analyse par microspectroscopie CARS suivie de traitement MSC de cellules HEK.	134
Figure 55 : Représentation des cellules après analyse en composantes principales des cartographies CARS des cellules HEK.	136

Table des tableaux

Tableau 1 : : Évolution des sources de lumière des microscopes. D'après Bruch et al., 2015.	46
Tableau 2 : Tableau d'assignation de différents décalages Raman de divers composants biochimiques associés à des organites cellulaires. D'après Krafft et al., 2006.	82

Résumé

Parmi les technologies d'analyses d'échantillons biologiques sans marquage préalable, la microspectroscopie vibrationnelle est en plein essor. Grâce à la vibration des liaisons entre atomes, elle permet de localiser dans la cellule des biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides) associées à des organites. Mon étude a consisté à utiliser la microspectroscopie CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) pour l'analyse de cellules dans la zone CH du spectre Raman, zone fortement résolue ($< 1 \text{ cm}^{-1}$) et restreinte ($2500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$). Les vibrations correspondant aux liaisons CH_2 et CH_3 sont majoritairement associées respectivement aux lipides et aux protéines. À partir de cultures synchrones, j'ai pu mettre en évidence des différences permettant de distinguer des cellules en interphase de cellules en mitose, et pour cette dernière phase ses cinq sous-phases grâce à l'évolution de l'hétérochromatine voire celle du réticulum endoplasmique. J'ai également suivi dans des cellules en interphase les changements du métabolisme lipidique dûs à l'activation du récepteur TrkB, souvent présent dans les cellules tumorales. Après avoir créé des clones de cellules HEK exprimant TrkB, j'ai observé l'apparition de gouttelettes lipidiques dans les cellules suite à son activation. Ce même type de gouttelettes est présent dans trois lignées cellulaires de trois stades du cancer colorectal, et j'ai établi un lien direct entre l'activation de TrkB et la présence de gouttelettes lipidiques. Ainsi, la microspectroscopie CARS permet par analyse dans la zone CH de suivre la biogenèse des gouttelettes lipidiques. Cette méthode d'analyse pourrait être exploitée pour la recherche sans marquage préalable de cellules cancéreuses dans un tissu, faisant de la microspectroscopie CARS un outil de diagnostic

Mots clés : Microspectroscopie CARS, interphase, mitose, hétérochromatine, récepteur TrkB, gouttelettes lipidiques, cancer

Abstract

Vibrational microspectroscopy is a rapidly emerging label-free technique that allows the probing of live cell. Thanks to the vibration of the chemical bonds, it makes it possible to locate in the cell biomolecules (proteins, nucleic acids, lipids) associated with organelles. My study consisted in using Coherent Anti-Storage Raman Spectroscopy (CARS) microspectroscopy in the CH zone of the Raman spectrum, a highly resolved ($<1\text{ cm}^{-1}$) and restricted interval ($2500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$). Vibrations corresponding to the CH_2 and CH_3 chemical groups are mainly associated with lipids and proteins, respectively. Using synchronous cultures, I have been able to highlight differences between cells in interphase and cells in mitosis and, more interestingly, the five sub-phases of mitosis, thanks to the evolutions of heterochromatin and endoplasmic reticulum as well. I also tracked, in cells in interphase, the changes in lipid metabolism following activation of the TrkB receptor, often expressed in tumor cells. Specific lipid droplets showed up in HEK cell expressing TrkB activated. This same type of droplets has been observed in three cell lines derived from three stages of colorectal cancer. I have established a direct link between TrkB activation and the presence of these lipid droplets. Thus, CARS microspectroscopy makes it possible to follow the biogenesis of lipid droplets by analysis in the CH zone. This method could be exploited to find out, without prior labeling, cancer cells in a tissue, making CARS microspectroscopy a useful diagnostic tool.

Keywords: CARS microspectroscopy, interphase, mitosis, heterochromatin, TrkB receptor, lipid droplets, cancer

Publications

- Detection of lipid droplets by MCARS microspectroscopy in cancer cell expressing TrkB
 - **Tiffany Guerenne-Del Ben**, Vincent Couderc, Ludovic Duponchel, Vincent Sol, Philippe Leproux, and Jean-Michel Petit. « en préparation pour soumission à PNAS » (Impact factor en 2018 : 9,58)
- Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region
 - **Tiffany Guerenne-Del Ben**, Zakaniaina Rajaofara, Vincent Couderc, Vincent Sol, Hideaki Kano, Philippe Leproux and Jean-Michel Petit (2019) **Sci Rep. 9**, 13862. (Impact factor en 2018 : 4,525)
- Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time
 - Hideaki Kano, Takumi Maruyama, Junko Kano, Yuki Oka, Daiki Kaneta, **Tiffany Guerenne**, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and Masayuki Noguchi (2019) **OSA Continuum 2**, 1693-1705. (Présentée en annexe)

Communications

Communications orales internationale :

- Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering highlights chromatin condensation at high wavenumber
 - **Tiffany Guerenne-Del Ben**, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Vincent Sol, Jean-Michel Petit. **Focus On Microscopy** (FOM) incorporate the 32nd International Conference on 3D Image Processing in Microscopy and 31st International Conference on Confocal Microscopy, London, April 14-17, 2019.

Communications orales nationales :

- Detection of lipid droplets by MCARS microspectroscopy in cells expressing TrkB.
 - **Tiffany Guerenne-Del Ben**, Vincent Couderc, Ludovic Duponchel, Vincent Sol, Philippe Leproux and Jean-Michel Petit. **15^{èmes} Journées Cancéropôle Grand Sud-Ouest**, Arcachon, Novembre 20-22, 2019.
- Mise en évidence de la condensation de la chromatine par la microspectroscopie CARS multiplexe dans la région de haut nombre d'onde
 - **Tiffany Guerenne-Del Ben**, Philippe Leproux, Vincent Couderc, Vincent Sol, Jean-Michel Petit. **Sixième colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l'Environnement et l'Electronique (PLUMEE)**, Limoges, 10-12 Avril 2019.
- LE CARS : VERS LE DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES APPROCHES DE DIAGNOSTIC DES CANCERS
 - **Tiffany Guerenne**, Jean-Michel Petit & Vincent Sol. **Séminaire thématique de l'école Doctorale Bio-Santé 524**, Cussac, 7-9 mars 2018.

Communications nationales par affiche:

- Detection of lipid droplets by MCARS microspectroscopy in cells expressing TrkB
 - **Tiffany Guerenne-Del Ben**, Vincent Couderc, Ludovic Duponchel, Vincent Sol, Philippe Leproux and Jean-Michel Petit. **15^{èmes} Journées Cancéropôle Grand Sud-Ouest**, Arcachon, Novembre 20-22, 2019.
- La micro-spectroscopie Raman : vers le développement de nouvelles approches de diagnostic des cancers à partir de molécules ou nano-objets fonctionnalisés
 - **Tiffany Guerenne**, Jean-Michel Petit & Vincent Sol. **Séminaire thématique de l'école Doctorale Bio-Santé 524**, Pouligny Notre-Dame, 9-10 mars 2017.

Avant-propos

Mon projet de thèse résulte d'une collaboration entre deux laboratoires : le laboratoire PEIRENE (EA 7500), équipe « Glycosylation et différenciation cellulaire » et l'institut Xlim, équipe biophotonique (UMR-CNRS 7252). Cette collaboration initiée au cours de mon stage de Master 2 a permis d'élaborer le sujet de ce travail de doctorat. L'équipe biophotonique fait partie du pôle photonique fibre et sources cohérentes. Ses principaux travaux sont axés sur l'optique cohérente, non linéaire, les lasers, les fibres optiques et l'imagerie avancée. Ils ont pour objectif de développer de nouveaux outils adaptés à des modèles (cellulaires et tissulaires). La première application développée à Xlim concerne la détection par microspectroscopie CARS d'ostéoblastes, d'ostéoclastes et de collagène dans un tissu inerte, l'os (Capitaine *et al.*, 2018). Cependant, il était primordial de pouvoir analyser des échantillons biologiques vivants, permettant d'adapter cette nouvelle technologie pour en faire un système de diagnostic robuste et performant. Pour ce faire, l'équipe d'Xlim a souhaité établir une collaboration étroite avec des biologistes afin d'avoir accès à des échantillons variés, un savoir-faire et leurs compétences en biologie cellulaire pour les interprétations vibrationnelles. Le laboratoire PEIRENE, qui est mon laboratoire d'accueil, est une structure de recherche pluridisciplinaire regroupant les compétences associées aux domaines de la chimie (organique et des substances naturelles), de la biologie (animale et végétale) et de l'environnement (eau et sol).

Notre équipe a ouvert son champ disciplinaire au domaine du diagnostic cancéreux. Ainsi, la collaboration entre le laboratoire PEIRENE et l'équipe biophotonique d'Xlim fut des plus logiques. C'est grâce à cette collaboration naissante que mon sujet de Master 2 ainsi que mon sujet de thèse ont été développés, suite à la mise en place à Xlim de la microspectroscopie CARS par Erwan Capitaine.

Durant la première moitié de ma thèse, j'ai pris en main l'instrumentation CARS, outil de recherche au travers de la mise au point de différentes acquisitions aussi bien en mode spectroscopie qu'en microspectroscopie mais également en essayant d'optimiser les paramétrages, de comprendre et d'utiliser en autonomie des algorithmes de traitements. En parallèle de cet axe de recherche à l'interface de la physique et des mathématiques, j'ai réalisé des manipulations de biologie moléculaire et cellulaire au sein de l'équipe « Glycosylation et différenciation cellulaire » afin de créer à partir de cellules HEK des clones exprimant le récepteur TrkB, connu pour être surexprimé entre autres dans le cancer colorectal. Pour cela, j'ai intégré sa séquence codante dans un vecteur pour transfecter de manière stable les cellules HEK. J'ai par la suite caractérisé les clones obtenus.

Au cours de la deuxième moitié de ma thèse, j'ai considéré que la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire générait des fluctuations de signaux. Aussi, j'ai choisi de m'orienter vers la « microspectroscopie » ce qui a nécessité une adaptation de l'appareil, la détermination des nouveaux paramétrages optimaux d'analyse des cellules, le choix des décalages Raman les plus résolus et intéressants d'un point de vue biologique, avant de pouvoir réaliser des analyses comparatives de cellules en interphase et dans diverses phases de la mitose. Je me suis ensuite attachée à réaliser une étude fine des différentes phases de la mitose. Elle s'est concrétisée par une première publication d'application de la microspectroscopie CARS qui permet d'identifier, sans ambiguïté, des cellules en interphase ou en mitose (Scientific Reports, 2019). Ainsi, j'ai pu par la suite comparer les signaux obtenus avec des cellules HEK exprimant le récepteur TrkB, et les cellules HEK « sauvages ». J'ai constaté que l'expression et l'activation du récepteur par son ligand le BDNF pouvait induire une activation du métabolisme lipidique conduisant à la formation de gouttelettes lipidiques observables par microspectroscopie CARS. La même observation a été réalisée avec des lignées cellulaires représentant trois stades différents du cancer colorectal.

L'ensemble de ces résultats ont permis de mettre en évidence un processus biologique en lien avec la transformation cancéreuse : le rôle d'activateur du métabolisme lipidique par le récepteur TrkB surexprimé et activé. Ces travaux font l'objet d'un article qui va être soumis à Proc.Nat. Acad. Sci. USA.

Cette collaboration de plus de trois ans n'aurait jamais réussie sans l'investissement du Pr. Jean-Michel Petit (EA 7500, équipe Glycosylation et Différenciation Cellulaire), et du Dr. Philippe Leproux, (Xlim, équipe biophotonique) me permettant d'acquérir des connaissances transversales et un savoir-faire en biologie, en optique et en traitement de données.

I. La microscopie

La microscopie regroupe un ensemble de technologies qui permet l'observation d'éléments très petits, allant du tissu aux macromolécules en passant par les cellules voire les organelles. La microscopie optique utilise la lumière visible pour visualiser différents éléments dans une préparation. Le premier microscope a été réalisé par Hens et Zacharias Hansen en 1590. Il se composait de deux lentilles placées dans un tube pour obtenir un grossissement de seulement trois à quatre. Ce n'est qu'en 1673, grâce à Antoni van Leeuwenhoek, personnage emblématique dans le monde de la microscopie, que la première observation d'organismes vivants microscopiques a été effectuée. A partir de cette date, et après de nombreuses évolutions jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle ou est apparu le concept de la microscopie moderne grâce aux travaux de 4 grandes figures de la microscopie : Carl Zeiss, Ernst Abbe, August Kohler et Otto Schott. A cette époque, l'aspect ondulatoire de la lumière est mis en évidence et est assimilé à une onde électromagnétique possédant des longueurs d'ondes entre 300 et 700 nm (Bruch *et al.*, 2015).

Ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que l'optique est considérée comme un aspect calculatoire qui va ouvrir le champ à la microscopie à contraste de phase. Mais la plus grande découverte fut réalisée par Einstein, dans les années 1900, mettant en avant que le rayonnement lumineux, en plus d'être ondulatoire, est corpusculaire. Ainsi, il est considéré comme une « vraie » particule et participe donc à la physique quantique. Il peut interagir avec la matière et générer des photons, laissant place à la microscopie de fluorescence (Roussel, 2006). La suite des avancées de la microscopie n'a pu être possible qu'avec l'invention du rayon laser par Townes entre 1950 et 1960, permettant la découverte de la microscopie confocale à balayage et la microscopie non linéaire. Cette dernière est principalement connue à travers la microscopie biphotonique (conçue la première fois en 1920 par Maria Goeppert-Mayer) et la génération du second harmonique (Bruch *et al.*, 2015).

Tableau 1 : : Évolution des sources de lumière des microscopes. D'après Bruch et al., 2015.

Siècle/Date	Type de source	Type de lumière	Technique
17 ^e – 18 ^e	Lumière du jour (miroir), bougie ou lampe à huile	Lumière blanche (incohérente)	Microscopie de Leeuwenhoek et Hooke
Fin 19 ^e (> 1880)	Lampe à incandescence	Lumière blanche (incohérente)	Microscope mono ou binoculaire
Début 20 ^e (> 1904)	Lampe à décharge	Lumière ultra-violette (incohérente)	Microscope à fluorescence
Milieu 20 ^e (> 1959)	Lampe à halogène	Lumière blanche (incohérente)	Microscope binoculaire
Fin 20 ^e (1986)	Laser à gaz	Lumière monochromatique (cohérente)	Confocal
Fin 20 ^e (1994)	Laser pulsés Pico-secondes (ps) dont un ajustable (faisceau STED)	Double faisceau d'excitation et de déplétion avec décalage temporel de 150 ps	STED
Fin 20 ^e - début 21 ^e	Laser pulsé Femto-seconde (saphir titane)	Formation d'un exciton (biphotonique) ou création d'harmonique (SHG)	Non-linéaire/Biphotonique/SHG

On constate clairement que les avancées de la microscopie sont en lien étroit avec celles de l'optique (**tableau 1**).

Aujourd'hui, sous ses diverses facettes, la microscopie est devenue un outil adapté à l'observation de tous types d'échantillons.

1. Microscopie en lumière blanche et à contraste de phase

La microscopie la plus classiquement utilisée est la microscopie en lumière blanche et la microscopie à contraste de phase. Elles ont pour avantage leur simplicité d'utilisation et une visualisation de l'échantillon sans l'endommager. Mais elles n'apportent que très peu d'informations sur l'échantillon observé (Parekh *et al.*, 2010) (**figure 1A-B**).

2. Microscopie à force atomique

Une nouvelle méthode de microscopie est apparue, à la suite de ce besoin d'obtenir des informations plus précises concernant l'échantillon observé. Découverte par Binnig, Quate et Gerber en 1986, la microscopie à force atomique (AFM) permet de visualiser des macromolécules avec une très grande résolution. Son principe reste simple, une pointe (généralement en nitrure de silicium) est placée à une distance infime de l'échantillon. Une analyse en balayage est réalisée permettant à la pointe de suivre les reliefs de l'échantillon et de générer une cartographie. Ce type de microscopie fut d'abord utilisé sur des échantillons cristallins (sous vide ou dans l'air) puis adapté à des échantillons biologiques en milieu liquide (Giocondi *et al.*, 2003; Kasas, 1992). Par exemple, une cartographie en microscopie de force atomique a été effectuée sur un ostéoblaste vivant permettant de mettre en évidence les fibres du cytosquelette au travers de la membrane plasmique (Horton *et al.*, 2000) (**figure 1C**).

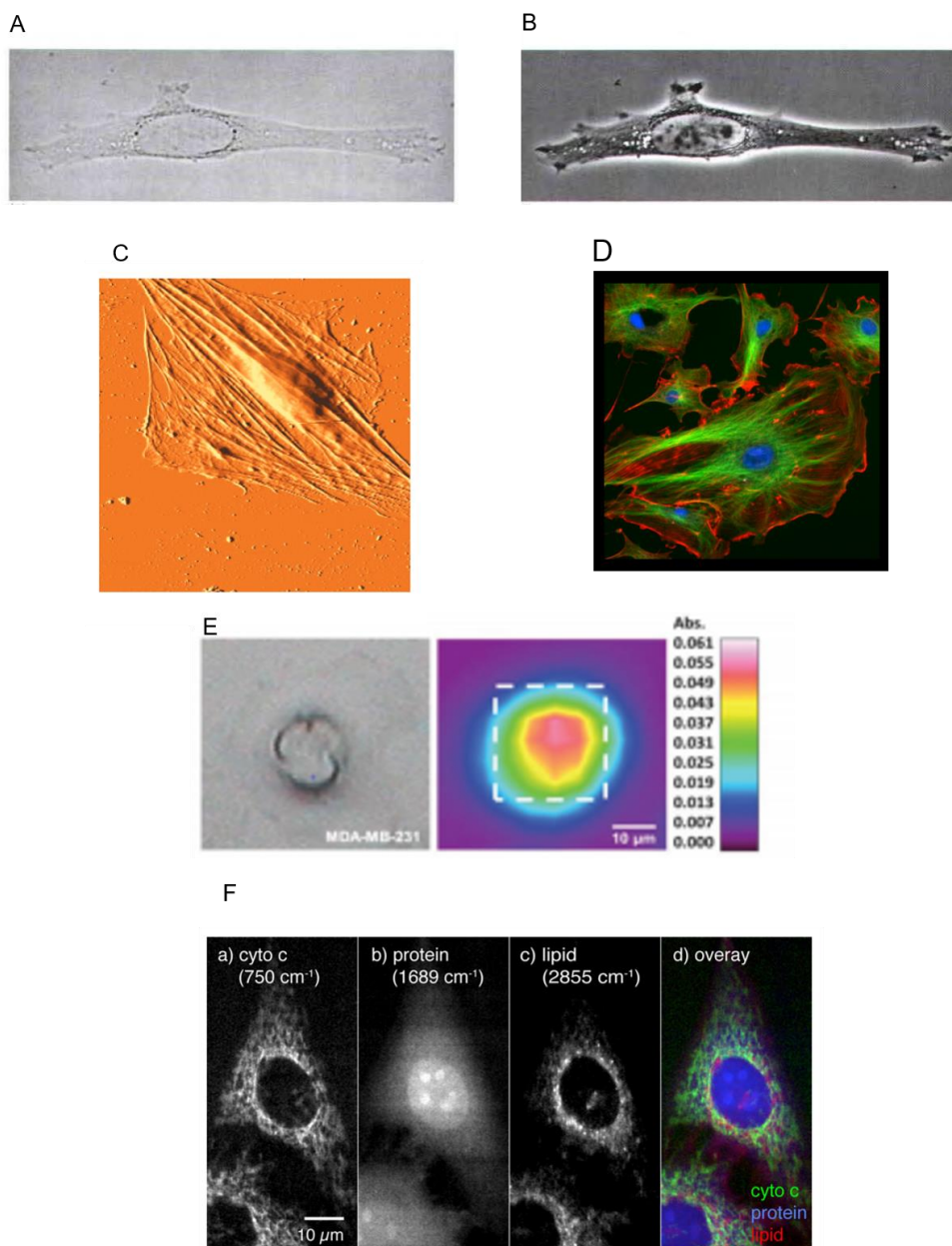


Figure 1 : Présentation de différentes images obtenues en fonction des types de microscopes utilisés.

(A) Cellule HeLa observée en microscopie en lumière blanche et (B) microscopie à contraste de phase, (C) Cellule d'ostéoblaste vivante observée par un microscope de force atomique (D) Cellules endothéliales bovines dont le noyau est coloré au DAPI (bleu), les microtubules marqués par un anticorps spécifiques couplé à un fluorochrome (vert) et les filaments d'actines marqués par la phalloïdine liée à un fluorochrome (rouge), (E) Cellule de cancer du sein (MDA-MB-231) observée par microscopie à infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) sur la plage de 800-1800 cm^{-1} , (F) Cellules HeLa observées par microspectroscopie Raman pour 3 décalages Raman : Cytochrome c (750 cm^{-1}), protéines (1689 cm^{-1}) et lipides (2855 cm^{-1}) ainsi que la superposition des trois canaux. D'après Wilson and Hunt, 2008; Horton *et al.*, 2000; Fujita, 2016; Mohamed *et al.*, 2018

Toutefois, même si la microscopie à force atomique permet de visualiser le relief d'une cellule, elle ne peut donner des informations sur des composés biochimiques précis comme par exemple la présence d'une protéine cytoplasmique voire l'activation d'un récepteur transmembranaire. Ainsi, un nouveau mode de microscopie est apparu, permettant de cibler des éléments particuliers dans la cellule par l'utilisation de marqueurs spécifiques. Par exemple, l'utilisation de colorants spécifiques rend possible l'observation du noyau (DAPI pour des cellules fixées ou Hoechst 33342 pour des cellules vivantes) ou des chromosomes de cellules en mitose (technique FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization).

3. La microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence utilise les propriétés des molécules fluorescentes intrinsèques ou extrinsèques à la cellule pour visualiser des compartiments et/ou des constituants cellulaires voire des processus cellulaires. Elle s'applique aux cellules fixées et vivantes tout comme aux tissus (Gomes da Costa *et al.*, 2019; Schie and Huser, 2013). Les fluorochromes peuvent être excités par une excitation monophotonique ou multiphotonique. Pour cette dernière catégorie, l'excitation à deux photons est la plus répandue. Elle va utiliser l'énergie de deux photons pour exciter les fluorochromes (So, 2002). Ce type de microscopie a trouvé de nombreuses applications et développements comme le transfert de fluorescence ou FRET qui permet d'estimer l'interaction possible entre deux biomolécules dans un espace restreint (1 à 10 nm) (De Los Santos *et al.*, 2015). Par exemple, cette technique permet de mettre en évidence l'interaction entre des protéines au sein d'une membrane plasmique. Mais la plus employée reste la microscopie confocale utilisée après marquage pour une localisation dans l'espace (3D) des constituants cellulaires voire moléculaires. Elle constitue une très bonne alternative à l'utilisation d'éléments radiomarqués (^{14}C , ^{32}P , etc.). Actuellement, c'est la technique la plus employée pour observer des cellules ou des tissus par immunomarquage ou par immunohistochimie (**figure 1D**).

Cependant, elle possède plusieurs désavantages, dont deux majeurs : le photo-blanchiment et le marquage cellulaire. Le premier correspond à l'extinction de la fluorescence du fluorochrome lorsqu'il est excité de manière trop intense ou prolongée, menant à une absence totale de fluorescence. Le second est provoqué par la fixation de l'élément de reconnaissance portant le fluorochrome au constituant cellulaire. Dans ce dernier cas, il s'agit en général de biomolécules, le plus souvent des protéines, et/ou des nanoparticules qui vont se lier de manière spécifique à la molécule étudiée. Cette technique nécessite pour les marquages intracellulaires une perméabilisation des cellules qui peut induire des perturbations cellulaires (Diem, 2009). Il en est de même pour les cellules vivantes avec la génération de radicaux libres cytotoxiques (ROS) par les fluorochromes (Parekh *et al.*, 2010). Ainsi, les recherches se sont orientées vers la mise au point de nouvelles techniques qui ne nécessiteraient pas de marquage préalable de l'échantillon à observer.

4. La microscopie vibrationnelle

Parmi ces nouvelles technologies, la microscopie vibrationnelle semble être un bon candidat pour l'analyse d'échantillons biologiques. Elle permet d'identifier les différents constituants cellulaires sans marquage préalable. Pour cela, une onde lumineuse est dirigée vers l'échantillon provoquant l'excitation des liaisons entre les atomes des différentes molécules constituant celui-ci. Cette excitation correspond à la vibration des différentes liaisons interatomiques composant l'échantillon (Matthäus *et al.*, 2006).

Au sein de la microscopie vibrationnelle, les deux techniques les plus connues et utilisées dans le cas d'analyses cellulaires sont : la microspectroscopie infrarouge et la microspectroscopie Raman.

a. La microscopie d'absorption à infrarouge

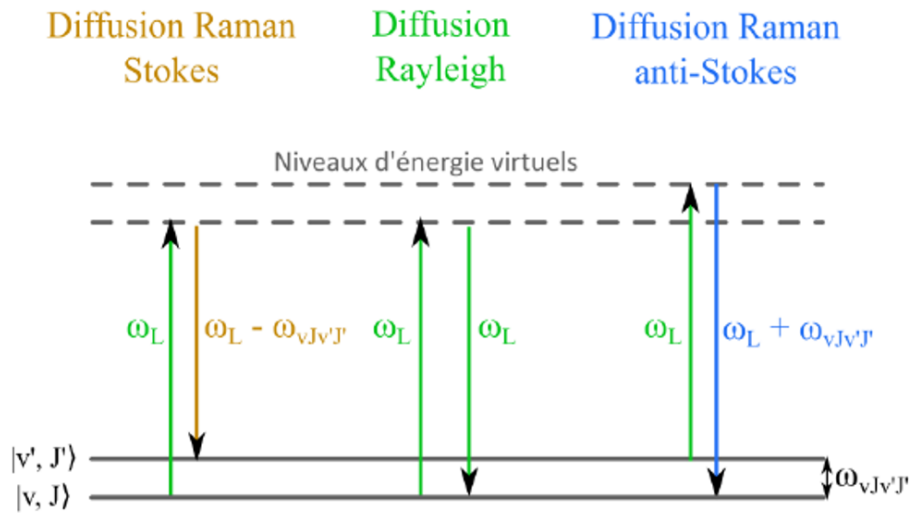
Comme l'indique son nom, cette technologie vibrationnelle utilise des photons provenant du domaine spectral de l'infrarouge (proche infrarouge, infrarouge moyen et lointain) pour l'excitation des liaisons chimiques de l'échantillon. Cette technologie permet de visualiser différentes liaisons atomiques correspondant à différents groupes biologiques tels que les lipides (par l'intermédiaire des liaisons CH_2), les protéines (par l'intermédiaire des liaisons CH_3), l'ADN (par l'intermédiaire des liaisons phosphates), etc. Néanmoins, l'utilisation de photons dans l'infrarouge provoque quelques inconvénients. D'une part, les liaisons polaires contenues dans un échantillon peuvent absorber fortement. Ainsi, des échantillons contenant une forte quantité d'eau et/ou utilisés sur des supports en verre sont difficilement analysables par cette technologie. D'autre part, la longueur d'onde associée à l'infrarouge étant relativement grande, elle confère à cette technologie une résolution spatiale assez faible ($10\ \mu\text{m}$) (Servant *et al.*, 2011; Zumbusch *et al.*, 2013) (**figure 1E**).

Tout en conservant les mêmes propriétés que la microscopie infrarouge (principalement absence de marquage et mise en évidence des liaisons chimiques) sans ses inconvénients, la microscopie Raman a pris son essor.

b. La microscopie par diffusion Raman

La microscopie Raman utilise le domaine spectral associé au visible, voir au proche infrarouge, pour exciter les molécules de l'échantillon. L'utilisation de la plage spectrale associée au visible permet une résolution spatiale plus importante ($1\ \mu\text{m}$) qu'avec l'infrarouge ($10\ \mu\text{m}$). De plus, l'absorption de l'eau est faible ainsi la plupart des échantillons biologiques peuvent être étudiés et analysés sur des supports de type lame de verre sans risque de masquer le signal (Matthäus *et al.*, 2006; Zumbusch *et al.*, 2013) (**figure 1F**).

A



B

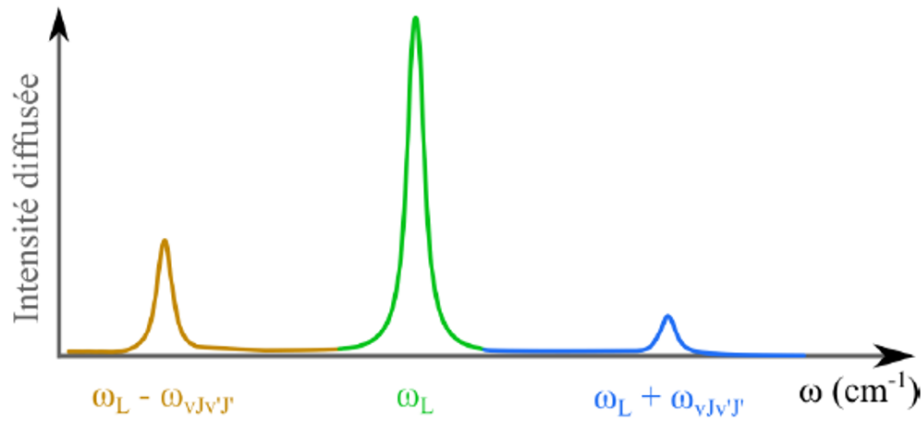


Figure 2 : Schéma explicatif du processus Raman.

Représentation (A) du processus Raman spontané et (B) de l'intensité diffusée pour les contributions de diffusion inélastique Stokes, anti-Stokes et Rayleigh. D'après Nafa, 2017.

La suite du manuscrit développera seulement les technologies de microscopie (plus spécifiquement la microspectroscopie) vibrationnelle Raman et de son dérivé la microscopie CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) et des applications qui en découlent en biologie.

II. La microspectroscopie vibrationnelle Raman

1. Processus de diffusion Raman spontané

Le phénomène de diffusion inélastique fut proposé la première fois par Smekal en 1923, mais cette technique a été utilisée expérimentalement seulement en 1928, et récompensée par le prix Nobel de C. V. Raman en 1930, qui lui donna son nom. La première utilisation du spectromètre Raman en 1973 a concerné des cristaux de nitrate de potassium (Delhay et al., 1975), et le premier spectre d'une cellule a été obtenu en 1990 (Ghita *et al.*, 2015).

Le principe de la spectroscopie Raman est représenté dans la figure 2A sous la forme d'un diagramme énergétique. Un échantillon est soumis à une lumière monochromatique, les photons vont interagir avec les liaisons chimiques entre les atomes composant l'échantillon. Trois types de photons sont diffusés selon le type d'interaction mis en jeu (Kim *et al.*, 2017; Schie and Huser, 2013; Wang *et al.*, 2016) (**Figure 2**):

- Diffusion élastique : les photons diffusés ont la même énergie que les photons incidents, c'est la diffusion Rayleigh qui correspond à une différence d'énergie nulle entre les photons ;
- Diffusion inélastique : les photons diffusés ont un changement d'énergie comparée aux photons incidents. Il existe donc deux types de diffusion inélastique :

- Diffusion inélastique Stokes : il y a un transfert d'énergie entre les photons et la matière, faisant passer les photons diffusés à une fréquence inférieure au photon initial, provoquant un décalage dans le rouge des raies résultantes. Ainsi, les photons diffusés passent d'un état initial fort en énergie à un état final énergétique plus faible. Cette différence d'énergie induit des raies Stokes de fréquence positive ;
- Diffusion inélastique anti-Stokes : à l'inverse, le photon diffusé gagne de l'énergie au contact de la matière, faisant passer les photons diffusés à une fréquence supérieure au photon initial, provoquant un décalage dans le bleu des raies résultantes. La différence d'énergie entre les deux photons est supérieure à celle du photon incident ce qui génère des raies anti-Stokes de fréquence négative.

Ce sont ces différences d'énergie qui correspondent à l'état vibrationnel de la molécule étudiée. Pour un échantillon complexe, nous obtiendrons donc un spectre Raman qui contient autant de raies vibrationnelles que de types différents de liaisons chimiques entre atomes. Il est spécifique à chaque molécule étudiée et s'exprime en cm^{-1} (l'inverse des longueurs d'onde). Dans le cas des analyses Raman d'échantillons biologiques qui ont de faibles signaux, seules les raies Stokes sont utilisées (Kim *et al.*, 2017; Schie and Huser, 2013). Ainsi, le spectre Raman d'un échantillon biologique est composé de plusieurs raies Stokes correspondant à la vibration des liaisons entre les atomes qui constituent les molécules de l'échantillon. Grâce à la spectroscopie vibrationnelle Raman, il s'avère possible de caractériser certaines liaisons moléculaires qui composent l'échantillon et donc d'en identifier la composition (Schie and Huser, 2013).

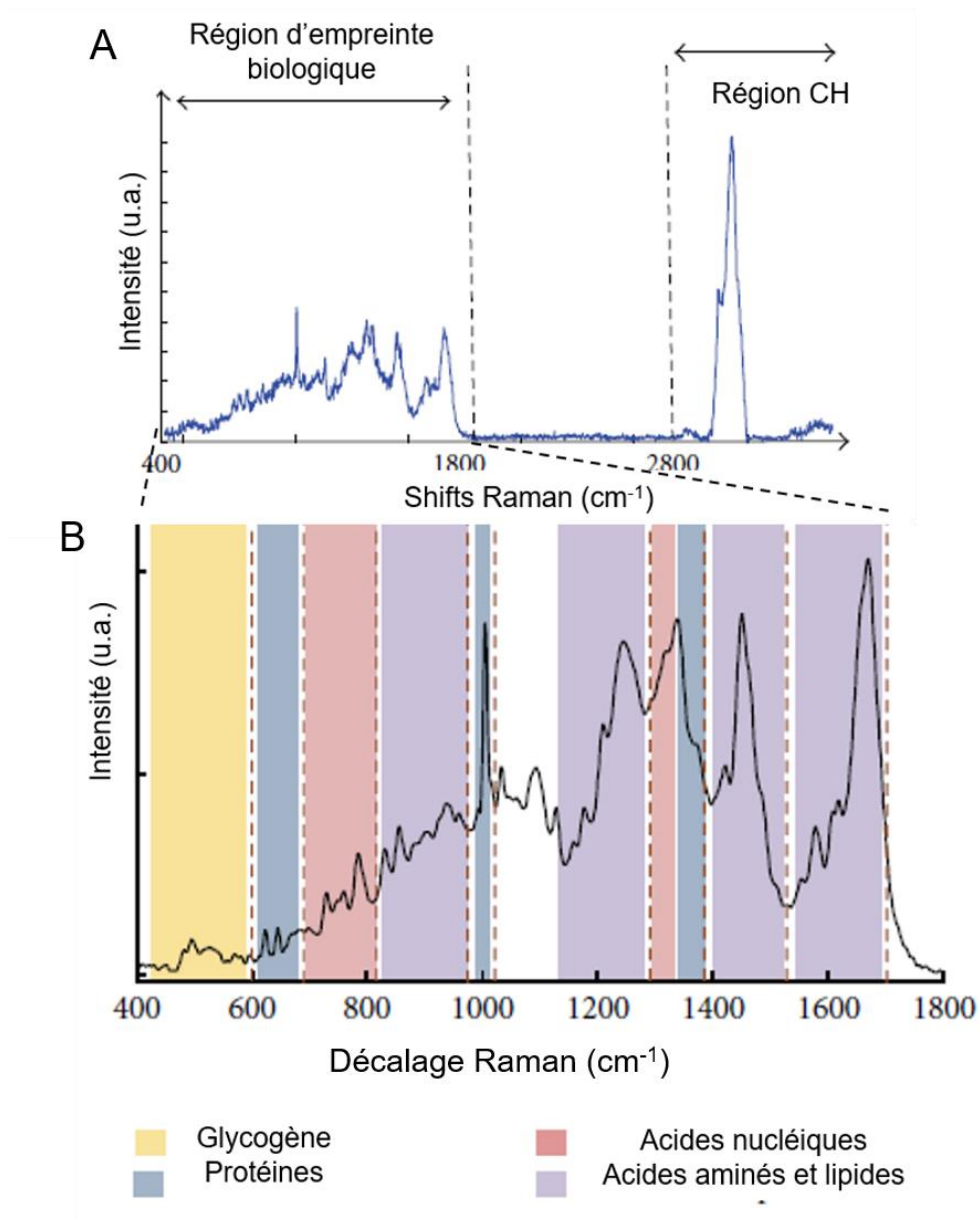


Figure 3 : Exemple de spectre Raman de 400-3500 cm^{-1} avec l'assignation de certains composés biochimiques.

(A) spectre total Raman d'une cellule de cancer de l'utérus (CaSki) dans la zone d'empreinte biologique (400-1800 cm^{-1}), la zone blanche (1800-2800 cm^{-1}) et la zone CH (2800-3500 cm^{-1}). (B) Assignation de composés biochimiques dans la zone d'empreinte biologique du spectre Raman avec le glycogène (jaune), les protéines (bleu), les acides nucléiques (rose) et les acides aminés/lipides (violet). D'après Ramos *et al.*, 2015.

Le spectre Raman comporte trois zones en fonction des éléments étudiés (Ramos *et al.*, 2015) (figure 3).

- Une région dite de faible nombre d'onde, ou région d'empreinte biologique, comprise entre 400 et 1800 cm^{-1} . Elle est composée des raies Stokes correspondant à la vibration de toutes les liaisons associées aux molécules du vivant (protéines, lipides, acides nucléiques, ...) ;
- Une zone dite blanche où aucune liaison des molécules biologiques vibrent. Elle est comprise entre 2000 à 2500 cm^{-1} . Dans cette zone uniquement les liaisons chimiques absentes du vivant peuvent vibrer, comme les alcynes terminaux, etc. ;
- Une région dite de hauts nombres d'onde, ou région CH, comprise entre 2500 et 3500 cm^{-1} . Seules les liaisons carbone-hydrogène y sont mises en évidence (CH, CH₂, CH₃) ainsi que les différentes liaisons de l'eau (H₂O) ;

Grâce à la génération d'un spectre complet par microspectroscopie Raman et aux spécificités vibrationnelles de molécules d'intérêt (lipides, protéines, ADN, etc.) il est possible d'analyser spécifiquement une cellule, voire même de mettre en évidence une activation/diminution de son métabolisme (Bi *et al.*, 2014).

2. Méthodes de traitement

La complexité des échantillons biologiques rend l'information vibrationnelle difficile à analyser. S'ajoutent à celle-ci des analyses par balayage générant de grande quantité de spectres, ce qui augmente encore la difficulté de l'analyse des données (Schie and Huser, 2013). Différentes méthodes de traitement des données ont ainsi été développées afin d'en simplifier leur analyse. Ces méthodes, dites multivariées, utilisent les informations provenant d'un spectre entier. Elles peuvent gérer une grande quantité d'informations vibrationnelles pour retranscrire de manière simplifiée les différences spectrales entre échantillons.

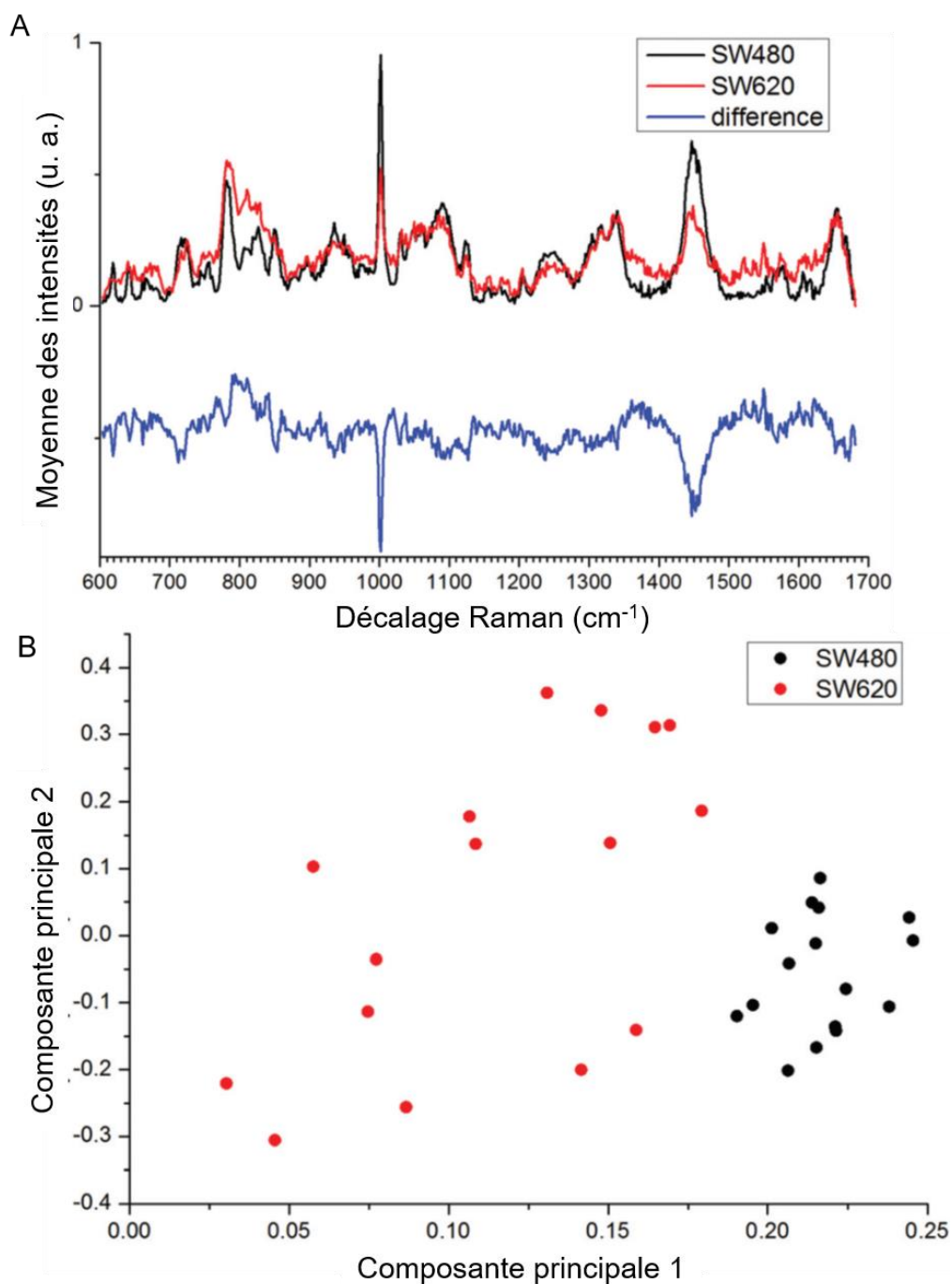


Figure 4 : Identification de cellules de lignées cellulaires issues de cancers colorectaux.

(A) Spectre Raman de cellules cancéreuses colorectales (SW480-noir) et (SW620-rouge) ainsi que la différence des deux spectres (SW620-SW480-bleu) sur la plage 600-1700 cm⁻¹. (B) Analyse en composantes principales de 16 cellules SW480 (rouge) et SW620 (noir). D'après Tsikritsis et al., 2015.

Les deux techniques de traitement les plus utilisées dans le cas de la spectroscopie/microspectroscopie Raman sont l'analyse en composantes principales et le clustering.

a. L'analyse en composantes principales ou ACP

L'analyse en composantes principales va transformer un grand nombre de données en un jeu de données simplifiées ce qui permet de décorrélérer les données vibrationnelles et d'en simplifier la visualisation. A chaque mesure, il existe différentes CP (composantes principales) ou la première CP présente les plus grandes variabilités au sein de l'échantillon par rapport à la référence. Cette variabilité diminue avec le nombre de composantes principales, nommées sous forme de scores qui correspondent les nouvelles coordonnées des spectres suivant les CP, correspondant à la dispersion des données par rapport à la moyenne (Chen *et al.*, 2011).

Les différentes CP peuvent être représentées sous forme de spectre. De leurs côtés, les scores sont représentés sous forme de diagramme de dispersion (Bonnier and Byrne, 2012). Par exemple, Dimitrios Tsikritsis *et al.* ont utilisé suite à l'acquisition de nombreux spectres Raman ce mode de traitement dans le but de différencier des cellules issues de tumeurs primaire et secondaire humaines (**figure 4**). L'analyse spectrale, les CP et les diagrammes de dispersion des scores les ont conduits à mettre en évidence que les cellules de tumeurs primaires présentaient plus de lipides et de protéines (structure en hélice alpha), et les cellules de tumeurs secondaires plus de porphyrines et des protéines avec des structures en feuillet beta (**figure 4A**) leur permettant une discrimination nette lors d'analyse en composantes principales (**figure 4B**) (Tsikritsis *et al.*, 2015).

James W. Chang *et al.* ont utilisé la même méthodologie dans le but de différencier des lymphocytes humains B et T normaux, des lymphocytes transformés, respectivement cellules des lignées Raji et Jurkat (**figure 5**). Cette discrimination s'avère possible grâce aux différences quantitatives de protéines et d'ADN, visibles lors des analyses spectrales (**figure 5A a, b**).

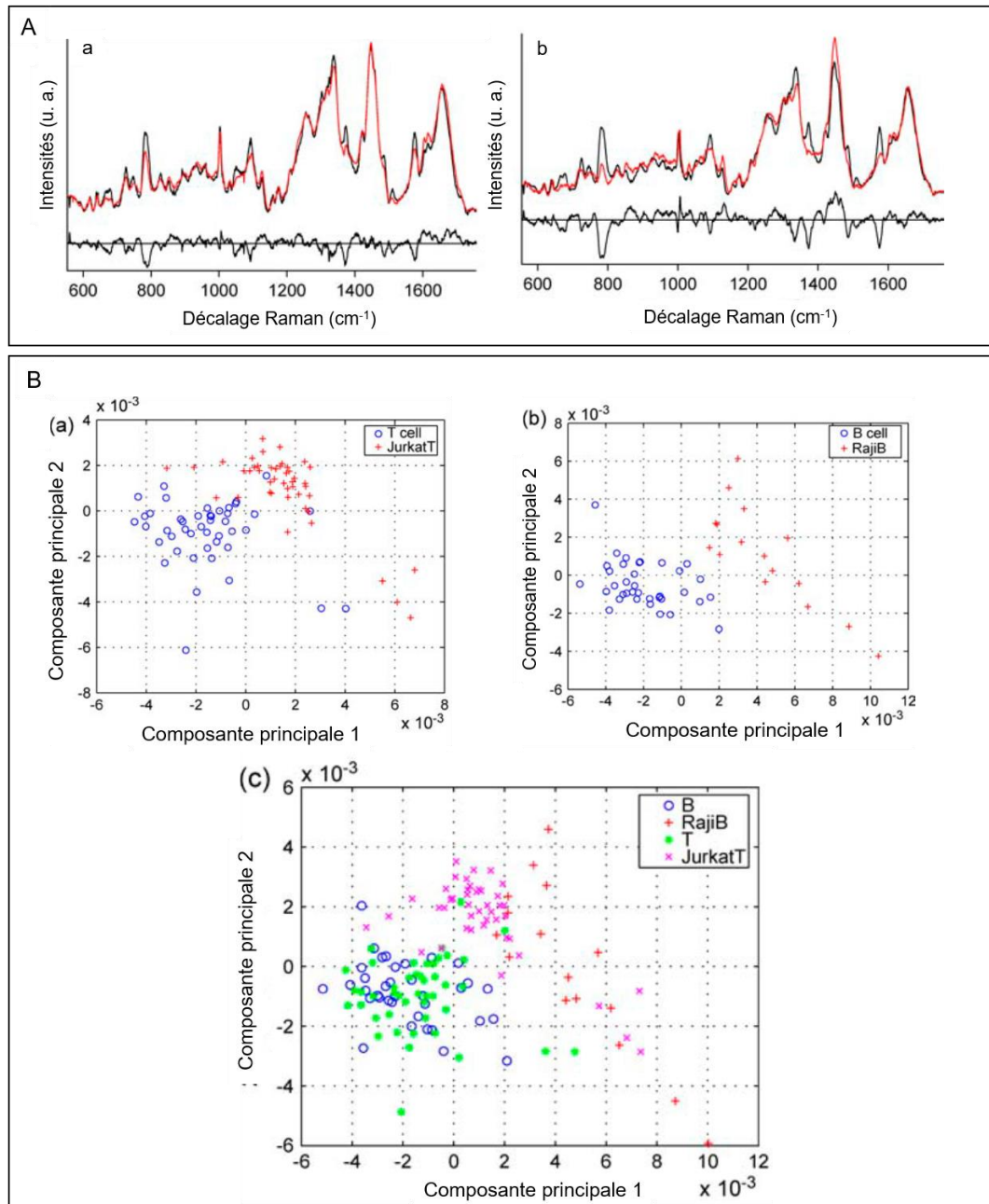


Figure 5 : Détection par spectroscopie Raman de cellules hématopoïétiques normales et cancéreuses.

(A) Spectre Raman de (a) lymphocytes T (noir) et lymphocytes T cancéreux (cellules Jurkat - rouge) ainsi que la différence des deux spectres sur la plage 600-1700 cm⁻¹ (b) lymphocytes B (noir) et lymphocytes B cancéreux (cellules Raji - rouge) ainsi que la différence des deux spectres sur la plage 600-1700 cm⁻¹. (B) Analyse en composantes principales comparant (a) lymphocytes T (bleu) et lymphocytes T cancéreux (cellules Jurkat - rouge) ; (b) lymphocytes B (bleu) et lymphocytes B cancéreux (cellules Raji - rouge) ; (c) lymphocytes T (vert) et lymphocytes T cancéreux (cellules Jurkat - rose), lymphocytes B (bleu), lymphocytes B cancéreux (cellules Raji - rouge). D'après Chan *et al.*, 2006.

Par ACP, ils ont différencié simultanément des cellules saines *versus* des cellules transformées (**figure 5B a,b**). Ils ont ainsi pu discriminer les 4 populations cellulaires (**figure 5B,c**) (Chan *et al.*, 2006). Ainsi, l'ACP permet par traitement des données spectrales de classer entre-elles les différentes cellules présentes dans l'échantillon analysé.

b. L'analyse de clustering

Une seconde méthode de traitement, couramment utilisée en microspectroscopie, est l'analyse de clusters. Lorsqu'une cellule est analysée par balayage (ou « scanning ») par microspectroscopie Raman, le traitement du jeu de données est souvent réalisé par la méthode de clustering. Elle permet de visualiser artificiellement sous la forme de couleurs de même intensité des données similaires entre elles. Le spectre en chaque point de mesure correspond à la présence d'un constituant moléculaire majoritaire auquel correspondra la couleur associée au cluster.

L'analyse de clustering, dans le cas d'analyse cellulaire par la microspectroscopie Raman, est souvent utilisé pour visualiser des organites et des vésicules de par leurs caractéristiques spectrales. Par exemple, le cluster associé aux gouttelettes lipidiques a la particularité d'avoir une forte signature associée aux liaisons CH₂ et celui associé au noyau a une forte signature vibrationnelle due aux liaisons phosphate présentes dans l'ADN.

Deux types de clustering sont principalement utilisés : le clustering *k*-mean et la méthode HCA (Hierarchical Clustering Analysis).

i. Méthode de traitement par clustering k-mean

Le *k*-clustering regroupe l'ensemble des données en un nombre défini de clusters (*k*). A chaque cluster, une moyenne est attribuée. Ainsi, les moyennes de chaque nouveau jeu de données seront assignées aux clusters de même moyenne ou proche de celle-ci (Chen *et al.*, 2011).

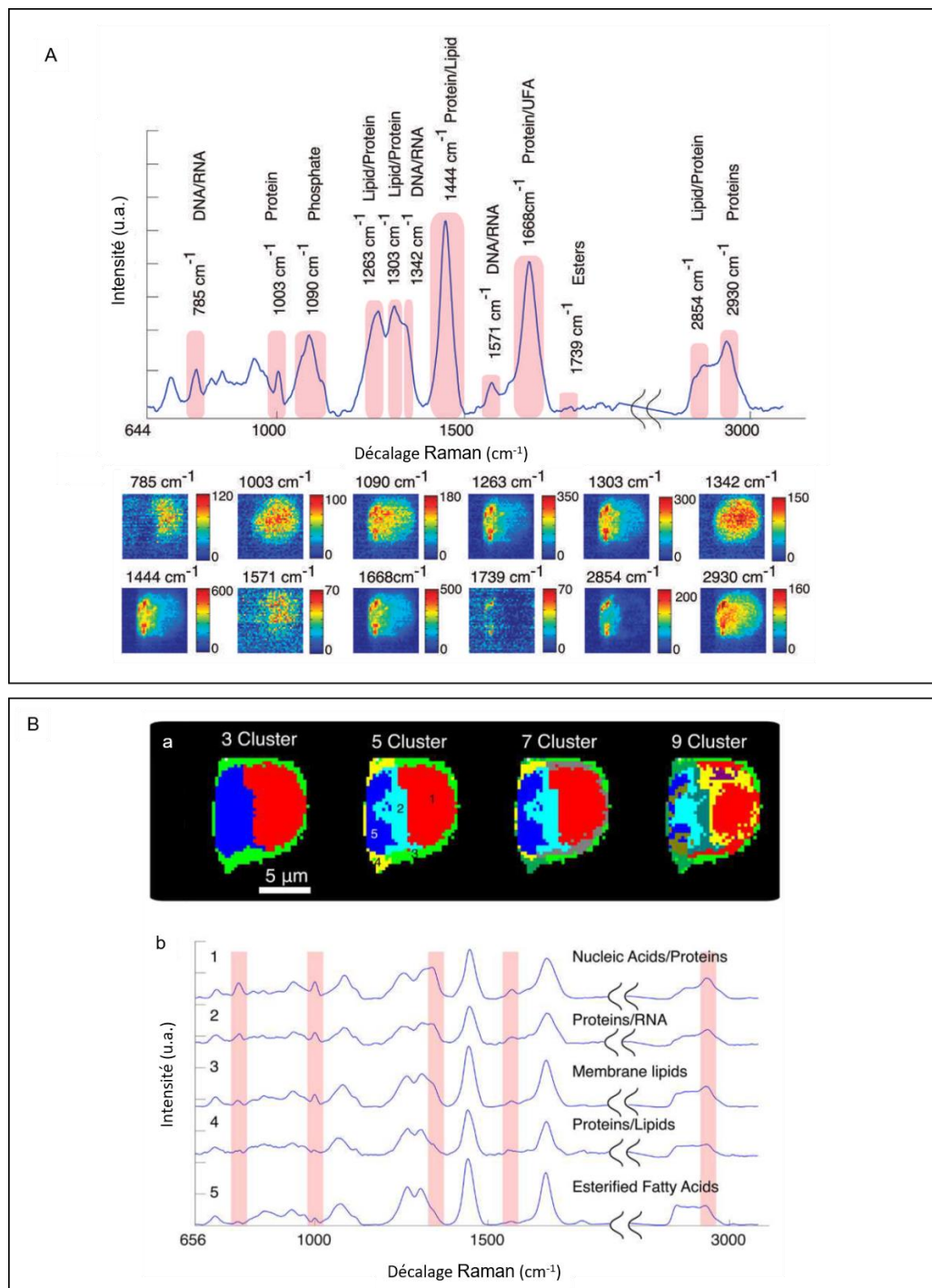


Figure 6 : Comparaison de cartographies Raman avec ou sans traitement en composantes principales.

(A) Analyse par la microspectroscopie Raman d'un lymphocyte T montrant (a) le spectre Raman moyenné dans la zone d'empreinte biologique (650-2000 cm^{-1}) et dans la zone CH (2750-3300 cm^{-1}) ainsi que (b) les cartographies cellulaires correspondantes pour les douze décalages Raman (mis en évidence en rose sur le spectre). (B) Analyse de la même cellule par clustering *k*-mean montrant (a) les cartographies cellulaires lorsque 3, 5, 7 ou 9 clusters sont représentés ainsi que (b) les spectres moyens de chaque cluster avec leurs assignations biochimiques. D'après Schie and Huser, 2013.

Un exemple de l'utilisation du clustering *k*-mean, est illustré dans la figure 6. Pour cela, la globalité d'un lymphocyte T est analysé par microspectroscopie Raman à balayage (cartographie). Une première étude est réalisée en reconstituant la cartographie du lymphocyte T en utilisant différents décalages Raman pour localiser les constituants biochimiques au sein de la cellule (**figure 6A**) ; par exemple, l'identification de la distribution de l'ADN dans le noyau grâce à l'intensité de la bande à 785 cm^{-1} ou bien des protéines, dans le cytoplasme, par l'intermédiaire de la vibration à 1003 cm^{-1} . Cependant, avec cette technique il n'est pas possible de visualiser les différents compartiments cellulaires car les pics souvent très proches les uns des autres ne permettent pas une cartographie très précise. Ainsi, sur les mêmes échantillons, une analyse par la méthode de *k*-clustering est effectuée (**figure 6B**). Les auteurs ont reconstruit les cartographies du lymphocyte T dans le cas où il y a 3, 5, 7 ou 9 clusters. Chaque nouveau cluster permet d'identifier une nouvelle ultrastructure de la cellule. En analysant les spectres moyens de chaque cluster, les auteurs constatent que chaque spectre possède sa particularité propre permettant de distinguer un groupe biochimique en particulier. Par exemple une augmentation du pic à 733 cm^{-1} représentant les acides nucléiques. Ainsi, le *k*-clustering favorise l'obtention de cartographie cellulaire beaucoup plus résolue mais surtout donne une analyse des composants cellulaires sans à priori (Schie and Huser, 2013).

Un autre exemple d'utilisation de clusering *k*-mean présente une cellule de carcinome de poumon humain (lignée A549) analysée par balayage à l'aide de la microspectroscopie Raman (**figure 7A**). L'algorithme de *k*-clustering utilisé permet de retracer la cellule avec 4 clusters distincts correspondant aux nucléoles (rouge), au noyau (en vert), au cytoplasme (bleu) et à l'extérieur de la cellule (noir) (**figure 7B**). Les spectres de la figure 7C permettent d'identifier pour chaque cluster des différences vibrationnelles dues aux biomolécules qu'il inclut (Bonnier and Byrne, 2012).

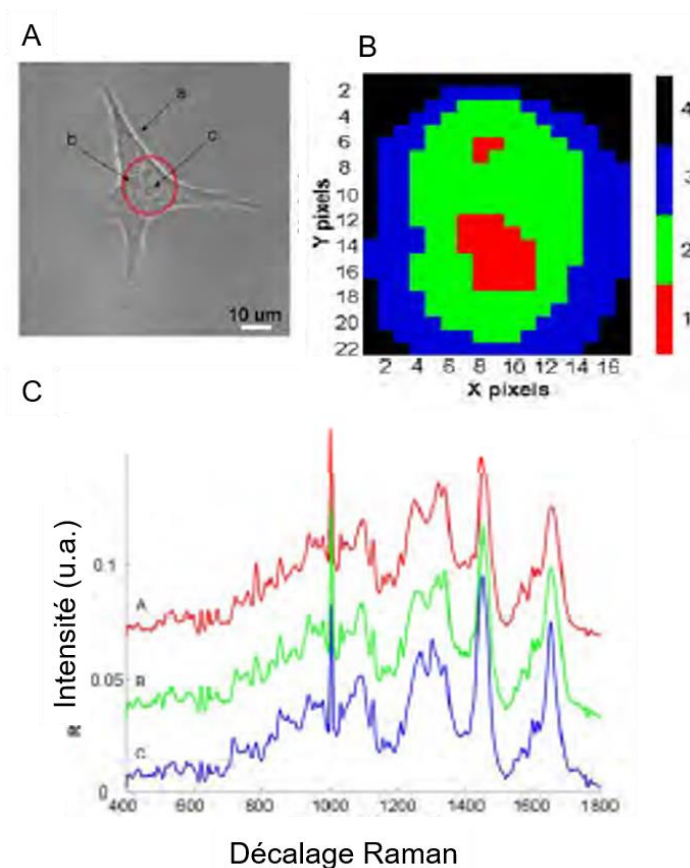


Figure 7 : Analyse par clustering *k*-mean d'une cellule de carcinome de poumon humain (lignée cellulaire A549).

(A) Image en microscopie en lumière blanche de la cellule. Le cercle rouge correspond à la zone analysée par la microspectroscopie Raman, (B) Analyse par la microspectroscopie Raman, dans la zone d'empreinte biologique (400-1800 cm^{-1}) suivie d'un traitement par clustering *k*-mean mettant en évidence trois clusters associés aux nucléoles (rouge), au noyau (vert) et au cytoplasme (bleu). (C) Spectre moyen de chaque cluster dans la zone d'empreinte biologique (400-1800 cm^{-1}). D'après Bonnier and Byrne, 2012.

ii. Méthode de traitement par HCA

La seconde, « Hierarchical Clustering Analysis » (HCA), est très proche du clustering *k*-mean, mais elle consiste à regrouper les données de façon itérative au sein de cluster de plus en plus vastes. Les résultats sont souvent représentés sous forme de dendrogramme qui met en évidence la structure hiérarchique de la population étudiée (Chen *et al.*, 2011).

Une étude, qui montre toute la puissance de cette technique de traitement, a été réalisée sur des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (**figure 8**). Le parasite, en infectant l'érythrocyte et se multipliant, va dégrader l'hémoglobine présente dans la cellule et provoquer la synthèse d'hémozoïne, produit de dégradation de l'hémoglobine, utilisée pour révéler une infection par *Plasmodium falciparum*. Après analyse par microspectroscopie Raman d'un érythrocyte infecté, la méthode HCA a été utilisée sur tout le jeu de données d'une cartographie cellulaire. L'analyse des spectres indique qu'une interprétation en absence de traitement s'avère compliquée (**figure 8A**). En revanche, suite à un traitement par la méthode HCA avec une représentation sous forme de dendrogramme, nous constatons clairement que chaque nouvelle branche du dendrogramme correspond à un cluster spécifique montrant une zone particulière de la cellule. Comme cette méthode est hiérarchisée, on constate nettement que les clusters 1 et 2 tout comme les clusters 3 et 4 sont très proches. Par contre, les clusters 1, 2 sont très éloignés des clusters 3 et 4. Les auteurs en concluent, grâce à des spectres de référence, que le cluster 1 (bleu) permet de mettre en évidence l'hémoglobine, occupant toute la cellule, tandis que le cluster 2 (rouge) met en évidence l'hémozoïne présente dans les vacuoles (**figure 8C**). La présence de cette dernière dans l'érythrocyte étudié est une signature de la présence de *P. falciparum* (Bonifacio *et al.*, 2008).

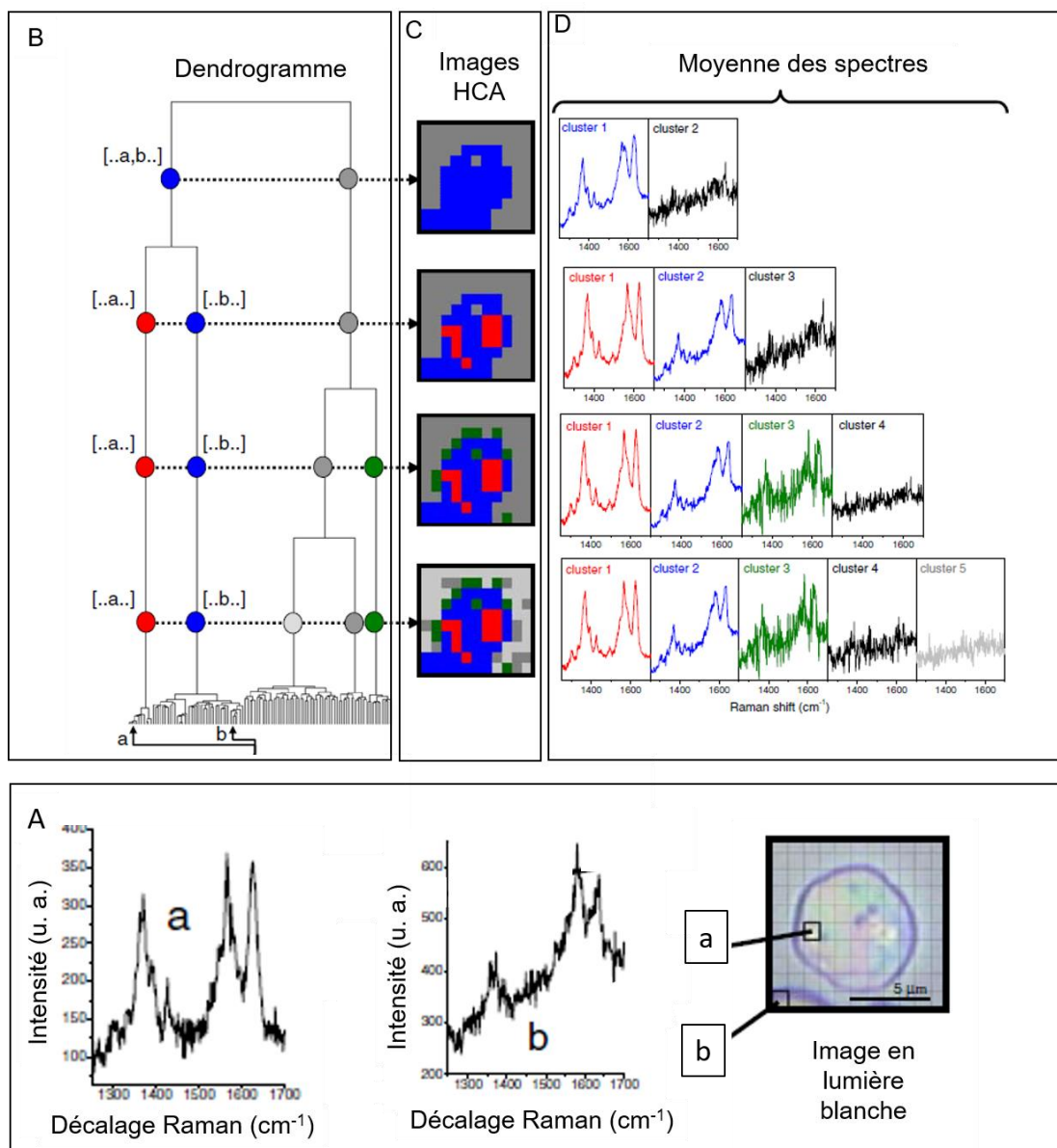


Figure 8 : Apport de traitements par HCA après analyse par microspectroscopie Raman d'un érythrocyte infecté par *Plasmodium falciparum*.

(A) deux points de la cartographie sont sélectionnés et comparés. Les spectres correspondants sont montrés dans la zone d'empreinte biologique (1300-1700 cm⁻¹). (B) Suite au traitement HCA, le dendrogramme établi met en évidence la hiérarchisation des clusters. (C) Pour chaque niveau de la hiérarchie, une cartographie cellulaire est montrée (incluant les différents clusters) ainsi que les spectres associés en (D). D'après Bonifacio et al., 2008.

De façon générale concernant la méthodologie de traitement par clustering, on constate nettement que les profils des spectres moyens de chaque cluster sont vraiment très proches les uns des autres et que les différences d'intensité entre les pics restent assez subjectives.

Même si les méthodes de traitement entre le *k*-clustering, la HCA et l'ACP sont différents, le résultat final reste néanmoins très semblable par ces trois méthodes. Une étude de 2011 s'est intéressée aux différences pouvant exister entre les algorithmes utilisés pour une même mesure (**figure 9**). On constate clairement que lors du traitement avec le *k*-clustering (**figure 9d**), la HCA (**figure 9c**) et l'ACP (**figure 9e**), les résultats sont très proches les uns des autres. Il est possible de percevoir le noyau, les nucléoles, des organites dans le cytoplasme (mitochondries) et le contour de la cellule. Cette étude démontre la robustesse des méthodes de traitements multivariées (Hedegaard *et al.*, 2011). Ainsi, les méthodes d'analyses multivariées non supervisées (ACP, *k*-clustering et HCA), mettent en évidence des différences spectrales parfois difficiles à discerner sous forme de cartographie cellulaire (Bonnier and Byrne, 2012).

Ainsi, l'utilisation d'algorithmes pour le traitement de données dans le cas de la microspectroscopie Raman, s'avère obligatoire afin d'ordonner les informations spectrales et d'en déduire des similitudes ou différences.

Malgré les nombreux avantages qu'offre la microspectroscopie Raman adossée aux différentes méthodes d'analyses des données, cette technologie possède un inconvénient majeur, le temps d'analyse surtout lorsque des mesures par balayage de cellules sont réalisées. En effet, il faut, selon la configuration de l'appareil et l'échantillon analysé, en moyenne 1 minute pour obtenir un spectre Raman

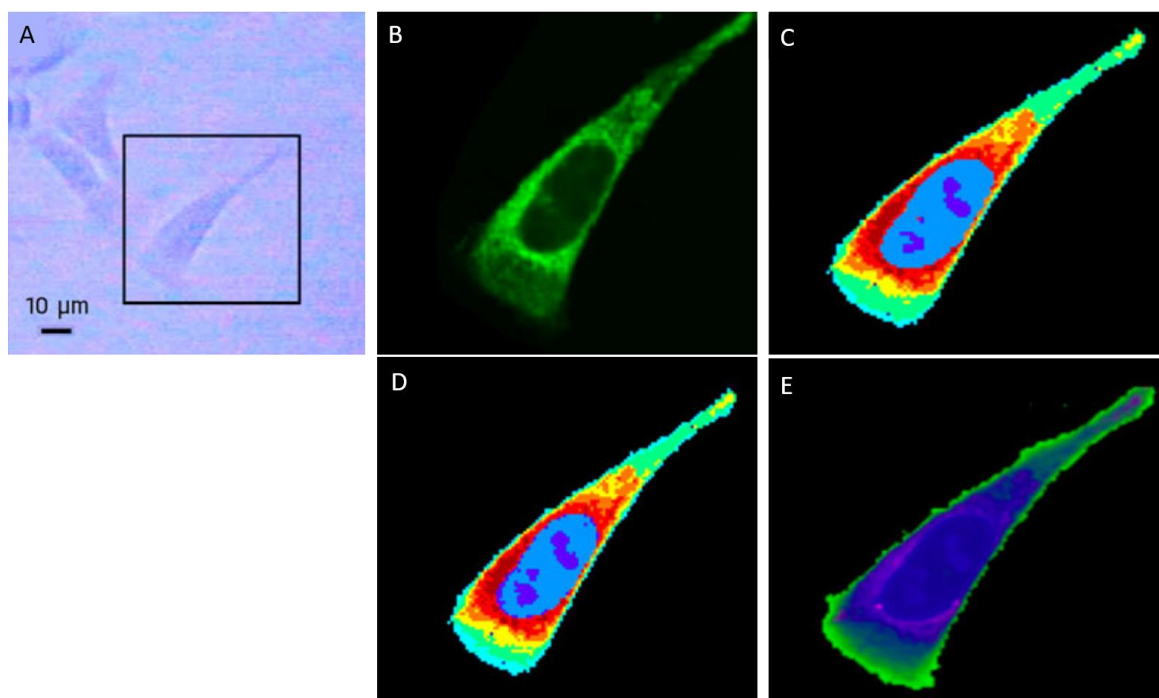


Figure 9 : Comparaison de cartographies Raman suite à différents traitements

(a) Une cellule HeLa est analysée par microspectroscopie Raman sur tout le spectre Raman et (b) un marquage spécifique au Mitotracker est réalisé pour mettre en évidence les mitochondries (en vert). Les données sont ensuite traitées par (c) HCA et (d) clustering *k*-mean. Les traitements permettent de visualiser les nucléoles (bleu foncé), le noyau (bleu clair), la région cytoplasmique contenant divers organites (orangé). Un traitement (e) PCA produit un résultat moins contrasté. D'après Hedegaard *et al.*, 2011.

3. Avantages et inconvénients

En plus du temps d'analyse, la microspectroscopie Raman présente quelques autres inconvénients. L'un des inconvénients majeurs est l'autofluorescence inhérente aux échantillons biologiques. Elle provient principalement du milieu cellulaire et induit une perte d'information vibrationnelle. En effet, la zone spectrale couverte par la spectroscopie Raman est en recouvrement avec la zone spectrale associée à la fluorescence. Comme les photons provenant de la fluorescence ont une efficacité plus importante que les photons provenant de la spectroscopie Raman, ils « noient » le signal vibrationnel. A cela s'ajoute sa faible efficacité quantique (besoin d'une grande quantité de photons diffusés pour observer une signature vibrationnelle). Ainsi, ces deux paramètres sont à l'origine d'un temps d'analyse long pour générer des cartographies cellulaires (Cheng and Xie, 2004; Holtom *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2010). Il faut, selon la configuration de l'appareil et l'échantillon analysé, en moyenne 1 seconde à 1 minutes pour obtenir un spectre Raman. Ainsi, pour une étude d'une cellule par cartographie de 100 points par 100 points (axes X, Y), il faudrait un temps global entre 2 heures et 7 jours, temps d'analyse trop long pour être compatible avec l'analyse d'échantillons biologiques vivants qui évolueront dans le temps (mort incontrôlée des cellules par exemple). A partir de ce constat, une nouvelle technologie a été développée utilisant les mêmes caractéristiques que la microspectroscopie Raman, tout en réduisant et améliorant le temps d'analyse, c'est la microspectroscopie CARS.

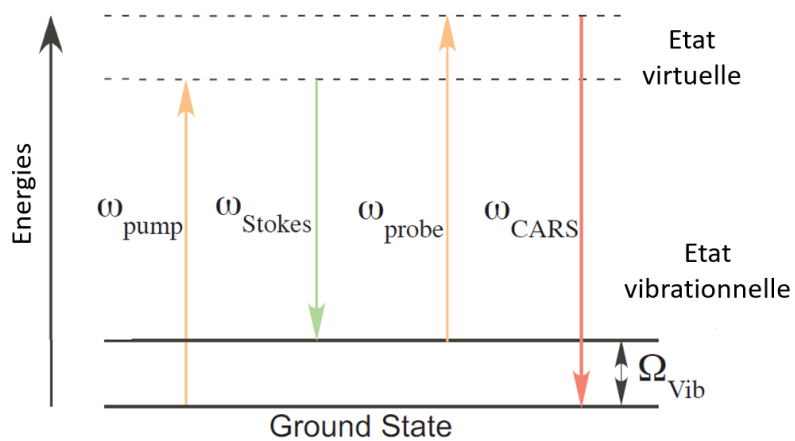


Figure 10 : Représentation du processus CARS sous forme de diagramme énergétique.
D'après Poon *et al.*, 2013.

III. La microspectroscopie vibrationnelle Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS)

La configuration et le phénomène CARS ont été reportés pour la première fois en 1965 par Maker et Terhune. C'est en 1982, que Duncan et ses collaborateurs ont réalisé la première image d'une cellule, cellule d'oignon traitée au deutérium (Duncan *et al.*, 1982). Depuis, avec le développement de nouveaux lasers, rapides et intenses cette technologie s'est développée et a trouvé de nombreuses applications, principalement en biologie (Capitaine *et al.*, 2018).

1. Processus vibrationnel

Le processus vibrationnel CARS est très semblable au processus vibrationnel Raman. La microspectroscopie CARS utilise un faisceau pompe unique, qui sera scindé en deux. Un premier correspondant au faisceau pompe lui-même (ω_p) et un second, correspondant au faisceau Stokes (ω_s). Après des parcours respectifs à travers des filtres et des miroirs dichroïques, il faut que ces deux faisceaux soient finalement spatialement et temporellement alignés avant de rejoindre l'échantillon. Une fois alignés, ils interagissent avec l'échantillon. C'est uniquement si la différence entre les fréquences des deux faisceaux ($\omega_p - \omega_s$) correspond à la fréquence de vibration de la liaison sondée qu'il y aura génération d'un signal anti-Stokes de fréquence $\omega_{AS} = 2 \omega_p - \omega_s$ (**figure 10**). Il en résulte un spectre CARS proche d'un spectre Raman.

La technologie CARS étant un processus cohérent et à « quatre ondes », cela génère des photons anti-Stokes de grandes puissances et dirigés dans un seul sens favorisant des temps d'analyses réduits avec un fort signal et une absence d'autofluorescence comparés au processus Raman (Evans and Xie, 2008; Krafft *et al.*, 2009; Poon *et al.*, 2013).

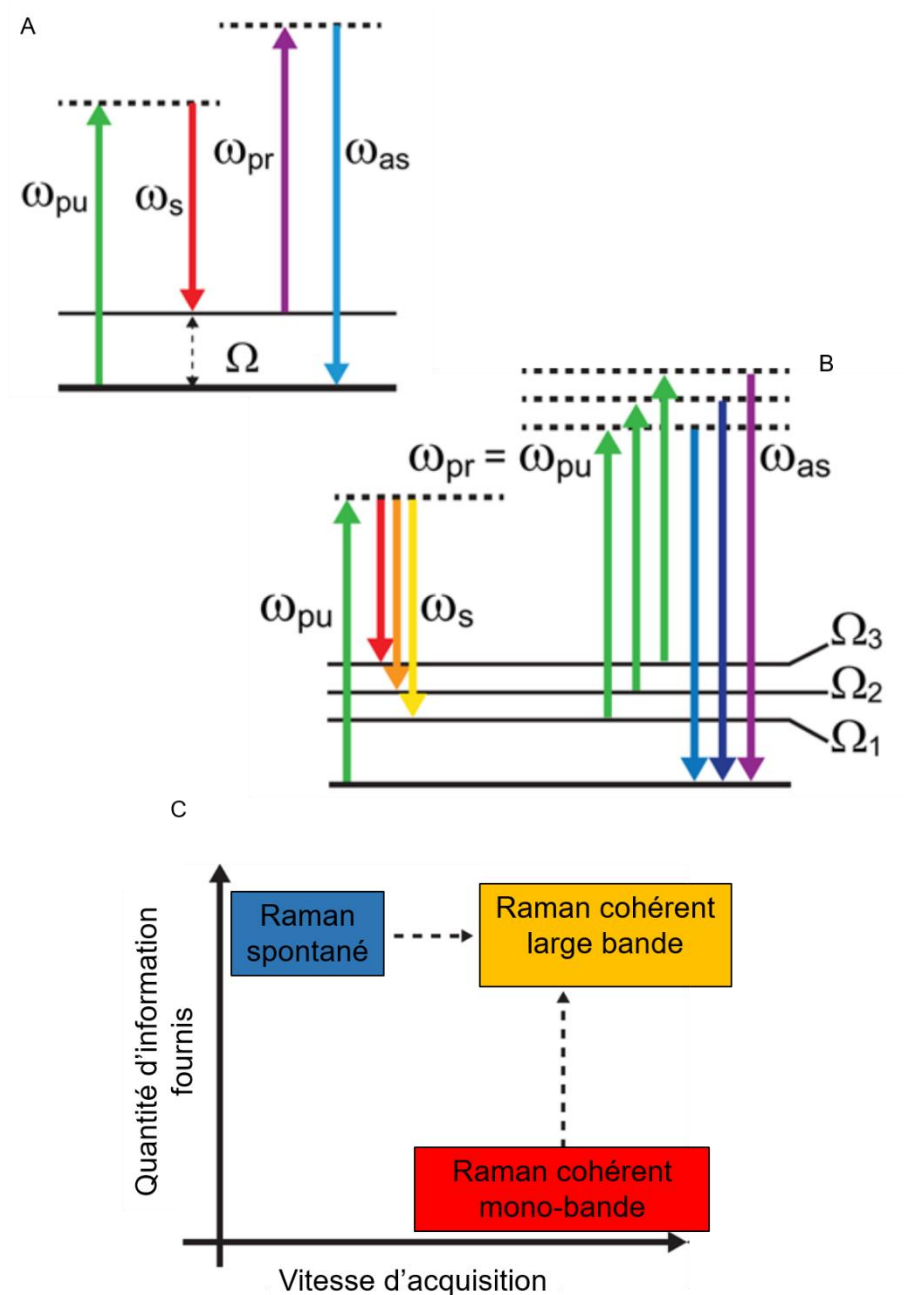


Figure 11 : Mécanisme du multiplexage dans le cas de la microspectroscopie CARS multiplexe (ou large bande) et les avantages/inconvénients associés.

(A) diagramme énergétique montrant le mécanisme CARS mono-bande ne pouvant exciter qu'un seul mode de vibration à la fois ; (B) mécanisme CARS multiplexe pouvant exciter plusieurs modes de vibration simultanément grâce à un supercontinuum ; (C) comparaison entre trois techniques vibrationnelles : Raman spontané (bleu), Raman cohérent large bande (jaune) et simple bande (rouge) en fonction de la quantité d'informations fournie et la vitesse d'analyse. D'après Polli *et al.*, 2018.

De plus, l'utilisation de deux faisceaux spatialement et temporellement alignés favorise la réalisation d'analyse en section optique, voire en 3D. En effet, comme le signal CARS est généré au niveau de l'échantillon uniquement au point focal des faisceaux, cette technique devient obligatoirement une technologie de précision (Krafft, 2012). Aussi, la microspectroscopie CARS s'avère une bonne alternative à la microspectroscopie Raman pour l'obtention du même type d'informations en éliminant les contraintes majeures inhérentes à cette dernière.

2. Imagerie cellulaire en mono-bande ou plusieurs bandes (Multiplexage)

L'imagerie CARS a débuté avec une configuration que l'on peut nommer « mono-bande ». Cela signifie qu'un seul décalage Raman est sondé sur une cartographie (**figure 11A**). Cette technologie a l'avantage de rechercher une espèce moléculaire en particulier avec un gain de temps considérable. Cependant, dans cette configuration, les autres décalages Raman ne sont pas mesurés et leur variation, au sein de l'échantillon, ne peut être analysée, ce qui entraîne une perte d'informations. Ainsi, pour obtenir une information moléculaire complète de l'échantillon, la microspectroscopie CARS à plusieurs bandes ou multiplexe a été développée. Pour cela, le faisceau Stokes doit couvrir une gamme de fréquences assez large alors que le faisceau pompe reste à une fréquence définie. Ainsi, la largeur du faisceau Stokes permet d'exciter simultanément tous les modes Raman (**figure 11B**), et de générer au final un spectre CARS dit large bande (Polli *et al.*, 2018). Lors de la réalisation de cartographie CARS (par la microspectroscopie CARS), chaque pixel contient un spectre CARS large bande. Ainsi, en une seule mesure, différentes cartographies cellulaires mettent en évidence différents décalages Raman, qui peuvent être attribués à des constituants cellulaires. Dans la configuration multiplexage, le temps d'analyse peut se retrouver augmenté, mais toujours inférieur à celui par microspectroscopie Raman (Krafft, 2012) (**figure 11C**).

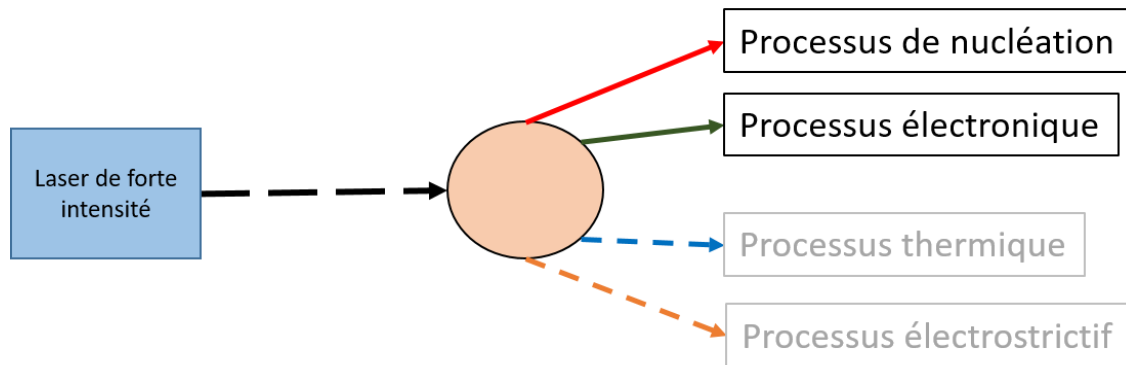


Figure 12 : Représentation schématique de la génération du signal CARS.

Lorsque l'on excite l'échantillon par un laser intense, 4 types de processus non linéaires peuvent se produire : nucléaire (processus vibratoire), électronique (déformation du nuage électronique), thermique (échauffement de l'échantillon), électrostrictif (propagation d'onde acoustique). Les processus thermiques et électrostrictifs sont faibles et peuvent être considérés comme négligeables. D'après Ouazzani, 2012 ; Chniti, 2016

Comme tout processus vibrationnel, il y aura toujours des problèmes concernant le rapport signal sur bruit. Dans le cas de la microspectroscopie CARS, le signal généré est très régulièrement associé à un second signal, dû à la technologie, la signature électronique propre à l'échantillon ou bruit de fond non résonnant.

3. Le bruit de fond non résonnant

Lorsque l'on excite l'échantillon par un laser intense, 4 types de processus non linéaires peuvent se produire (**figure 12**) :

- Les processus nucléaires (effet Raman) correspondant à la capacité vibrationnelle (et rotationnelle) de la molécule étudiée ;
- Les processus électroniques (effet Kerr) correspondant à la déformation du nuage électronique composant les atomes ;
- Les processus thermiques (absorption multiphotoniques) correspondant à l'échauffement de l'échantillon dû à l'absorption des photons incidents ;
- Les processus électrostrictifs correspondant à la propagation d'ondes acoustiques dans l'échantillon.

Chacun des processus est une contribution à la susceptibilité non linéaire de troisième ordre. Les processus thermiques et électrostrictifs étant relativement faibles, ils n'engendrent pas de modifications de signature vibrationnelle, seuls les deux premiers participent à la génération du signal CARS. Le bruit de fond correspond classiquement à tout ce qui peut influencer une mesure en apportant des informations « parasites » dues par exemple à l'environnement de l'échantillon analysé. Dans le cas du CARS c'est le signal électronique (Ouazzani, 2012 ; Chniti, 2016).

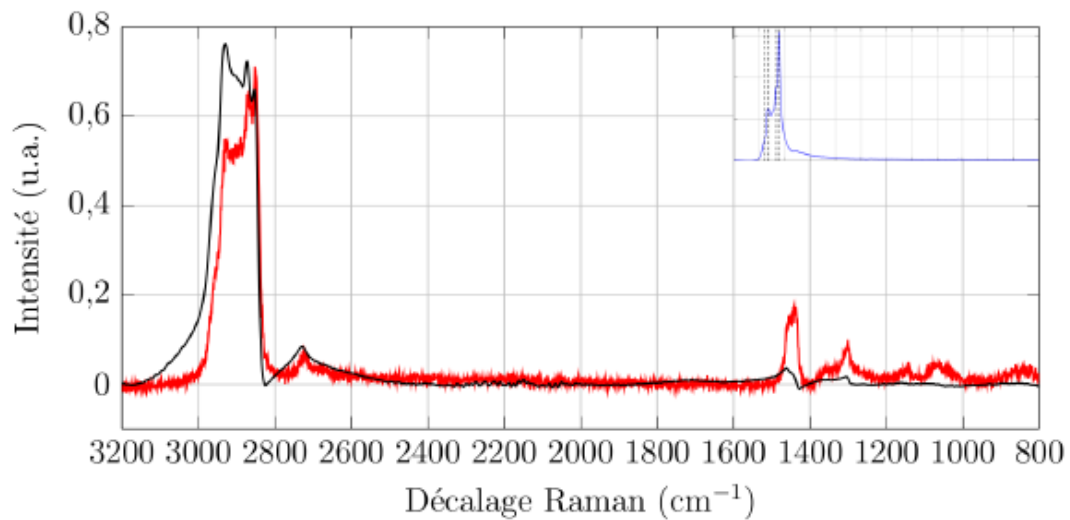


Figure 13 : Comparaison de spectres Raman et CARS.

De la paraffine liquide est analysée par spectroscopie Raman (tracé rouge) et par spectroscopie CARS multiplexe puis traité par la méthode de MEM (tracé noir) sur la plage de 800-3200 cm^{-1} . En haut à droite est montré le spectre CARS brut. D'après Capitaine, 2017.

Parmi ces deux processus, la réponse nucléaire correspond au signal vibrationnel recherché. Mais il y a aussi la réponse électronique qui, dans le cas d'analyse d'échantillons biologiques, est très forte et induit une perte du signal vibrationnel. Ces deux processus sont étroitement liés, il s'avère donc nécessaire d'extraire la réponse vibrationnelle du signal CARS brut pour analyser l'échantillon.

4. Méthode de traitement

Afin d'isoler le signal vibrationnel du signal électronique, des modifications peuvent être apportées au niveau de l'instrumentation CARS pour atténuer le bruit de fond non résonnant, mais elles nécessitent des montages complexes (Capitaine, 2017). Des traitements informatiques pour conserver l'information vibrationnelle et éliminer le bruit de fond non résonnant sont une alternative. Pour cela, l'algorithme de l'entropie maximum ou MEM semble être la plus intéressante. La méthode de traitement MEM est basée sur les travaux de E. M. Vartiainen *et al.*, le but étant d'extraire l'information vibrationnelle du signal CARS brut (Vartiainen *et al.*, 2006).

Cet algorithme a été adapté par Erwan Capitaine durant son doctorat. Pour s'assurer que le traitement MEM ne produit pas de nouveau décalage Raman ou n'induit pas une perte d'informations, il a comparé des spectres CARS traités par la MEM avec des spectres Raman (dits de référence) obtenus à partir de paraffine liquide utilisée comme échantillon en raison de sa grande capacité vibrationnelle (**figure 13**). On constate que les spectres traités par l'algorithme MEM sont comparables aux spectres de référence Raman. Cet algorithme semble pertinent pour l'extraction de la signature vibrationnelle en s'affranchissant du bruit de fond non résonnant (Capitaine, 2017).

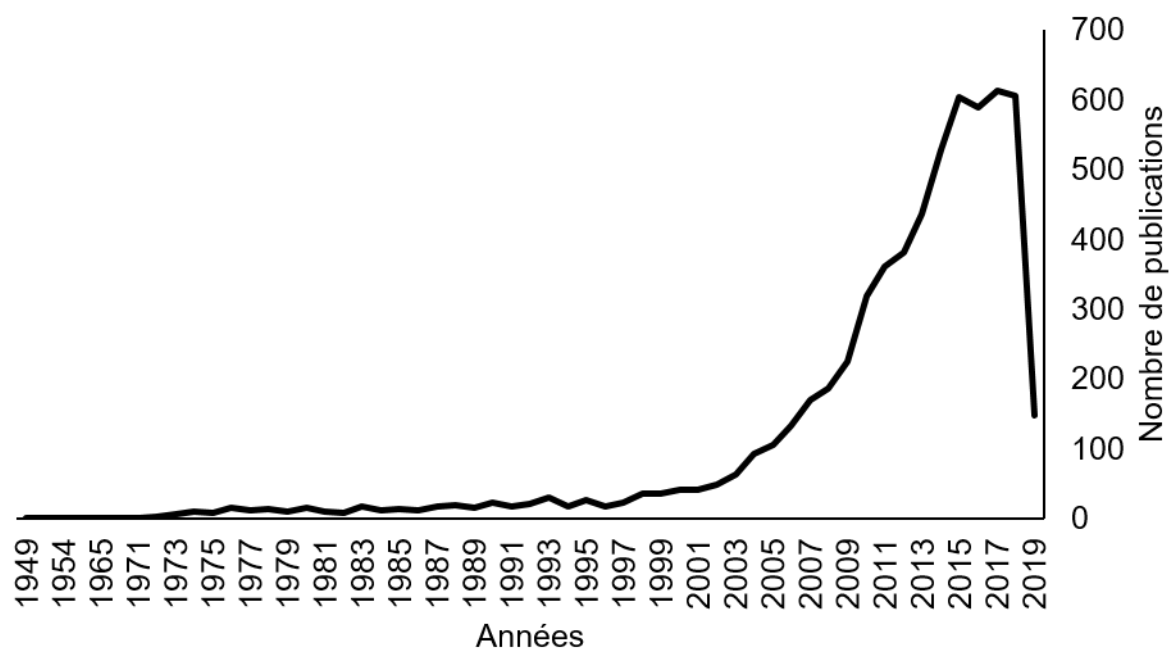


Figure 14 : Évolution du nombre de publications entre 1949 et 2019 avec les mots clefs « Raman » et « cells » sur PubMed.

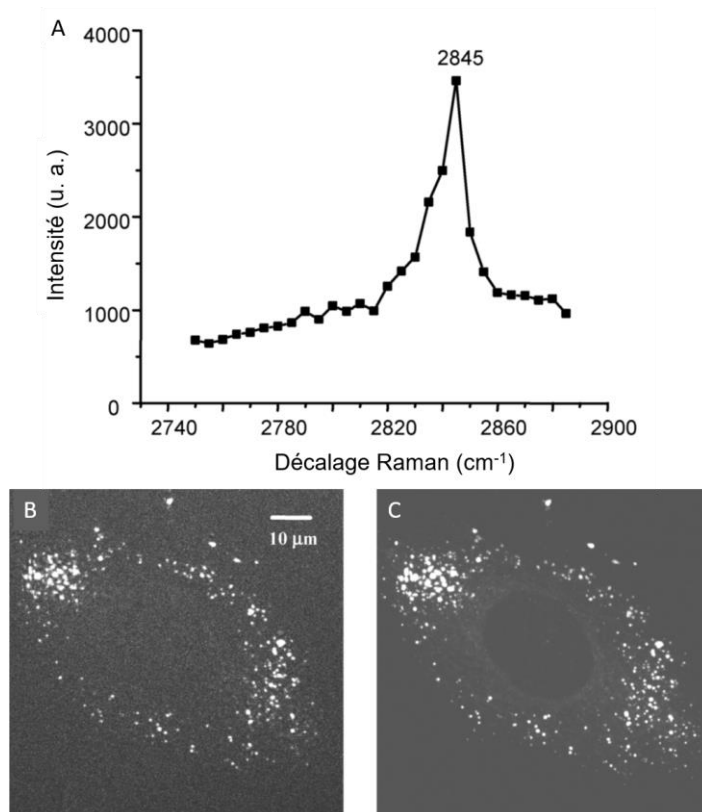


Figure 15 : Analyse par la microspectroscopie CARS de cellule 3T3-L1 différenciée en cellule adipeuse.

(A) Spectre CARS sur la plage de 2730-2900 cm^{-1} d'une gouttelette lipidique provenant de cellule 3T3-L1 différenciée. (B) Cartographie CARS à 2845 cm^{-1} d'une cellule 3T3-L1 différenciée. (C) Image de cette même cellule marquée au Oil Red O pour révéler les gouttelettes lipidiques. D'après Nan et al., 2003.

IV. Application de la spectroscopie vibrationnelle à biologie cellulaire

Depuis les années 2000, le nombre d'études utilisant la microspectroscopie Raman, et plus récemment la microspectroscopie CARS pour mettre en évidence des processus biologiques s'est accéléré (**figure 14**). Tout d'abord, des signaux associés à des biomolécules ont été identifiés afin de les utiliser pour différencier des cellules entre elles. La microspectroscopie a ensuite été étendue à la mise en évidence de processus pathologiques, principalement l'identification de cellules cancéreuses, voire même à l'impact d'un traitement anti-cancéreux. L'avantage considérable de ces technologies est l'obtention de nombreuses informations concernant l'échantillon sans coloration et/ou marquage préalables.

Au cours de ce travail, il sera explicité et de manière non exhaustive des études portant sur l'identification de différents constituants cellulaires passant par la mise en évidence d'organites (comme les mitochondries), la distinction entre différentes lignées cellulaires, et le processus de différenciation cellulaire. Les études portant sur les microspectroscopies Raman et CARS seront présentées ensemble, car elles sont très proches, autant dans leur principe que dans les résultats finaux.

1. Analyse du contenu cellulaire

Les microspectroscopies Raman et CARS sont souvent utilisées dans la région dite de hautes longueurs d'onde ou région CH. Dans cette zone, il est possible de mettre en évidence, majoritairement deux types de liaisons chimiques : les liaisons CH_2 , associées majoritairement aux lipides, et les liaisons CH_3 , associées majoritairement aux protéines. L'avantage de ces liaisons dans cette zone est leur signature de grande intensité favorisant l'obtention de cartographies cellulaires contrastées. En tenant compte de ces signatures particulières Nan *et al.* se sont intéressés à imager des gouttelettes lipidiques de fibroblastes en différenciation adipocytaire.

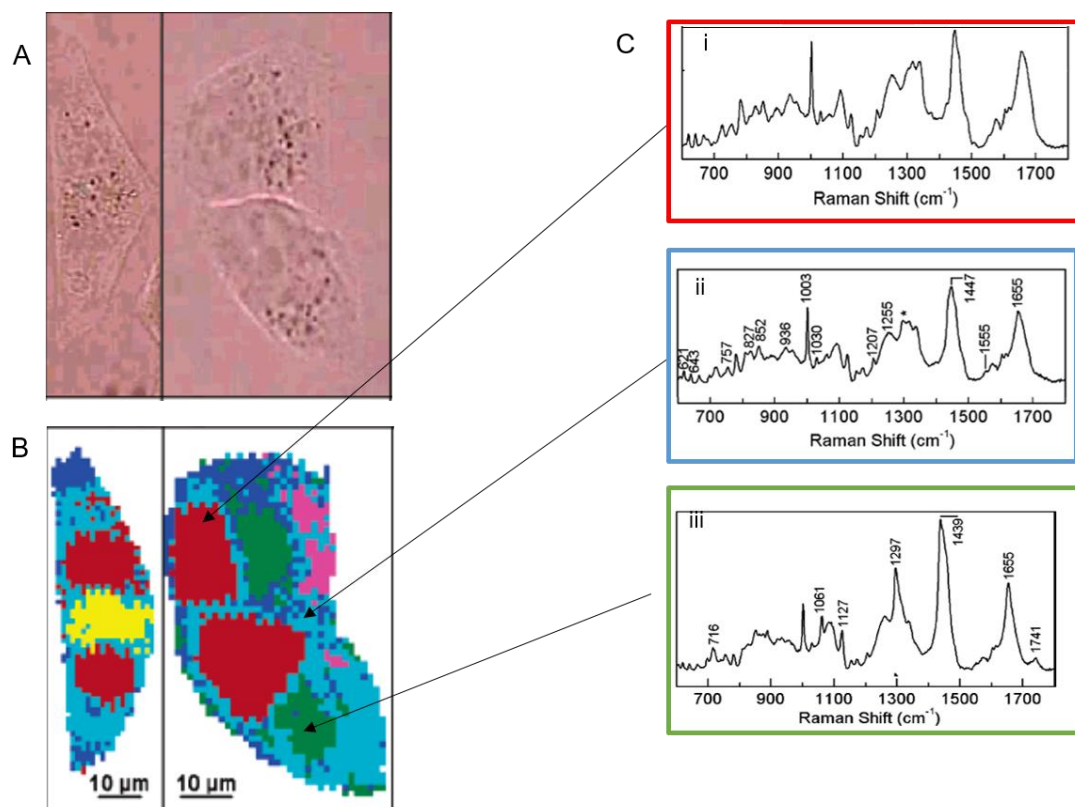


Figure 16 : Analyse de fibroblastes pulmonaires par la microspectroscopie Raman suivie d'un traitement par clustering.

(A) Image en lumière blanche de fibroblastes pulmonaires ; (B) Analyse par la microspectroscopie Raman suivie d'un traitement par le clustering *k*-mean mettant en évidence le noyau (rouge), le cytoplasme (bleu clair et foncé), les vésicules (vert) et les inclusions cytoplasmiques (magenta) ; (C) Spectres moyens pour chaque cluster : i-noyau (rouge), ii-cytoplasme (bleu) et iii-vésicules (vert). D'après Krafft *et al.*, 2006.

Tableau 2 : Tableau d'assignation de différents décalages Raman de divers composants biochimiques associés à des organites cellulaires. D'après Krafft *et al.*, 2006.

Organites	Composants biochimiques	Décalage Raman
Noyau	Bases de l'ADN	Thymine (669 cm ⁻¹ , 745 cm ⁻¹ , 1375 cm ⁻¹) Guanine (680 cm ⁻¹ , 1486 cm ⁻¹ , 1577 cm ⁻¹) Adénine (727 cm ⁻¹ , 1342 cm ⁻¹) Cytosine (786 cm ⁻¹) Liaison phosphodiester (832 cm ⁻¹ , 1092 cm ⁻¹ , 1421 cm ⁻¹).
Cytoplasme	Acides aminés	Phénylalanine (621 cm ⁻¹ , 1003 cm ⁻¹ , 1030 cm ⁻¹ , 1207 cm ⁻¹) Tyrosine (643 cm ⁻¹ , 827 cm ⁻¹ , 852 cm ⁻¹) Tryptophane (757 cm ⁻¹ , 1555 cm ⁻¹) Acides aminés aliphatiques (1447 cm ⁻¹) Liaison peptidique (936 cm ⁻¹ , 1255 cm ⁻¹ , 1655 cm ⁻¹).
Vésicules cytoplasmiques	Lipides	716 cm ⁻¹ , 1061 cm ⁻¹ , 1127 cm ⁻¹ , 1297 cm ⁻¹ , 1439 cm ⁻¹ , 1655 cm ⁻¹ , 1741 cm ⁻¹ .

Ils ont, dans un premier temps, recherché le décalage Raman correspondant aux gouttelettes lipidiques, riches en triglycérides. Il se situe à 2845 cm^{-1} (**figure 15A**), et permet par la suite de réaliser des cartographies (**figure 15B**). Ainsi, ils observent la présence de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules en différenciation. Cette observation est identique, qu'elle soit réalisée par la microspectroscopie CARS, ou suite à un marquage spécifique des gouttelettes lipidiques par l'ORO (Oil Red O) observées par microscopie optique (**figures 15B et 15C**). Cette étude sera ensuite étendue à l'étude de la biogenèse des gouttelettes (Nan *et al.*, 2003).

Une étude en 2006, utilisant la microspectroscopie Raman avec un traitement des données par Clustering a permis d'identifier différentes structures subcellulaires de fibroblastes de poumons humains (**figure 16A**). Les auteurs ont mis en évidence 4 clusters associés aux noyaux, au cytoplasme, aux vésicules et aux inclusions cytoplasmiques (**figure 16B**). Pour chaque cluster, ils ont tracé les spectres correspondants dans le but d'identifier des décalages Raman spécifiques à chaque structure cellulaire en identifiant les principales molécules les constituants (**tableau 2**) (Krafft *et al.*, 2006).

En 2007, Matthäus *et al.* ont mis spécifiquement en évidence la présence de mitochondries par la microspectroscopie Raman. Pour ce faire, des cartographies suivies d'un traitement par HCA leur ont permis de mettre en évidence un cluster spécifique retrouvé dans le cytoplasme (**figure 17A,a**). Suite à un marquage au Mitotracker (ciblant spécifiquement les mitochondries) ils associent ce cluster aux mitochondries (**figure 17A,b**). Pour connaître ces caractéristiques spectrales, ils ont tracé les spectres correspondant au noyau, au cytoplasme ainsi qu'aux mitochondries (**figure 17B**) (Matthäus *et al.*, 2007). Ils constatent que ces trois spectres ont :

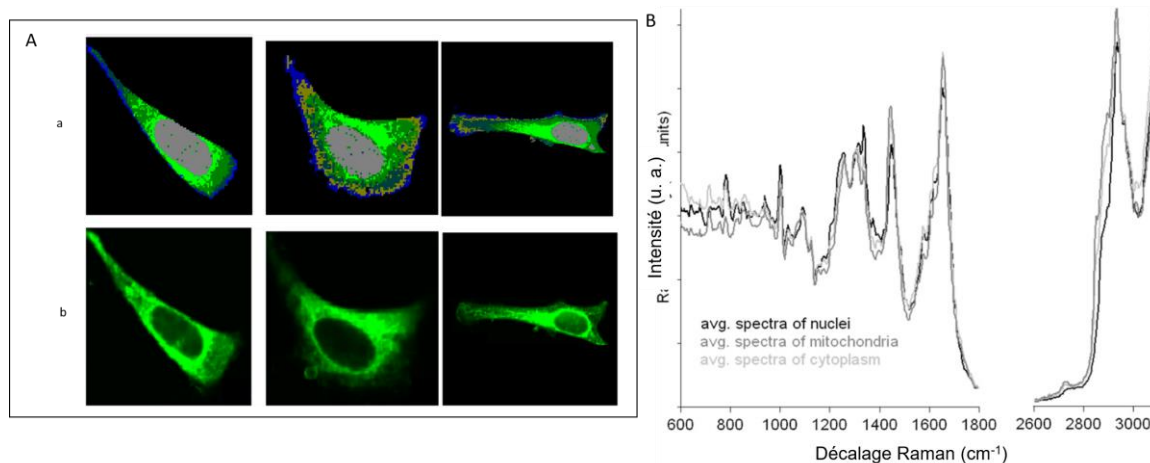


Figure 17 : Analyse par microspectroscopie Raman de cellule HeLa.

Mise en évidence de mitochondries dans 3 cellules HeLa, (a) par la microspectroscopie Raman suivie d'un traitement par HCA montrant le noyau (gris) et les mitochondries (vert), (b) marquage des mitochondries par le Mitotracker (vert). (B) Moyenne des spectres des clusters correspondant au noyau (noir), au mitochondrie (gris foncé) et au cytoplasme (gris clair) dans la zone d'empreinte biologique (600-1800 cm⁻¹) et dans la zone CH (2600-3200 cm⁻¹). D'après Mattäus *et al.* 2007.

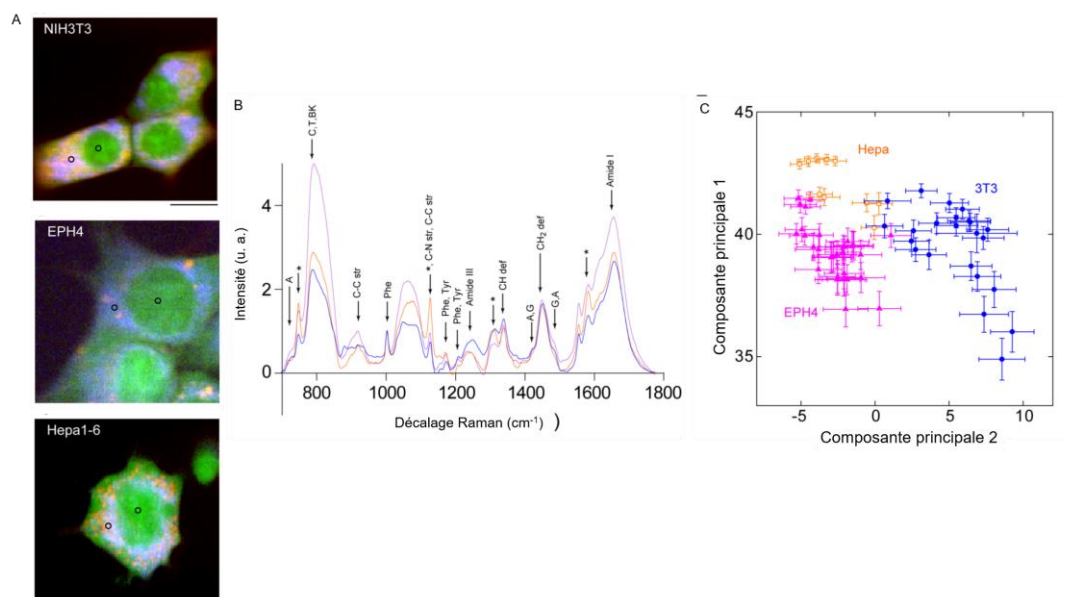


Figure 18 : Analyse par la microspectroscopie Raman de trois lignées cellulaires : NIH3T3 (fibroblastes de souris), EPH4 (cellules épithéliales mammaires) et Hepa1-6 (cellules hépatocytaires).

(A) Cartographie Raman reconstruites pour trois décalages Raman : cytochrome C en bleu (753 cm⁻¹), protéines en vert (1686 cm⁻¹) et lipides en rouge (2852 cm⁻¹). (B) Spectre Raman moyen du noyau des trois lignées cellulaires NIH3T3 (bleu), EPH4 (violet) et Hepa1-6 (orange) dans la zone d'empreinte biologique (700-1800 cm⁻¹). (C) Analyse en composantes principales des spectres présentés en B sous forme de plot en fonction de CP1 et CP2. D'après Ichimura *et al.*, 2011

- Des signaux identiques, majoritairement associés aux protéines (1655 cm^{-1} : amide I, amide III entre 1270 cm^{-1} et 1350 cm^{-1} et le cycle des phénylalanines à 1002 cm^{-1}) ;
- Des différences d'intensité dues à la contribution des lipides (entre 2850 cm^{-1} et 2900 cm^{-1} ainsi qu'à 1735 cm^{-1}), majoritairement présents dans le cytoplasme et les mitochondries ;
- Seuls les signaux associés aux bases uracile et thymine à 785 cm^{-1} sont fortement présents pour les spectres correspondant au noyau ainsi qu'au cytoplasme ;

Par l'intermédiaire de ces différentes études permettant l'identification d'organites associés à différents décalages Raman, la caractérisation de différentes lignées cellulaires devient possible. Ainsi, en 2014, Ichimura *et al.* ont comparé trois lignées cellulaires différentes : des fibroblastes (NIH3T3), des cellules épithéliales mammaires (EPH4) ainsi que des hépatocytes par la microspectroscopie Raman. Ils ont reconstruit les cartographies Raman pour trois décalages Raman spécifiques : 753 cm^{-1} (cytochrome C), 1686 cm^{-1} (protéines) et 2852 cm^{-1} (lipides). Ils observent que les hépatocytes présentent une forte quantité de cytochrome C associée aux mitochondries (**figure 18A**). Pour les discriminer de manière plus précise, ils se sont intéressés aux différences spectrales correspondant aux noyaux dans la zone biologique du spectre par une analyse en composantes principales (ACP). Ils constatent que le marqueur discriminant pour ces trois lignées correspond au cytochrome C (1583 cm^{-1}) ainsi qu'aux protéines (Amide I : 1660 cm^{-1}) (**figure 18B**). Suite aux traitements par l'ACP, ces trois lignées sont bien distinctes en fonction de CP1-CP2 (**figure 18C**) (Ichimura *et al.*, 2014).

D'autres études se sont portées sur la caractérisation des ilots de Langerhans destinés à la transplantation pour des patients atteints de diabète de type I. Pour cela, il a fallu connaître le spectre Raman des différentes hormones pancréatiques (glucagon, insuline) (**figure 19A**).

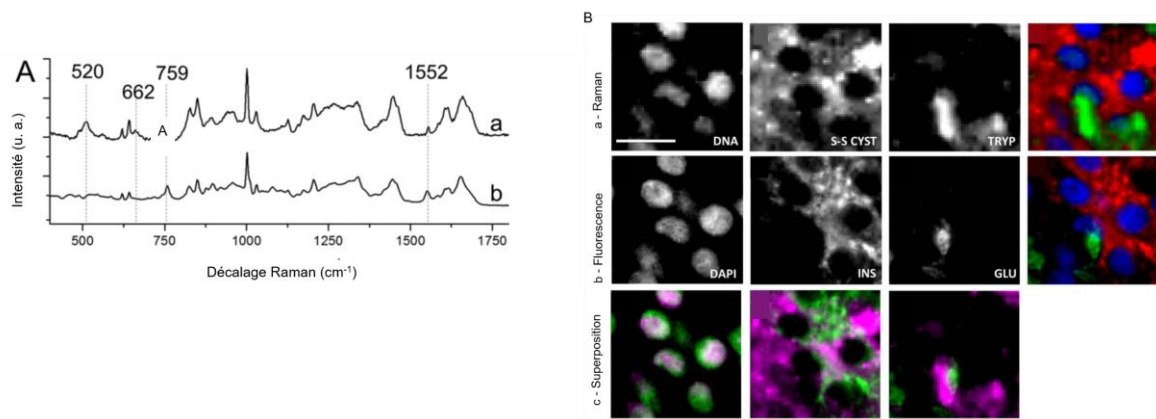


Figure 19 : Détection de l'insuline et du glucagon dans des cellules de Langerhans par microspectroscopie Raman.

(A) Spectre Raman de (a) l'insuline et du (b) glucagon dans la zone d'empreinte biologique ($400\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$). (B) Cartographie (a) Raman de coupe d'îlots de Langerhans pour les décalages Raman correspondant à l'ADN (783 cm^{-1}), à l'insuline (pont disulfure à 520 cm^{-1}) et au glucagon (tryptophane à 1545 cm^{-1}) ainsi que la superposition des trois décalages Raman avec l'ADN (bleu), l'insuline (rouge) et le glucagon (vert). En parallèle, (b) un marquage fluorescent correspondant spécifiquement à l'ADN (DAPI), et un immunomarquage de l'insuline (INS) et du glucagon (GLU) ont été réalisés ainsi que la superposition des marquages avec l'ADN (bleu), l'insuline (rouge) et le glucagon (vert). (c) superpositions des cartographies Raman et des marquages fluorescents. D'après Hilderink *et al.*, 2013.

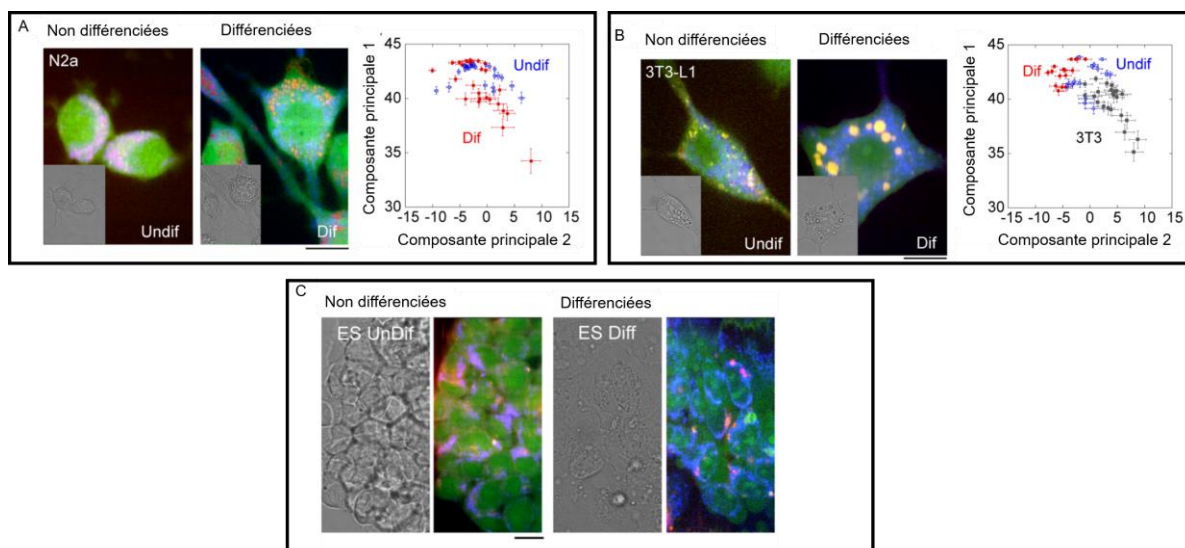


Figure 20 : Observation de la différenciation de trois lignées cellulaires.

(A) Cellules de neuroblastome de souris (N2a) différenciées en cellules neuronales, (B) fibroblastes (3T3-L1) en cellules adipocytaires, et (C) cellules souches embryonnaires (ES) en ES Diff. Pour chaque condition, les cartographies Raman avant et après différenciation sont représentées et reconstruites pour trois décalages Raman : cytochrome C en bleu (753 cm^{-1}), protéines en vert (1686 cm^{-1}) et lipides en rouge (2852 cm^{-1}) avec pour A et B une analyse en composantes principales sous forme de plot en fonction de CP1 et CP2. D'après Ichimura *et al.*, 2014.

Le glucagon possède deux signaux Raman spécifiques : 759 cm^{-1} et 1552 cm^{-1} (associés au tryptophane) ; l'insuline possède également des bandes caractéristiques telles que la bande à 520 cm^{-1} correspondant aux vibrations des ponts disulfures (S-S) et des vibrations de déformations (C-S) à 662 cm^{-1} . Grâce à ces différences spectrales, on discrimine les cellules alpha sécrétant le glucagon des cellules bêta sécrétant l'insuline (**figure 19B**) (Hilderink *et al.*, 2013).

2. Mise en évidence de processus biologiques

Quelques années après les études présentées précédemment, de nombreux auteurs se sont intéressés à divers processus biologiques avec l'objectif de remplacer les technologies classiques de la biologie qui requièrent très souvent des colorations et/ou des marquages préalables par la microspectroscopie vibrationnelle qui ne requiert pas l'utilisation de colorant.

Après avoir montré la capacité de la microspectroscopie Raman à suivre la différenciation cellulaire de trois lignées (**figure 18**), Ichimura *et al.* mettent en évidence une augmentation des vésicules lipidiques ainsi que du cytochrome C dans le cytoplasme. Pour chaque condition, grâce à une ACP, les populations cellulaires non différenciées et différenciées se distinguent clairement (**figure 20**) (Ichimura *et al.*, 2014).

De même, une étude utilisant la microspectroscopie CARS multiplexe a permis de caractériser le devenir de cellules souches mésenchymateuses (**figure 21A**) en deux types de cellules distinctes : cellules adipogéniques ou cellules ostéogéniques. Après acquisition des cartographies CARS, l'utilisation d'un traitement proche de la MEM révèle lors de la différenciation en cellules adipogéniques, un signal spécifiquement retrouvé à 2860 cm^{-1} indiquant la présence de gouttelettes lipidiques (**figure 21B**), signal absent dans les cellules ostéogéniques.

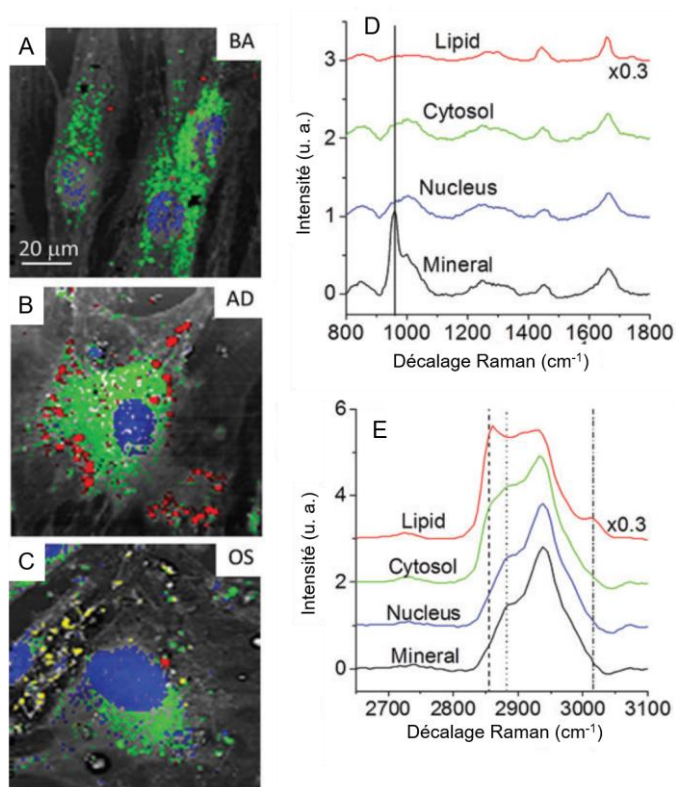


Figure 21 : Mise en évidence de la différenciation de cellules souches mésenchymateuses.

Une analyse par la microspectroscopie CARS multiplexe suivie d'un traitement par la méthode de l'entropie maximum de (A) cellules souches mésenchymateuses, (B) ces mêmes cellules mises en différenciation adipogénique ou (C) en différenciation ostéogénique. Les cartographies sont reconstruites pour 4 décalages Raman : Le noyau en bleu (2950 cm^{-1} - 2850 cm^{-1}), le cytoplasme en vert, les gouttelettes lipidiques en rouge (2860 cm^{-1}) et les cristaux en noir (955 cm^{-1}). Pour chaque condition, un spectre de chaque compartiment cellulaire est représenté (D) dans la zone d'empreinte biologique (800 - 1800 cm^{-1}) et (E) dans la zone CH (2600 - 3100 cm^{-1}). D'après Lee *et al.*, 2014.

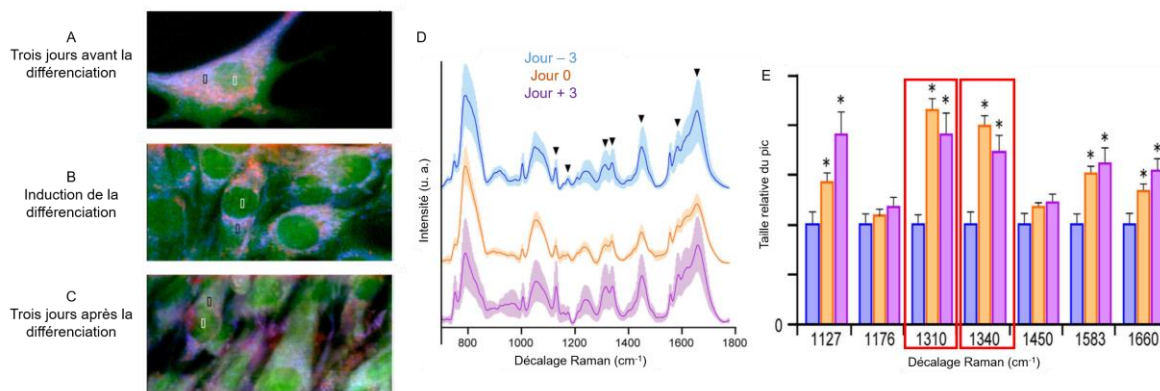


Figure 22 : Etude de la différenciation myogénique par la microspectroscopie Raman.

Des myoblastes (cellules de la lignée C2C12) sont analysés à (A) trois jours avant l'induction de la différenciation, (B) lors de l'induction de la différenciation et (C) trois jours après l'induction de la différenciation. Les cartographies montrent en bleu le cytochrome C (753 cm^{-1}), en vert les protéines (1004 cm^{-1}) et en rouge les lipides (2852 cm^{-1}). (D) Spectres moyens Raman du noyau pour chaque condition (trois jours avant la différenciation : bleu, le jour de la différenciation : orange et trois jours après la différenciation : violet) dans la zone d'empreinte biologique (700 - 1800 cm^{-1}). (E) Intensité relative de 7 décalages Raman en fonction des différentes conditions (pics pointés par des têtes de flèche en D). D'après Ichimura *et al.*, 2015.

En différenciation ostéogénique, un signal apparaît à 955 cm^{-1} , correspondant à la présence de cristaux de minéraux d'hydroxyapatite (**figure 21C**). Ainsi, les auteurs montrent la capacité de la microspectroscopie CARS à identifier le devenir des cellules engagées en différenciation (Lee *et al.*, 2014).

Sur la base des signaux associés aux cytochrome C, aux protéines et aux gouttelettes lipidiques, il est possible d'identifier des cellules de la lignée murine C2C12 s'engageant dans la différenciation myogénique (**figure 22**). Le processus de différenciation induit une augmentation d'intensité des trois signaux. Dans le but de mieux caractériser cette différenciation myogénique, l'intensité des signaux associés à sept autres décalages Raman a été quantifiée (**figure 22D**). Les auteurs observent une augmentation significative de la taille de deux d'entre eux en comparant les différents temps ; ils sont associés aux acides nucléiques (1127 cm^{-1}) et au cytochrome C (1310 cm^{-1}). Concernant les autres pics, ils constatent que leur intensité augmente au cours de la différenciation, mais de manière non significative (**figure 22E**). Ces résultats montrent que la microspectroscopie Raman peut être utilisée pour suivre la myogenèse *in vitro* (Ichimura *et al.*, 2015).

Parmi les nombreux processus cellulaires, l'apoptose est un des mécanismes les plus connus. Une première étude s'est focalisée sur le stress généré à des fibroblastes par un traitement au glyoxal. Après l'analyse des cellules par microspectroscopie Raman et un traitement des données par clustering, les auteurs observent une diminution des vésicules lipidiques et une accumulation d'ARN et de corps d'inclusion pour les cellules traitées avec le glyoxal (**figure 23B**). Les résultats sont quasi identiques à ceux obtenus par l'analyse de cellules identifiées comme apoptotiques (**figure 23B**). Les auteurs en concluent que le glyoxal induirait un stress cellulaire pouvant conduire à la mort de la cellule par apoptose (Krafft *et al.*, 2006).

Une étude récente s'est intéressée à observer le processus apoptotique en utilisant la microspectroscopie CARS multiplexe. L'induction de l'apoptose (par du plasma activé) entraîne une diminution drastique des gouttelettes lipidiques comparée aux cellules témoin (**figure 24**). (Furuta *et al.*, 2017).

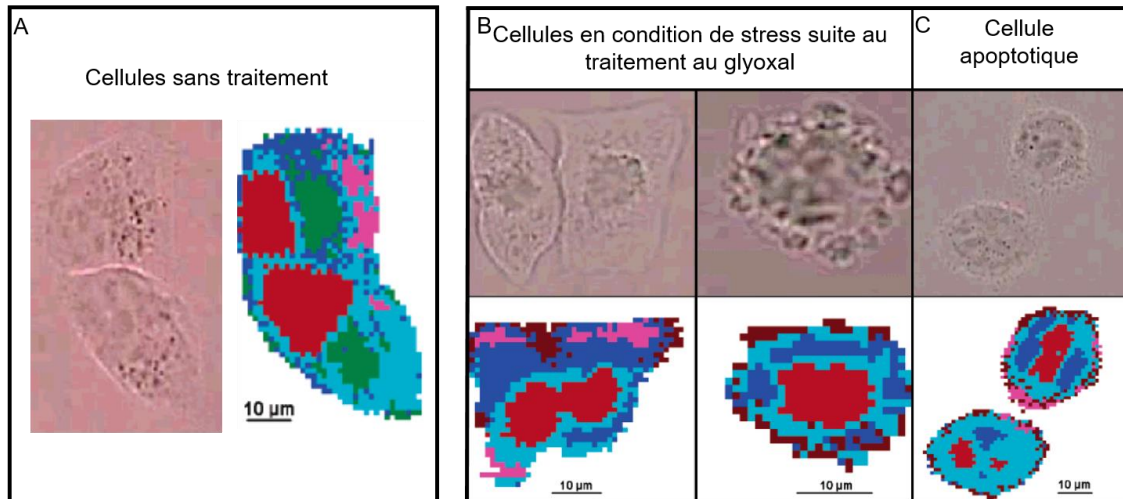


Figure 23 : Analyse de fibroblastes pulmonaires par la microspectroscopie Raman. Cartographie Raman suivie d'un traitement par le clustering *k*-mean de fibroblastes (A) sans traitement, (B) traités par le glyoxal (1 mM - 24 h), (C) en apoptose. Noyau en rouge, cytoplasme en bleu clair et bleu foncé, vésicules en vert et inclusions cytoplasmiques en magenta. D'après Krafft *et al.*, 2006.

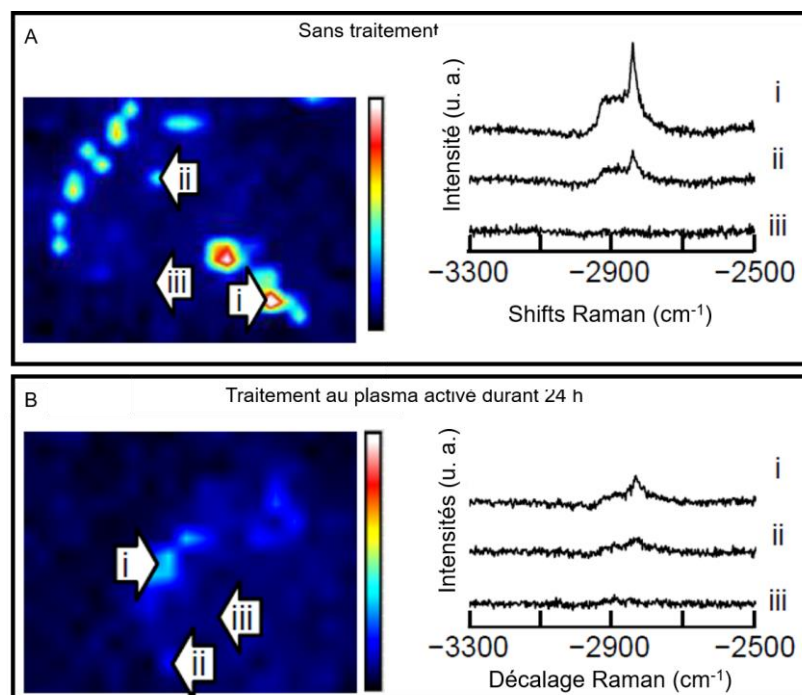


Figure 24 : Mise en évidence de l'apoptose suite à un traitement avec du plasma activé par la microspectroscopie CARS multiplexe.

Des cellules HeLa sont analysées (A) sans ou (B) avec traitement au plasma activé (PAM) durant 24 h dans la zone CH (2500-3300 cm^{-1}). Les cartographies sont retracées pour visualiser les lipides (2845 cm^{-1}). Pour chaque condition, les cartographies CARS sont montrées ou les zones rouges correspondent à une forte intensité et les zones bleue/noire à une absence du pic à 2845 cm^{-1} . Les spectres de trois zones spécifiques sont tracés avec (i) : une zone de forte intensité, (ii) : une zone de faible intensité et (iii) : une zone sans intensité. D'après Furuta *et al.*, 2017.

Plus récemment, des cartographies CARS dans la zone CH pour visualiser les lipides (2840 cm^{-1}) et les protéines (2930 cm^{-1}) mettent en évidence la transformation/activation des cellules microgliales en type M1, lors d'une infection bactérienne (**figure 25**). Une augmentation de lipides et de protéines est observée après induction de l'infection. Elle coïncide avec la synthèse *de novo* d'acides gras et de protéines participant aux interactions intracellulaires, à des modifications de la morphologie et à la mobilité cellulaire, réactions de protection face à l'infection (Dessai *et al.*, 2018).

Les études réalisées par la microspectroscopie Raman, et plus récemment par la microspectroscopie CARS, pour identifier des compartiments cellulaires ou bien pour mettre en évidence divers processus biologiques apportent des informations importantes afin de s'orienter vers l'analyse des cellules « anormales », en particulier les cellules tumorales (identification, détection, ...) et leur comportement vis-à-vis des traitements anti-tumoraux.

3. Détection de cellules tumorales

Le diagnostic de cancers représente une perspective ambitieuse concernant les applications de la microspectroscopie vibrationnelle. Les études dans ce domaine sont relativement récentes (depuis 2005 pour la microspectroscopie Raman et 2010 pour la microspectroscopie CARS).

a. Processus cancéreux

Le processus cancéreux, ou cancérogenèse, correspond à l'étape initiale de la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse, jusqu'à dissémination à partir de la tumeur primaire de cellules cancéreuses dans l'organisme pour former des tumeurs secondaires (métastases). Ainsi, le processus cancéreux est subdivisé en trois phases (**figure 26**):

- L'étape d'initiation débute lorsque le génome de la cellule subit des altérations. Ces modifications génomiques vont faire que la cellule initiatrice pourra échapper aux différents systèmes de contrôle du cycle cellulaire ;

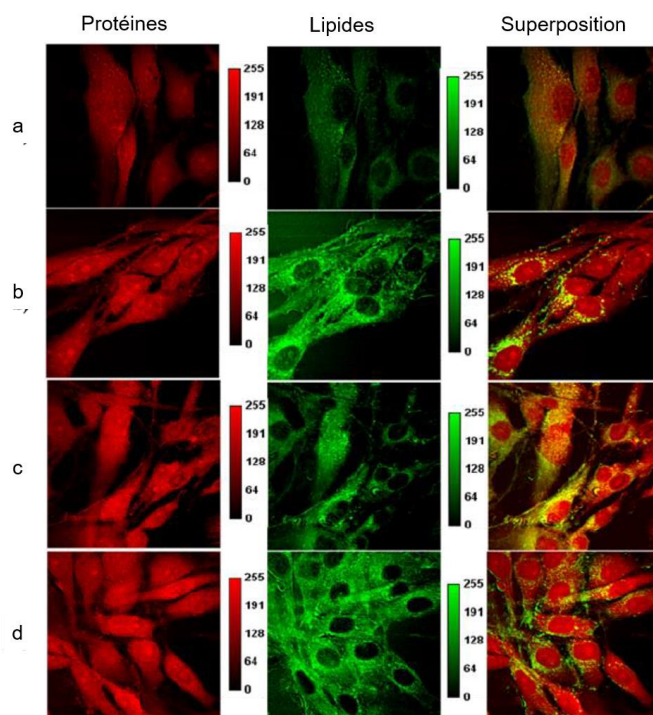


Figure 25 : Observation de l'activation des cellules de la microglie suite à un traitement avec des lipopolysaccharides (LPS) par la microspectroscopie CARS.

Des cellules microgliales (a) sans traitement ou traitées pendant (b) 4 heures, (c) 6 heures et (d) 24 heures avec des LPS. Pour chaque condition, les cartographies CARS sont représentées avec les protéines en rouge (2930 cm^{-1}), les lipides en vert (2840 cm^{-1}). La superposition des deux cartographies est également effectuée. D'après Dessai *et al.*, 2018.

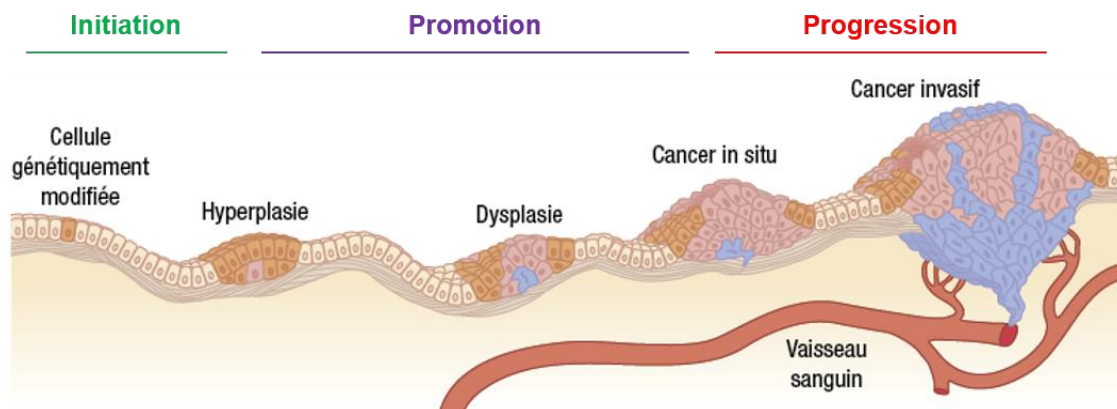


Figure 26 : Les différentes étapes d'évolution d'un cancer.

Les étapes d'initiation (vert), de promotion (violet) et de progression tumorale (rouge) sont montrées. D'après Duee *et al.*, 2011.

- L'étape de promotion est la suite directe de l'étape d'initiation. Elle correspond à la capacité des cellules porteuses des modifications génomiques à proliférer rapidement. Cette expansion clonale conduit à la formation d'une tumeur primaire, composée de cellules identiques à la cellule initiatrice. Cette étape est un processus relativement long ;
- L'étape de progression sera la dernière qui permettra la vascularisation de la tumeur (angiogénèse) permettant aux cellules cancéreuses de migrer de leur site primaire vers d'autres sites de l'organisme. Ce sera la formation de métastases. (Duee *et al.*, 2011).

Durant chaque étape du processus cancéreux, les cellules tumorales voient leur profil d'expression génique modifié suite à des modifications de l'état de la chromatine. Cette évolution de l'expression et de la répression de gènes permet aux cellules cancéreuses d'acquérir de nouvelles propriétés comme : un potentiel de réplication quasi illimité (augmentation de la prolifération cellulaire), une dérégulation de leur métabolisme (contribuant à des résistances aux chimiothérapies), une capacité d'invasion (favorisant la formation de métastase),... **(figure 27)**.

Parmi ces nombreux facteurs, la modification du métabolisme cellulaire constituerait un élément majeur pour identifier une cellule cancéreuse (Hanahan and Weinberg, 2011). De ce fait, le métabolisme lipidique des cellules cancéreuses a été grandement étudié par microspectroscopie vibrationnelle.

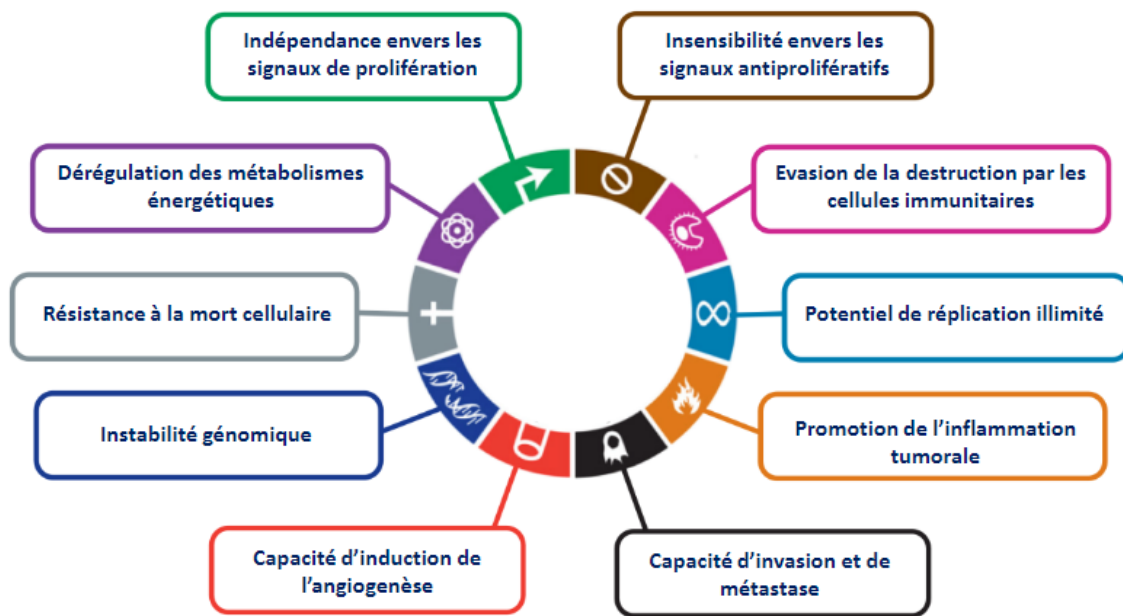


Figure 27 : Liste non exhaustive des caractéristiques pouvant acquérir les cellules cancéreuses au cours du processus tumoral. D'après Hanahan and Weinberg, 2011.

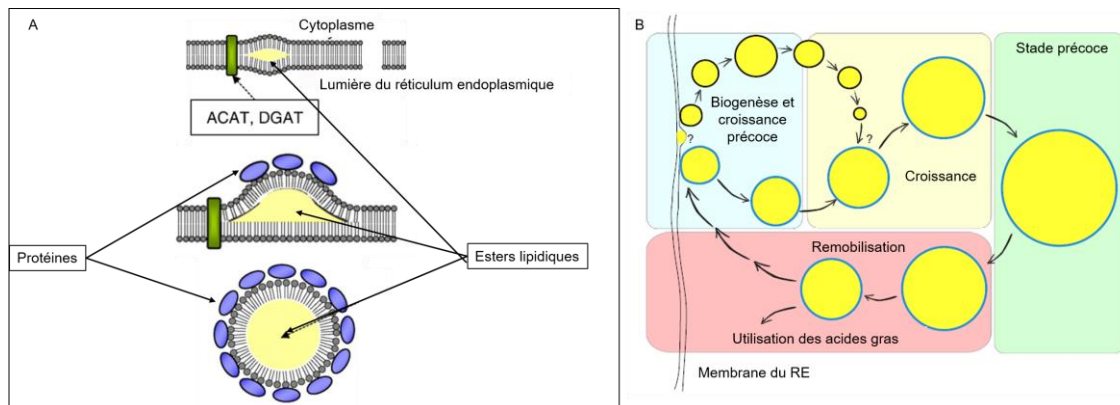


Figure 28 : Étapes de la biogenèse d'une gouttelette lipidique.

(A) Les enzymes participant à la synthèse d'esters lipidiques (l'acyl-CoA:cholestérol acyltransférases (ACAT) et l'acyl-coenzyme A: diglycérol acyltransférases (DGAT), présentes sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), provoquent une accumulation de lipides neutres entre les deux feuillets du RE. A force d'accumulation, la membrane du RE bourgeoise et libère dans le cytoplasme des gouttelettes lipidiques composées d'une monocouche de phospholipides enveloppant des protéines et des esters de lipides. (B) Une fois formées, les gouttelettes lipidiques de petits volumes fusionnent ce qui augmente leur volume. Les gouttelettes peuvent rester dans le cytoplasme ou alors être dégradées pour que les acides gras puissent être utilisés par la cellule. D'après Thiam and Beller, 2017 ; Ohsaki *et al.*, 2009.

b. Métabolisme lipidique et cancer

Toute cellule a besoin d'un réservoir intracellulaire de lipides pour le renouvellement des phospholipides membranaires, la compartimentation intracellulaire, voire la génération d'énergie sous forme d'ATP,... La formation des gouttelettes lipidiques commence au niveau du réticulum endoplasmique où des lipides neutres s'accumulent au niveau des deux feuillets membranaires. Cette accumulation aboutit à la formation d'un bourgeon lipidique qui se décroche du réticulum endoplasmique, provoquant la libération de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme de la cellule (**figure 28A**). Par la suite, les petites gouttelettes fusionnent entre elles pour augmenter leur diamètre. La taille des gouttelettes lipidiques varie selon les cellules étudiées allant de 10 nm à presque 100 nm de diamètre (Thiam and Beller, 2017, Ohsaki *et al.*, 2009) (**figure 28B**).

Les gouttelettes lipidiques sont constituées d'une monocouche de phospholipides qui enferme des lipides neutres, principalement des triglycérides et des esters de stérols (Yu *et al.*, 2014; Zumbusch *et al.*, 2013, Giroud, 2015) (**figure 29**). La composition en acides gras des gouttelettes varie en fonction des cellules étudiées. Par exemple, les cellules présentes dans le tissu adipeux blanc contiennent majoritairement des triacylglycérides et les cellules non adipeuses majoritairement des ester de cholestérol (Ohsaki *et al.*, 2009). Les gouttelettes lipidiques sont composées majoritairement de triglycérides, constitués de trois chaînes d'acides gras saturés ou non pouvant contenir chacune entre 14 et 24 carbones, et de phospholipides avec deux chaînes d'acides gras.

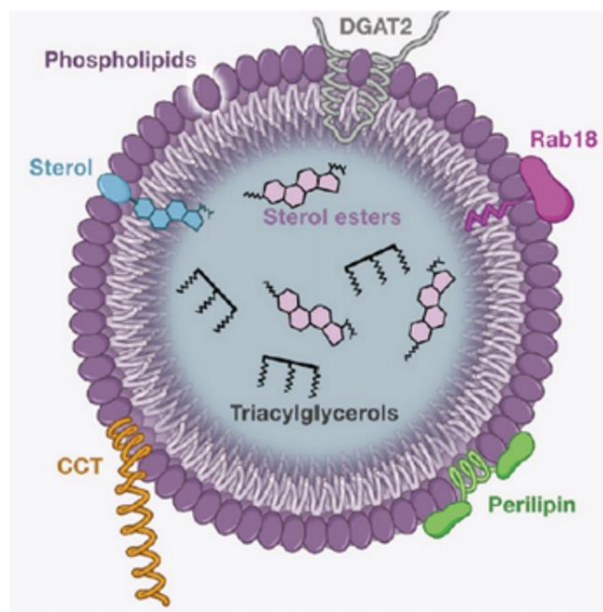


Figure 29 : Composition d'une gouttelette lipidique.

Une monocouche de phospholipides présentant des protéines (perilipin, DGAT2, CCT, RAB18, ...) contient des lipides neutres en son centre (majoritairement triglycérides). D'après Giroud, 2015.

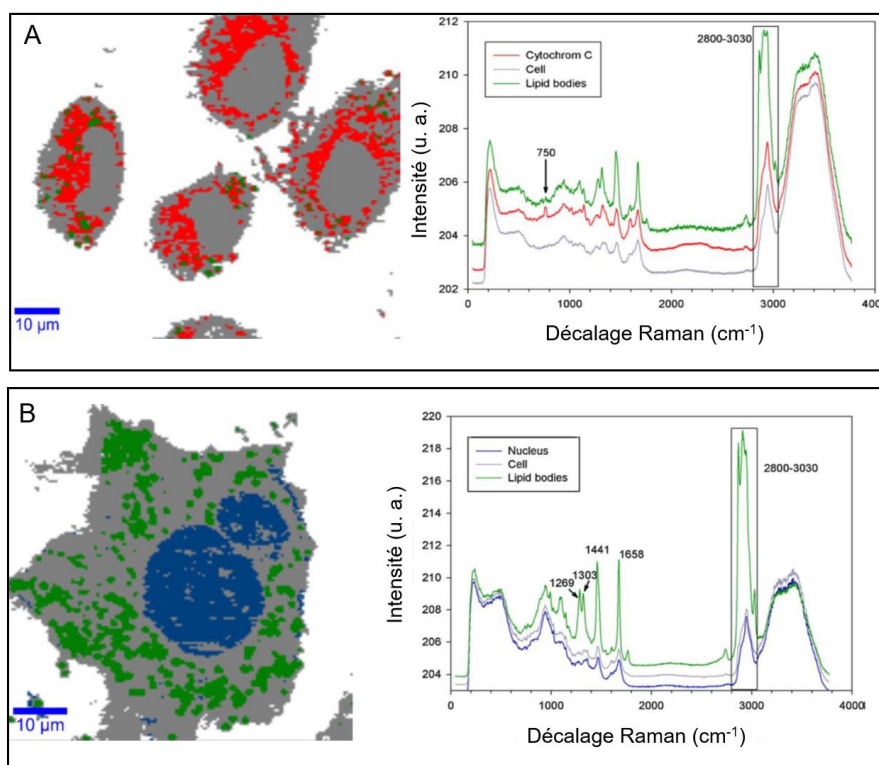


Figure 30 : Évaluation de la quantité de gouttelettes lipidiques dans des cellules cancéreuses colorectales par la microspectroscopie Raman.

Cartographie Raman suivie d'un traitement par clustering des cellules saines colorectales (A) et d'une cellule de cancer colorectal (B) sur la plage spectrale de 0-3750 cm^{-1} . Pour chaque condition, les cartographies sont retracées pour 3 clusters correspondant au cytochrome C (rouge), aux gouttelettes lipidiques (vert), et au reste de la cellule (gris) ; les spectres moyens de chacun d'eux sont encadrés. D'après Scalfi-Happ *et al.*, 2011.

Il y a donc, au sein d'une petite zone dans le cytoplasme, un grand nombre de répétition de liaisons chimiques identiques dont la capacité vibratoire est importante. Ainsi, de nombreuses études utilisant les technologies vibrationnelles se sont intéressées à caractériser des cellules cancéreuses, voire même des grades de cancers, en fonction de la quantité de gouttelettes lipidiques et de leurs compositions en acides gras (Abramczyk *et al.*, 2015). Ainsi, il a été mis en évidence que lors du processus cancéreux, le métabolisme lipidique augmente, ce qui se traduit par la présence de gouttelettes lipidiques. Ces dernières peuvent être considérées comme des biomarqueurs et sont plutôt en lien avec un mauvais pronostic (Tirinato *et al.*, 2017).

Au vu du rôle primordial des gouttelettes lipidiques dans le processus cancéreux et de leur capacité d'avoir une signature vibrationnelle très forte, de nombreuses études se sont focalisées sur cet aspect des cellules cancéreuses permettant leur identification.

c. Métabolisme lipidique, microspectroscopie vibrationnelle et cancer

Une étude effectuée en 2011 a permis de comprendre les différences notables concernant la présence de gouttelettes lipidiques entre des cellules saines et des cellules de cancers colorectaux par la microspectroscopie Raman. Les cartographies réalisées sur la globalité du spectre Raman ont été traitées par clustering. Il apparaît que le cluster majoritaire dans le cas de cellules saines correspond au cytochrome C (750 cm^{-1}) (**figure 30A**) tandis que les cellules cancéreuses possèdent un cluster majoritaire associé aux lipides (1658 cm^{-1} , 1441 cm^{-1}), représentant les gouttelettes lipidiques (**figure 30B**). La quantification des signaux (nombre de pixel) met en évidence la présence de lipides dans chaque type cellulaire. Ainsi, dans les cellules saines, les gouttelettes lipidiques représentent 1,8 % des lipides totaux contre 13,8 % pour les cellules cancéreuses (soit 7,7 fois plus). Les auteurs en concluent que les cellules cancéreuses possèdent de fortes quantités de lipides intracellulaires utilisables comme biomarqueur cancéreux (Scalfi-Happ *et al.*, 2011).

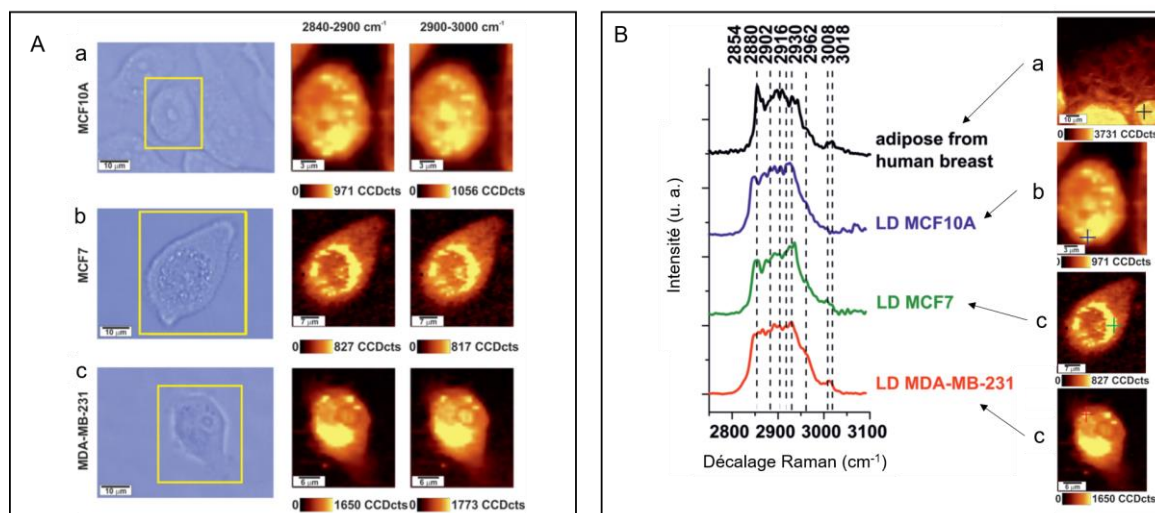


Figure 31 : Analyse des différents grades du cancer du sein par la microspectroscopie Raman.

(A) Trois lignées cellulaires mimant les différents grades du cancer sont cartographiées par la microspectroscopie Raman dans la zone CH (2600-3940 cm⁻¹) : (a) cellule non cancéreuse (MCF10A), (b) cellule modérément cancéreuse (MCF7) et (c) cellule hautement cancéreuse (MDA-MB-231). Pour chaque condition, une image en lumière blanche ainsi que les cartographies CARS correspondant au contenu lipidique (2840-2900 cm⁻¹) et protéique (2900-3000 cm⁻¹) sont présentées. (B) Comparaison des spectres Raman du contenu lipidique des gouttelettes provenant de quatre origines : (a) tissu adipeux sain mammaire, (b) MCF10A, (c) MCF7 et (d) MDA-MB-231, dans la zone CH (2700-3100 cm⁻¹). D'après Abramczyk *et al.*, 2015.

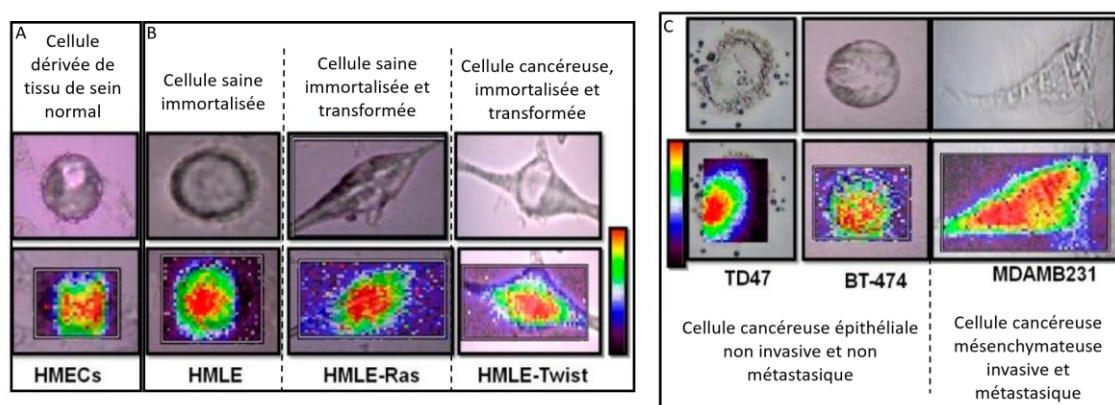


Figure 32 : Analyse par microspectroscopie Raman de sept lignées cellulaires représentant les différents grades du cancer du sein.

Les cartographies Raman sont réalisées dans la zone CH (2800-3050 cm⁻¹).

(A) Cellule saine (HMECs), (B) cellule saine immortalisée (HMLE), cellule saine immortalisée et transformée (HMLE-Ras) et cellule cancéreuse immortalisée et transformée (HMLE-Twist), (C) cellule cancéreuse épithéliale non invasive et non métastatique (TD47 et BT-474) et cellule cancéreuse mésenchymateuse invasive et métastatique (MDAMB231). Les fortes intensités apparaissent en rouge et les plus faibles en violet. D'après Chaturvedi *et al.*, 2016.

Des travaux conduits en 2015 à partir de cellules représentant les différents grades du cancer du sein (lignée cellulaire MCF10A non cancéreuse, lignée cellulaire MCF7 modérément cancéreuse et la lignée cellulaire MDA-MB-231 cancéreuse) avaient pour objectif de définir le rôle des gouttelettes lipidiques en lien avec le grade d'un cancer.

La réalisation pour chaque lignée de cartographies Raman dans la zone CH a permis de constater que les gouttelettes lipidiques augmentent dans les cellules cancéreuses et métastatiques comparées aux cellules saines (2844 cm^{-1} et 2906 cm^{-1}) avec une augmentation des protéines associées aux gouttelettes (**figure 31A**). L'augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques serait due à un accroissement du métabolisme lipidique, et serait corrélée à l'état agressif du cancer. De plus, une comparaison de la signature Raman dans la zone CH des gouttelettes avec celles provenant d'un tissu adipeux sain révèle des différences. Les gouttelettes provenant des trois lignées cancéreuses présentent majoritairement une forte quantité de triglycérides avec des acides linoléiques et oléiques, alors que dans celles du tissu adipeux les triglycérides possèdent des acides arachidoniques. Ainsi, ces travaux ont clairement montré que les cellules cancéreuses ont un métabolisme lipidique différant des cellules saines avec un changement de composition en acides gras (Abramczyk *et al.*, 2015).

En parallèle, Chaturvedi *et al.* ont réalisé des cartographies sur cellules de lignées saines (cultures primaires), immortalisées, transformées non invasives et invasives, elles mettent en évidence que les cellules immortalisées et transformées ont une quantité et une distribution de lipides relativement identiques entre elles (**figure 32B**) et plus importantes que celles des cultures primaires (**figure 32A**). Les auteurs constatent également une plus forte quantité de lipides intracellulaires pour les lignées invasives et métastatiques par rapport aux non invasives (Chaturvedi *et al.*, 2016).

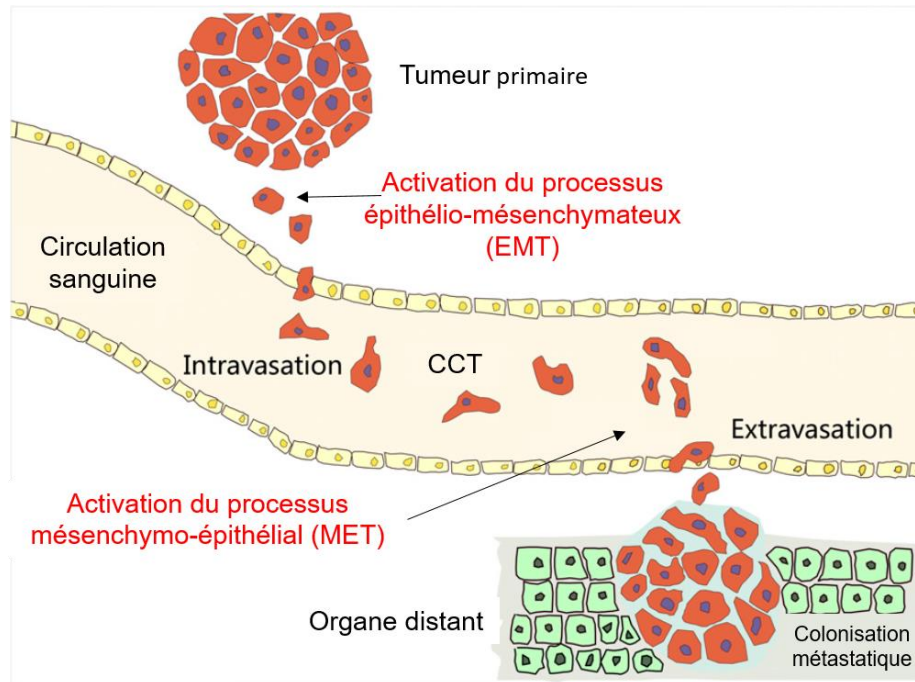


Figure 33 : Processus de génération de métastases par l'intermédiaire des cellules circulantes tumorales (CCT). D'après Wu et al., 2017.

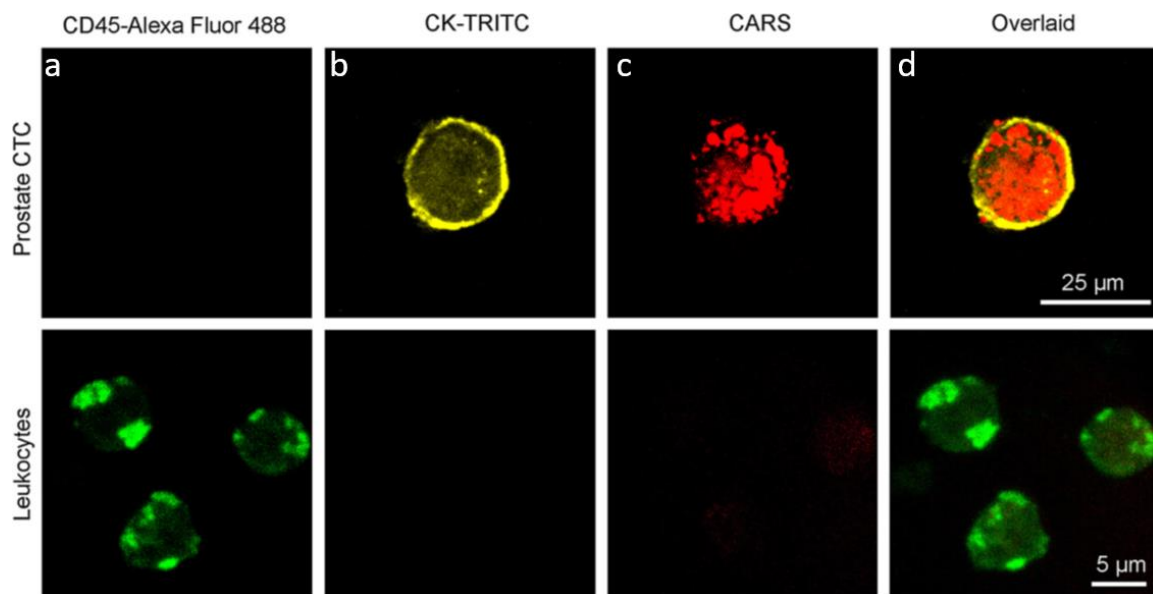


Figure 34 : Analyse du contenu lipidique de CCT et leucocytes sains (extrait de sang de patient atteint d'un cancer de la prostate).

(a) Immunomarquage du CD45 en vert, (b) marquage à la cytokératine (CK) en jaune (c) cartographie CARS retracé à 2840 cm^{-1} , en rouge, représentant les lipides et (d) superposition des trois marquages. D'après Mitra *et al.*, 2012a.

Suite à cette distinction de cellules cancéreuses et des différents grades en fonction du contenu lipidique, d'autres études se sont axées sur le devenir des tumeurs primaires et leur capacité à générer des métastases. Mitra *et al.* ont focalisé leur étude sur les cellules circulantes tumorales (CCT) à l'origine de la formation des métastases en se détachant de la tumeur primaire via la transition épithélio-mésenchymateuse. Elles passent par intravasation dans la circulation sanguine d'où elles sortiront (extravasation) pour former une métastase (Paoletti and Hayes, 2016; Wu *et al.*, 2017) **(figure 33)**. A l'heure actuelle, la caractérisation des CCT par les technologies classiques est laborieuse et compliquée. Dans une étude de 2012, les auteurs ont caractérisé par microspectroscopie CARS le niveau de gouttelettes lipidiques intracellulaire des CCT provenant de patients atteints d'un cancer de la prostate. Après cartographie CARS de cellules circulantes limitée au décalage Raman associé aux liaisons CH₂ (2840 cm⁻¹), les résultats montrent que les CCT possèdent une très forte quantité de lipides **(figure 34)** qui peut être considérée comme un biomarqueur cancéreux (Mitra *et al.*, 2012).

Des travaux ont concerné l'influence du régime alimentaire sur la génération de CCT. Des cellules cancéreuses de poumon (exprimant la GFP et la RFP pour leur traçabilité) sont injectées en sous-cutanée à des souris. Après la xénogreffe, une partie des souris a un régime alimentaire classique et l'autre un régime riche en graisse. Après 4 semaines de régime, les auteurs réalisent une numération des cellules GFP⁺ et RFP⁺ présentes dans le sang des souris. Ils observent que les souris ayant le régime « gras » ont plus de cellules doublement positives, donc de CCT **(figure 35A)**. Après isolement de ces cellules et analyse par microspectroscopie CARS, ils constatent que les CCT provenant de souris avec un régime hautement calorique possèdent une forte quantité de lipides intracellulaires **(figure 35B)** inclus dans un très faible nombre de gouttelettes (1 à 2 par cellules) mais de grand diamètre.

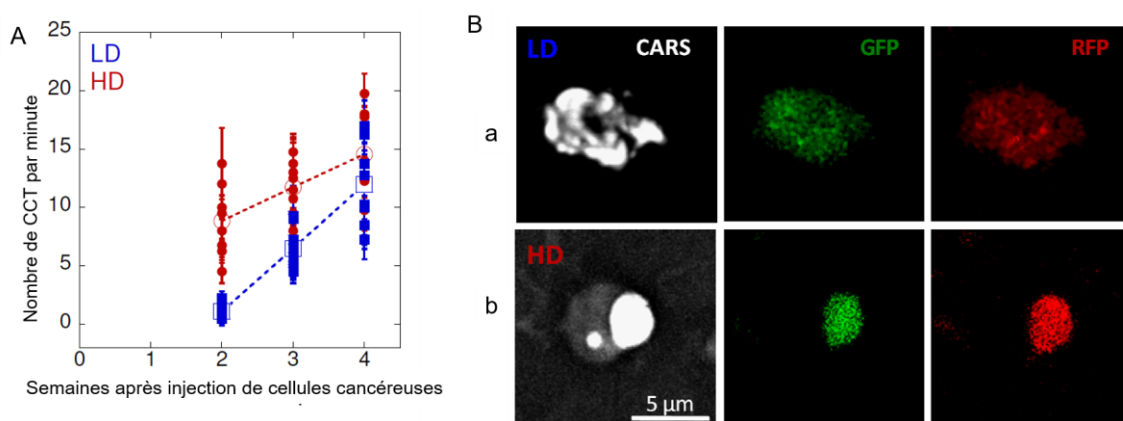


Figure 35 : Relation entre le nombre de CCT, leur contenu lipidique et le régime alimentaire.

(A) Dénombrement des cellules CCT (GFP⁺/RFP⁺) par cytométrie en flux intravitale réalisée au niveau d'une veine périphérique de souris soumises à une alimentation normale (LD) ou riche (HD) en lipides à 1, 2, 3 ou 4 semaines après xénogreffes de cellules cancéreuses (GFP⁺/RFP⁺). (B) Analyse de CCT (GFP⁺/RFP⁺) par microspectroscopie CARS à 2840 cm⁻¹ provenant (a) de souris ayant reçu une alimentation normale (LD) ou (b) riche en graisse (HD). D'après Le *et al.*, 2009.

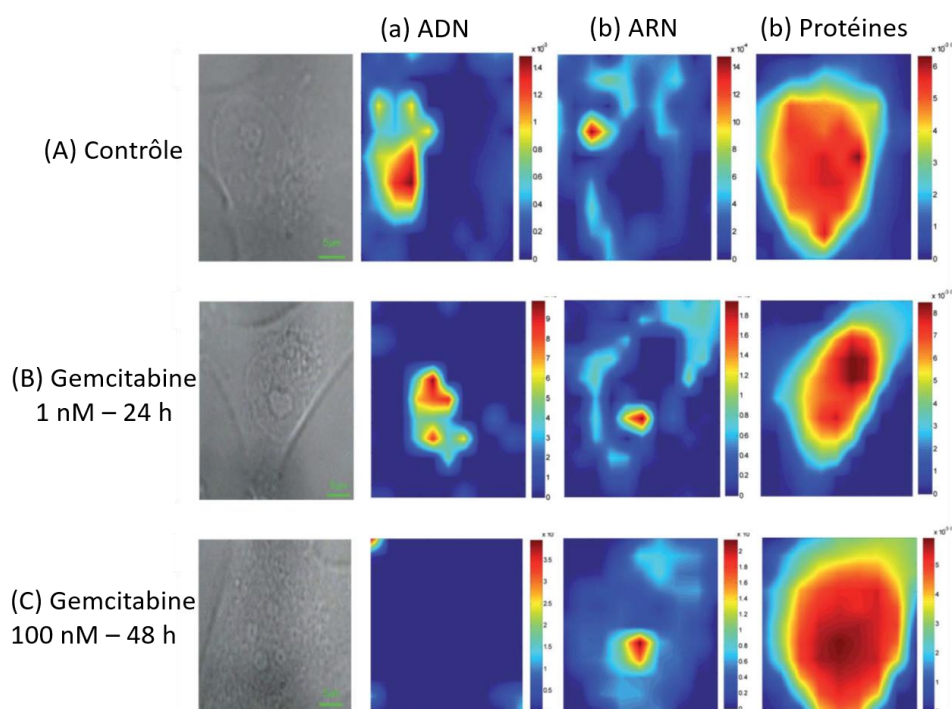


Figure 36 : Influence d'un traitement anticancéreux sur des cellules de cancer du poumon humain (lignée Calu-1).

Cartographie Raman d'une cellule Calu-1 (A) sans traitement, (B) traitée à la gemcitabine 1 nM pendant 24 h, (C) 100 nM pendant 48 h. Pour chaque condition, l'image en lumière blanche ainsi que les cartographies Raman mettent en évidence (a) l'ADN, (b) les ARN et (c) les protéines. D'après Draux *et al.*, 2011.

Ainsi, la microspectroscopie CARS apporte des informations sur l'agencement des lipides dans les CCT, et met également en évidence l'incidence de l'alimentation qui favoriserait l'incorporation de lipides dans les cellules cancéreuses (Le *et al.*, 2009).

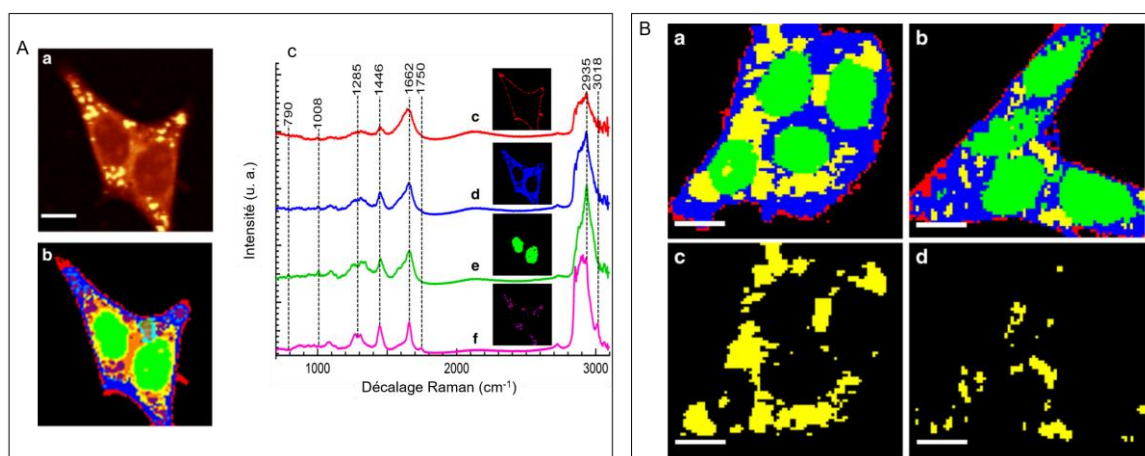
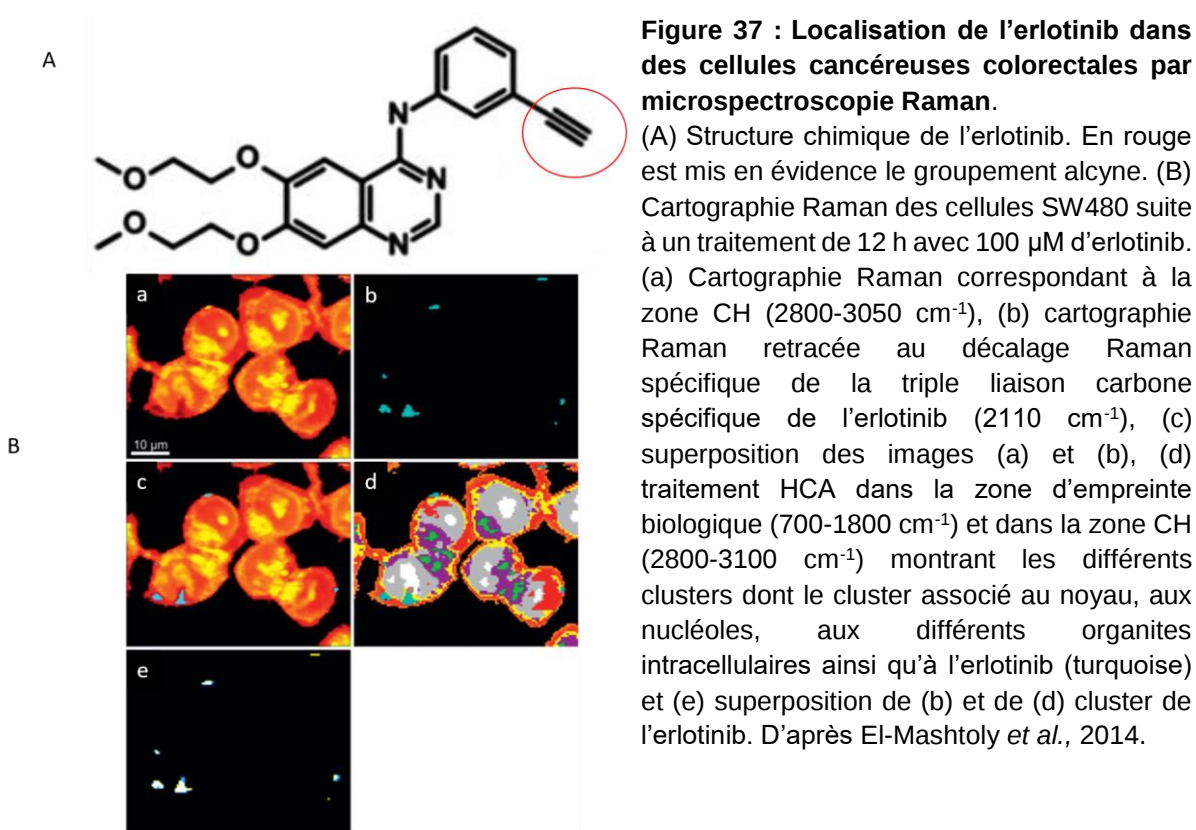
Toutes les études préalablement décrites et visant à analyser le contenu lipidique de cellules tumorales s'accordent à dire que l'état agressif et le faible pronostic de survie est à corrélérer à une forte quantité de lipides intracellulaires (Chaturvedi *et al.*, 2016).

d. Traitement anti-cancéreux et analyse vibrationnelle

Pouvoir analyser des cellules tumorales par microspectroscopie Raman offre de nombreuses applications comme par exemple évaluer l'effet de molécules antinéoplasiques.

Dès 2011 des chercheurs ont cartographié des cellules tumorales de poumon (Calu-1) traitées à la gemcitabine, un inhibiteur de la synthèse d'ADN. Ils constatent que suite au traitement, la contribution spectrale associée à l'ADN est grandement diminuée alors que celle des protéines augmente (**figure 36**). Malgré la faible résolution des cartographies présentées, il apparaît que la microspectroscopie Raman permet d'observer des changements biochimiques au sein de la cellule suite à un traitement anti-cancéreux (Draux *et al.*, 2011).

Les récepteurs membranaires comme le récepteur à l'EGF (EGFR) constituent également des cibles pour les traitements anti-tumoraux. Dans cette optique, une molécule inhibitrice de l'activation de l'EGFR, l'erlotinib est utilisée. En 2014, Samir F. El-Mashtoly *et al.* par microspectroscopie Raman ont évalué l'effet de l'erlotinib lors de traitement de cellules de la lignée colorectale SW480 qui exprime fortement ce récepteur. Cette molécule a une signature spécifique provenant d'un groupement alcyne terminal, dans la zone silencieuse du spectre Raman (entre 2085 et 2140 cm^{-1}) ce qui facilite sans ambiguïté sa localisation dans la cellule (**figure 37A**).



Après traitement des cellules, l'erlotinib se retrouve spécifiquement présent au niveau de la membrane plasmique, où se situe l'EGFR (El-Mashtoly *et al.*, 2014) (**figure 37B,c**).

Lors de traitement avec l'erlotinib sur des lignées de CCR dépourvues de mutation au niveau des gènes *KRAS* et *BRAF*, Yosef *et al.* observent une nette diminution des gouttelettes lipidiques comparée aux cellules sans traitement (**figure 38B**) alors que pour les cellules des lignées cancéreuses porteuses de mutations sur les gènes *KRAS* et *BRAF* le contenu lipidique demeure inchangé. Les auteurs en ont conclu qu'un traitement anti-cancéreux joue un rôle non négligeable sur le métabolisme lipidique, et que la présence de mutations sur certains gènes (*KRAS* et *BRAF*) induit une résistance aux traitements anti-cancéreux (Yosef *et al.*, 2015).

Une étude récente concerne l'action de 4 polyphénols dans le cas de traitements anti-cancéreux. Les polyphénols sont des molécules ayant des rôles bénéfiques sur diverses maladies comme les maladies inflammatoires, les maladies cardiovasculaires, voire certains cancers. Des cellules de tumeurs mammaires subissent des traitements avec un des 4 polyphénols puis sont analysées par microspectroscopie Raman. Les cartographies reconstruites suivant un ratio : $2851\text{ cm}^{-1}/1254\text{ cm}^{-1}$ (lipides/protéines) permettent de discriminer les lipides avec un fort rapport signal sur bruit. Une augmentation de lipides intracellulaires, correspondant à des gouttelettes lipidiques, est constatée lors de traitements avec chaque polyphénol (**figure 39**). Les traitements aux polyphénols induisent une accumulation rapide de gouttelettes lipidiques qui peuvent être considérées comme des biomarqueurs de stress cellulaires et donc d'apoptose, suite aux traitements (Mignolet *et al.*, 2018).

Au vu de ces différents exemples, on constate clairement qu'il a d'abord fallu identifier les signatures vibrationnelles correspondant aux différentes structures cellulaires avant de pouvoir analyser divers processus biologiques. Malgré cela, le cycle cellulaire, processus fondamental, n'a été que très peu étudié par la microspectroscopie vibrationnelle.

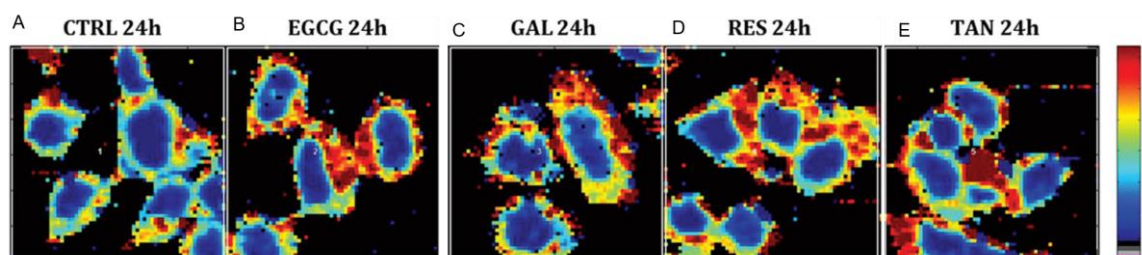


Figure 39 : Influence de traitement aux polyphénols sur des cellules de tumeurs mammaires. La cartographie Raman de la zone d'empreinte biologique ($600-1800\text{ cm}^{-1}$) représente le ratio $2851\text{ cm}^{-1}/1254\text{ cm}^{-1}$ (lipides/protéines) pour (A) cellules cancéreuses non traitées, (B) cellules cancéreuses traitées au gallate d'épigallocatechine (EGCG), (C) cellules cancéreuses traitées à l'acide gallique (GAL), (D) cellules cancéreuses traitées au resveratrol (RES) et (E) cellules cancéreuses traitées à l'acide tannique (TAN), durant 24 h. Les pixels représentés sur l'échelle de jaune à rouge montrent la présence de lipides et ceux représentés du vert à bleu montrent la présence de protéines. D'après Mignolet *et al.*, 2018.

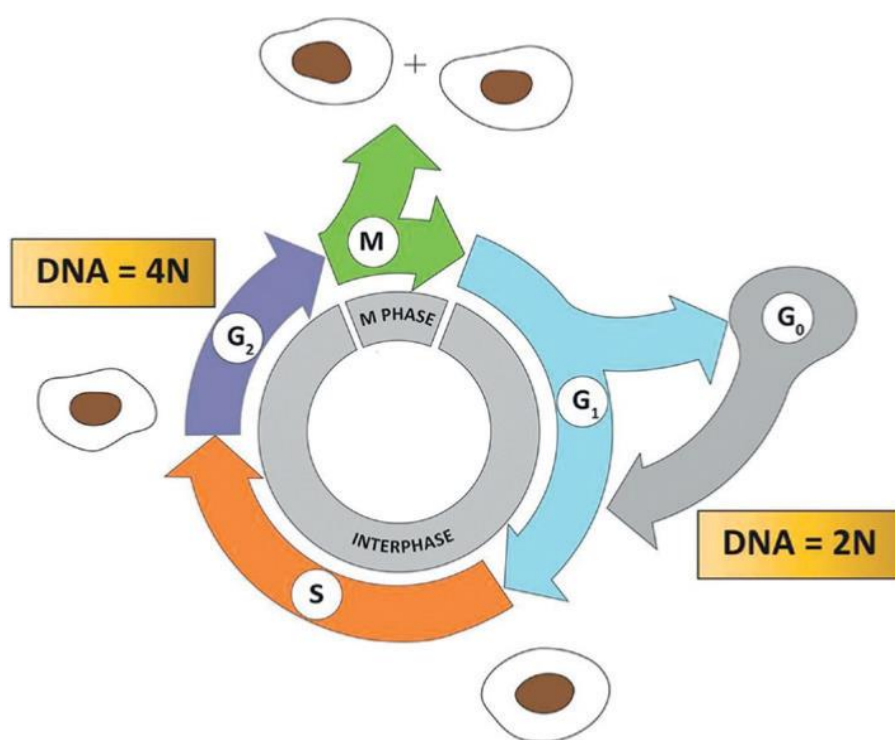


Figure 40 : Avancement d'une cellule dans le cycle cellulaire

La cellule passe respectivement par les phases G1, S, G2 et la mitose pour la générer deux cellules filles ; alors que la phase G0 est la phase de quiescence. D'après Yang, 2012.

V. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus associé à la prolifération cellulaire au cours duquel la cellule duplique son information génétique qui sera ensuite répartie équitablement lors de la division entre les deux cellules filles. Ces dernières seront obligatoirement identiques, pouvant être considérées comme des clones cellulaires. Au regard d'un organisme adulte entier, il n'y a que très peu de cellules qui entrent dans le cycle cellulaire, la majorité des cellules sont considérées comme « dormantes », c'est-à-dire non prolifératives. Les cellules dormantes sont généralement des cellules différenciées comme les neurones voire les hépatocytes. Mais l'aspect de « repos cellulaire » se trouve aussi pour des cellules souches telles que les cellules souches hématopoïétiques, musculaires, intestinales, ... (Oki *et al.*, 2015). Ces dernières seront sensibles à des signaux extérieurs, comme des facteurs de croissance, pour permettre leur retour dans le cycle cellulaire. Elles sont considérées comme des cellules de « réserve » (Williams and Stoeber, 2012). Ces cellules sont dans la phase dite G0 ou phase de quiescence hors du cycle cellulaire (**figure 40**). Cependant elles pourront réintégrer le cycle cellulaire pour permettre la régénération du tissu qui les contient si celui-ci subit des dommages.

1. Les étapes du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se scinde en deux étapes majeures : l'interphase correspondant à la réplication de l'ADN et au doublement des constituants cellulaires, et la mitose au cours de laquelle il y a une répartition identique des chromosomes entre les deux cellules filles, et équitable des autres constituants cellulaires. Chaque grande étape est constituée de sous étapes distinctes.

a. Interphase

L'interphase est l'étape la plus longue du cycle cellulaire. Elle est composée de 3 sous étapes (Harper and Brooks, 2004; Williams and Stoeber, 2012) (**figure 40**) :

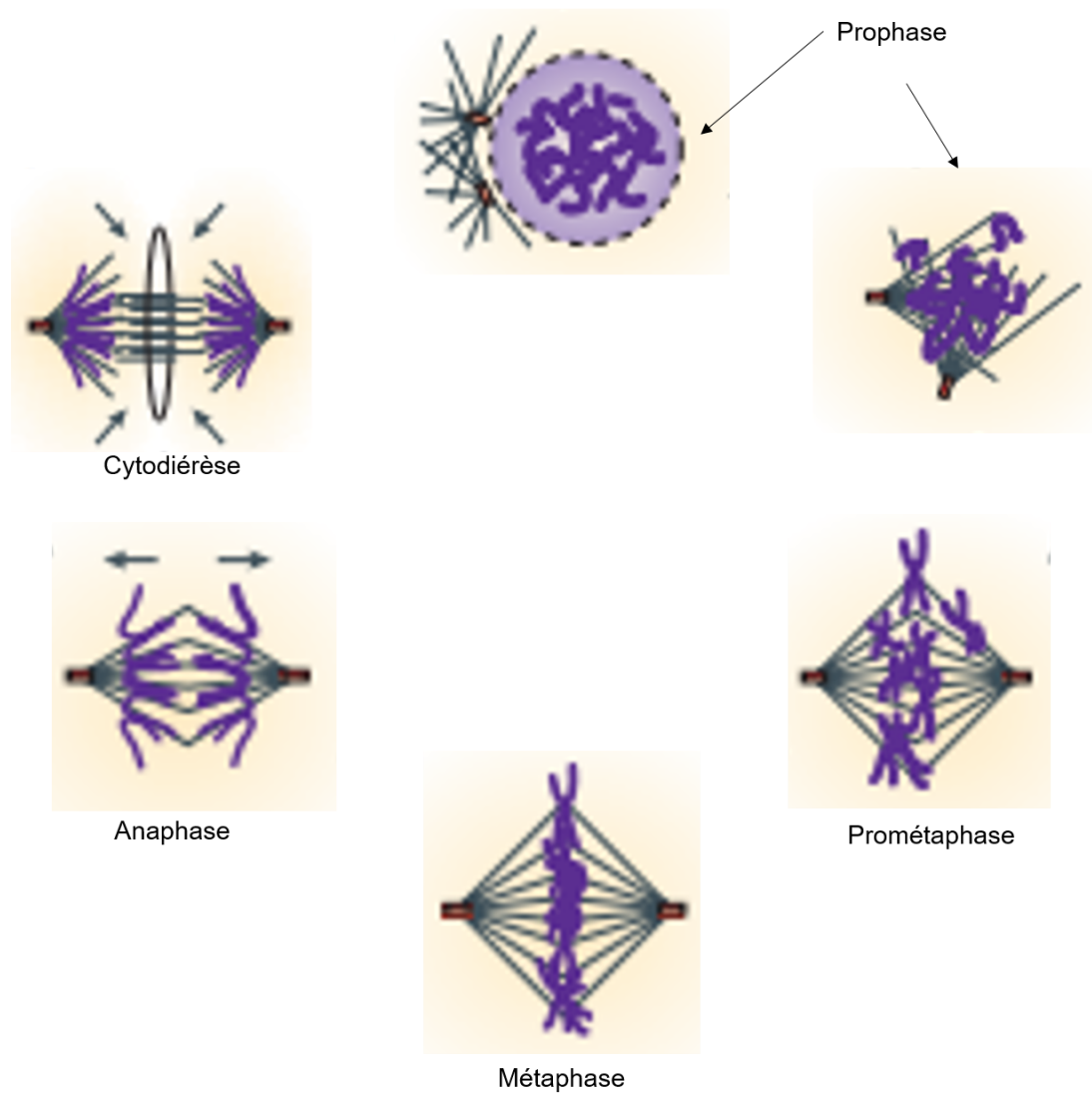


Figure 41 :Représentation de l'organisation des chromosomes

Les chromosomes (bleu), les centrosomes (rouge) et les microtubules (gris) sont présent durant chaque étape de la mitose. D'après Jackson *et al.*, 2007.

- Phase de croissance cellulaire (G1) : Étape de synthèse des protéines nécessaires pour la suite du cycle cellulaire, elle s'accompagne d'un accroissement du volume cellulaire ;
- Phase de synthèse (S) : Étape de réplication du matériel génétique de la cellule. Elle est cruciale et relativement longue car la réplication doit être fidèle et surtout doit éviter les mutations. Le centrosome (Centre Organisateur des Microtubules ; COMT) se duplique également au cours de cette phase ;
- Phase de préparation à la division cellulaire (G2) : La cellule synthétise les protéines en vue de se préparer à la division cellulaire. En parallèle, un contrôle « qualité » est réalisé pour s'assurer de la bonne réplication de l'ADN.

b. Mitose

La mitose est la phase du cycle cellulaire la plus courte (1 à 2h). Elle se divise en 5 sous phases (**figure 41**) :

- La prophase : Étape de condensation de la chromatine grâce à des protéines spécifiques, les condensines. En fin de prophase, l'enveloppe nucléaire est déstructurée et se retrouve sous la forme de vésicules. À ce stade chaque chromosome possède deux chromatides. Parallèlement, les centrosomes migrent à chaque pôle de la cellule et commencent à assurer leur fonction de COMT ;
- La prométaphase : À partir du COMT, les microtubules kinétochoriens irradiant dans la cellule pour capturer les chromosomes en s'attachant spécifiquement aux kinétochores présents au niveau des centromères des chromosomes. Cette phase est primordiale, la cellule contrôle l'attachement des chromosomes ;
- La métaphase : Étape d'alignement des chromosomes au plan équatorial de la cellule ;

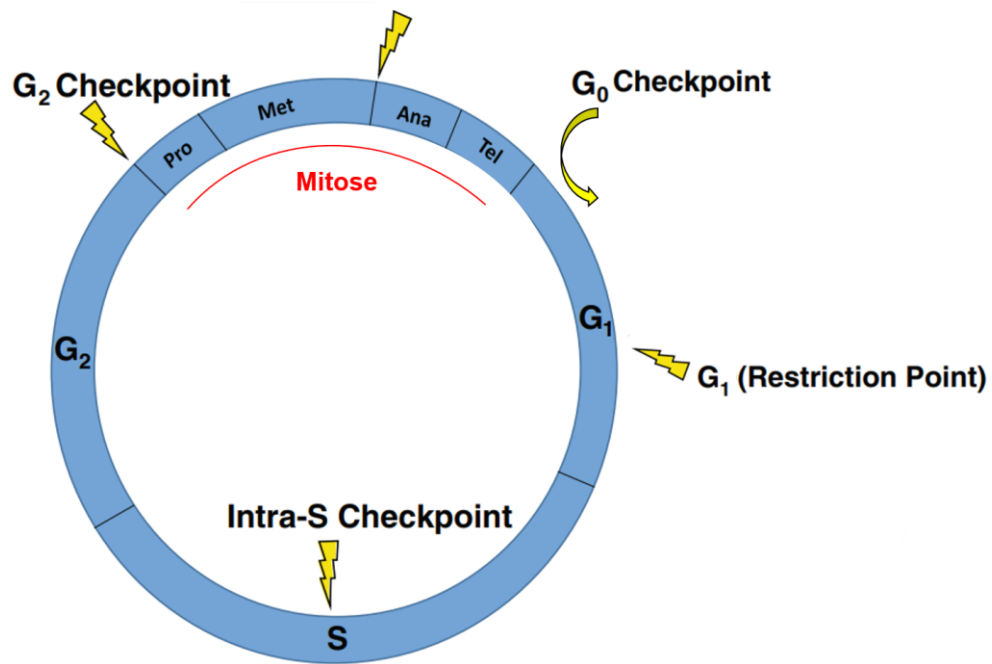


Figure 42 : Cycle cellulaire présentant les 4 phases (phase G₁, phase S, phase G₂ et la mitose) ainsi que les 4 points de contrôles majeurs (transitions G₂/M, métaphase/anaphase et passage de G₀ et en phase S) et le point de restriction en phase G₁. D'après Harper and Brooks, 2004 ; Bowel *et al.*, 2017

- L'anaphase : Étape de séparation des chromatides sœurs. Les cohésines qui accolent les chromatides sœurs au niveau des régions centromériques sont dégradées. Les microtubules kinétochoriens se raccourcissent afin de ramener chaque lot de chromosomes à chaque pôle de la cellule. En parallèle, les microtubules polaires s'allongent, provoquant un allongement de la cellule avec une constriction de la membrane plasmique au niveau du plan équatorial de la cellule ;
- La télophase : Étape de restructuration de l'enveloppe nucléaire et de décondensation de la chromatine, avec formation des noyaux ;

Suite à la mitose, la cytotélorèse correspond à la séparation des deux cellules filles via l'anneau contractile, une répartition homogène des organites entre elles s'effectue en même temps (Harper and Brooks, 2004; Yang, 2012).

2. La régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est soumis à de nombreux « points de contrôle » ou « checkpoints ». Ils concernent essentiellement la quantité et la qualité de l'ADN. Dans le cas d'une mauvaise réplication, d'un dommage à l'ADN (cassure), une mauvaise distribution des chromatides sœurs, etc. des effecteurs s'activent pour stopper la progression de ces cellules dans le cycle cellulaire jusqu'à réparation ou disparition de la cellule par apoptose (Williams and Stoeber, 2012). Il existe de nombreux points de contrôle dont les principaux se trouvent (**figure 42**) :

- Entre la phase G0 et phase G1, permettant à une cellule d'entrer dans le cycle cellulaire, lorsque les conditions sont requises ou obligatoires ;
- En phase G1 (nommée point de restriction R) où les conditions environnementales sont analysées assurant à la cellule les meilleures conditions pour la division cellulaire ;
- En phase S où la réplication de l'ADN est contrôlée et en cas d'erreurs, des systèmes de réparation de l'ADN sont mis en place ;

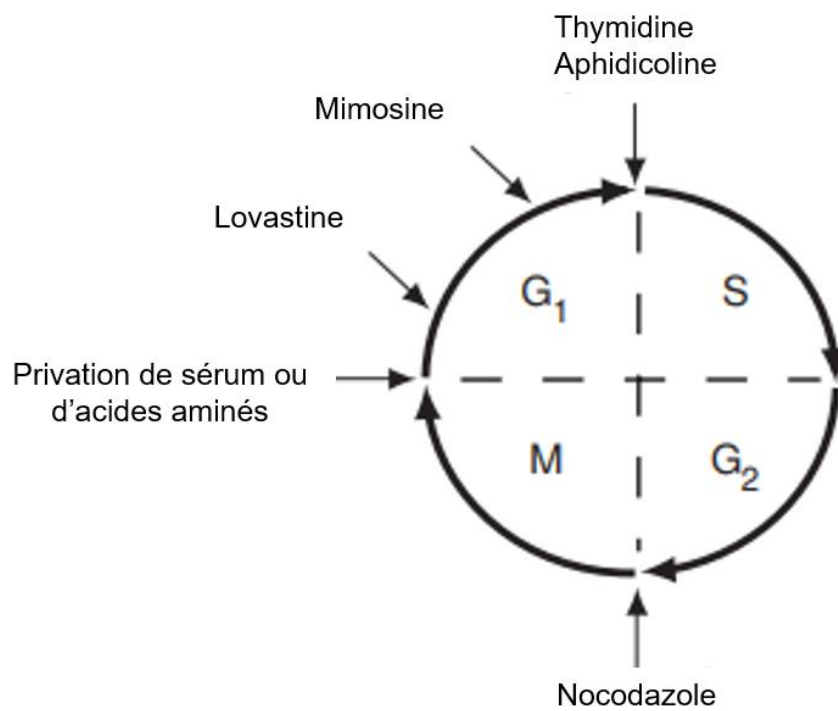


Figure 43 : Traitements applicables pour bloquer les cellules en divers points du cycle cellulaire. D'après Jackman and O'Connor, 1998.

- Entre les phases G2 et M pour s'assurer que la réplication est bien complète, sans erreur et que la cellule a les constituants requis pour assurer la division mitotique ;

D'autres points de contrôle sont présents en mitose notamment pour la transition métaphase/anaphase permettant de s'assurer de la bonne ségrégation des chromatides dans les deux cellules filles. Cette capacité à avancer, ou pas, dans le cycle cellulaire est permise grâce à des protéines spécifiques : les cyclines, des kinases dépendantes des cyclines (CDK) et les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDKi) (Harper and Brooks, 2004).

Certains points de contrôle peuvent être utilisés en culture cellulaire par addition d'un agent bloquant dans le milieu de culture pour synchroniser les cellules, c'est-à-dire avoir des cellules toutes ou une très forte majorité d'entre elles arrêtées dans une phase du cycle. Ce type de blocage est réversible. Ainsi l'élimination de l'agent bloquant permet aux cellules de repartir dans le cycle de façon synchrone. Les agents les plus couramment utilisés restent la thymidine (arrêt à la transition G1/S) et le nocodazole (blocage à début de mitose) (Jackman and O'Connor, 1998) (**figure 43**).

3. Le cycle cellulaire et la microspectroscopie vibrationnelle

Malgré son rôle crucial, le cycle cellulaire n'a été que très peu étudié avec des outils vibrationnels. L'avantage d'analyser le cycle cellulaire par des méthodes de microspectroscopies vibrationnelles repose sur la possibilité d'assigner des signaux Raman à différents composés cellulaires et de pouvoir suivre leurs mouvements dans la cellule. En effet, durant la mitose de nombreux mouvements intracellulaires sont requis pour son bon déroulement ; l'alignement des chromosomes sur le plan équatorial, le changement de conformation du réticulum endoplasmique en sont de bons exemples (Jongsma *et al.*, 2015).

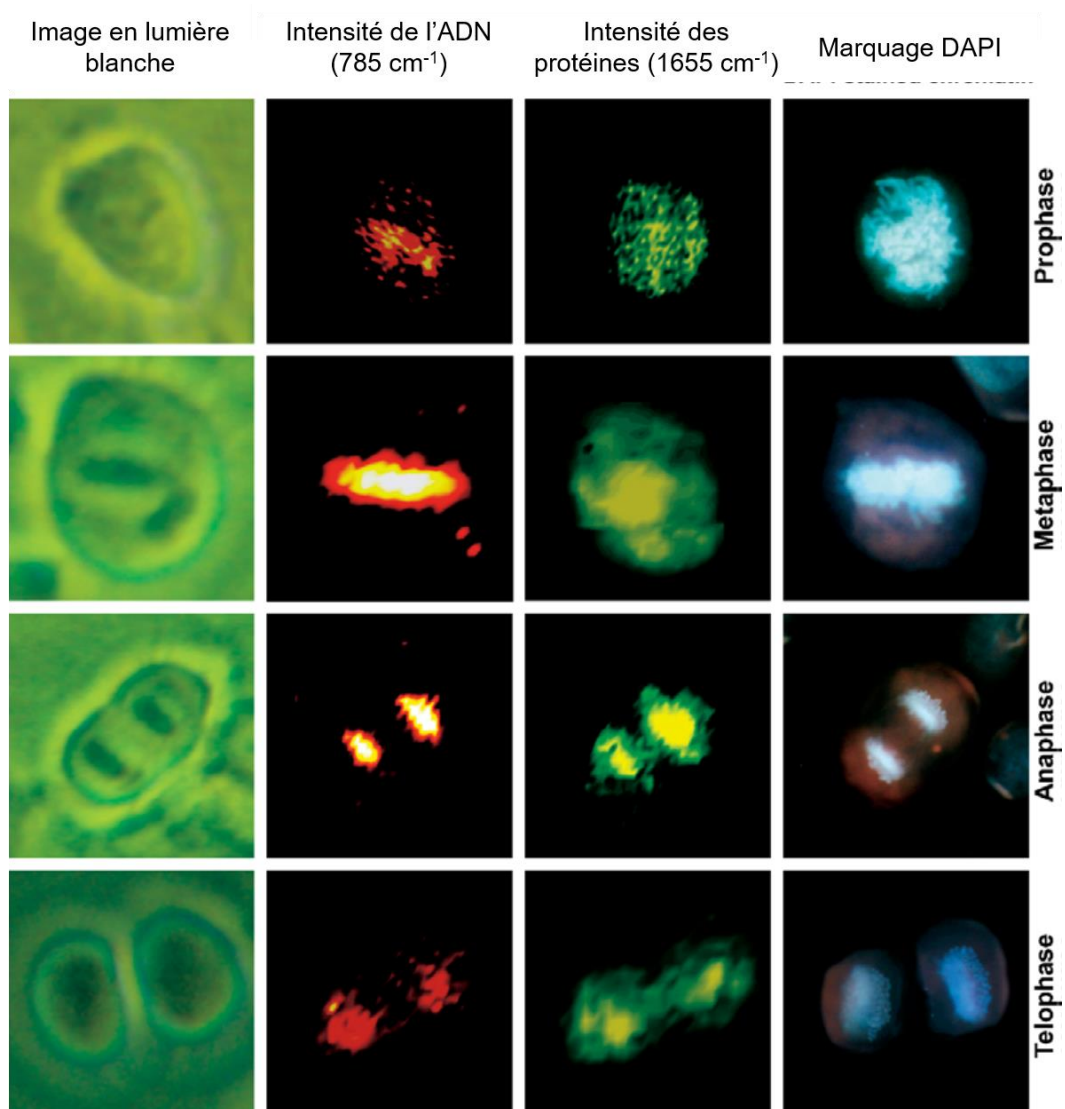


Figure 44 : Étude des différentes sous phases de la mitose par microspectroscopie Raman.

Des cellules HeLa en prophase, métaphase, anaphase et télophase sont analysées par microspectroscopie Raman dans la zone d'empreinte biologique (500-1800 cm^{-1}). Pour chaque condition : une image en lumière blanche ainsi que les cartographies retracées pour visualiser l'ADN en orange (785 cm^{-1}) et les protéines en vert (1655 cm^{-1}). Une fois analysées par microspectroscopie Raman, les cellules sont marquées au DAPI (en bleu) pour visualiser le noyau par microscopie de fluorescence. D'après Matthäus *et al.*, 2006.

L'équipe de Max Diem en 2006, s'est intéressée entre autres à la condensation de la chromatine durant le cycle cellulaire par microspectroscopie Raman et ce dans la zone biologique du spectre Raman. La différence d'intensité de deux signaux Raman spécifiques (785 cm^{-1} (acides nucléiques) et 1655 cm^{-1} (protéines)) permettent de positionner les cellules dans les différentes phases de la mitose (**figure 44**) et à fortiori une cellule en interphase d'une cellule en mitose (Matthäus *et al.*, 2006).

Une comparaison entre des cellules en interphase (**figure 45B**) et en mitose (**figure 45A**) effectuée par microspectroscopie CARS en s'intéressant aux protéines (2928 cm^{-1}) et aux lipides (2840 cm^{-1}) révèle que durant la mitose, le signal associé aux protéines est quasi homogène dans toute la cellule (**figure 45A,a**). Concernant les lipides, le signal est moins intense, plus diffus, seulement quelques gouttelettes lipidiques sont regroupées (**figure 45A,b**). Dans les cellules interphasiques de forts signaux protéiques apparaissent dans le noyau, ils correspondent aux nucléoles (**figure 45A,e**). En revanche, concernant les lipides, leur signature reste relativement proche des cellules mitotiques (**figure 45A,f**). Pour chaque condition, un diagramme d'intensité des pics associés aux protéines et à l'ADN le long d'une ligne traversant la cellule montre que les localisations des signatures protéique et ADN ne se superposent pas en mitose comme en interphase (**figure 45C et D**) (Pliss *et al.*, 2010).

De manière surprenante, un décalage Raman à 2956 cm^{-1} retrouvé uniquement lors d'analyse de l'ADN (**figure 46A**) est attribué au désoxyribose, ceci après comparaison entre le spectre de l'ADN et des molécules qui le composent (désoxyribose, adénine, thymine, guanine et cytosine) (**figure 46B**). Des cartographies SRS de cellules en prophase (**figure 46C**) et en interphase (**figure 46D**), permettent grâce à ce signal d'observer la condensation de la chromatine pour les cellules mitotiques, et les nucléoles pour les cellules en interphase (Lu *et al.*, 2015).

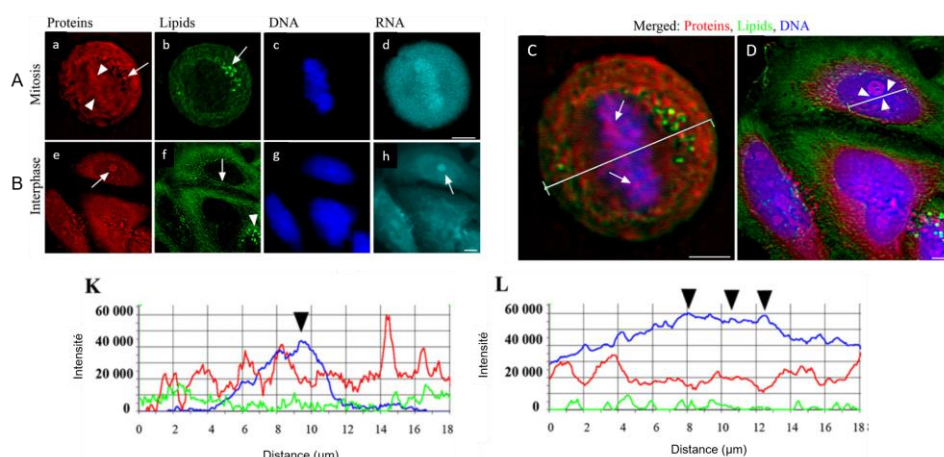


Figure 45 : Modification de la localisation de différents composés biochimiques en fonction du cycle cellulaire observée par la microspectroscopie CARS.

Cartographie CARS de cellules HeLa en (A) mitose, (B) interphase montrant (a et e) les protéines en rouge (2928 cm^{-1}), (b et f) les lipides en vert (2840 cm^{-1}). Une fois analysées par la microspectroscopie CARS, les cellules sont marquées à l'acridine orange pour visualiser (c et g) l'ADN en bleu et (d et h) les ARN en turquoise, par la microscopie biphotonique. Superposition des signaux protéiques (rouge), lipidiques (vert) et de l'ADN (bleu) pour les cellules (C) en mitose et (D) en interphase. Les profils d'intensité pour chaque signal sont représentés, ils sont évalués au niveau d'une ligne montrée en C. D'après Pliss *et al.*, 2010a.

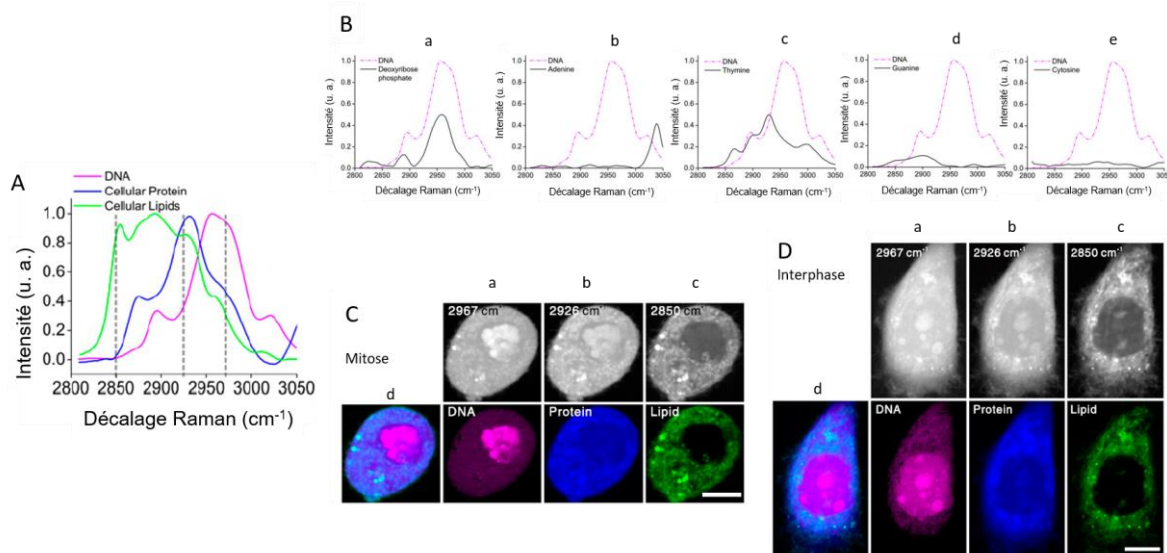


Figure 46 : Identification d'un nouveau décalage Raman correspondant à l'ADN dans la zone CH.

(A) Spectre Raman de solution pure d'ADN, de protéines et de lipides. (B) Comparaison du spectre Raman de l'ADN (tracé pointillé rose) avec le spectre (a) du désoxyribose, (b) de l'adénine, (c) de la thymine, (d) de la guanine et (e) de la cytosine. Les cellules HeLa sont synchronisées en (C) mitose et en (D) G1 par un double traitement à la thymidine puis analysées par la microspectroscopie Raman stimulée (SRS). Les cartographies cellulaires sont reconstruites pour visualiser (a) l'ADN en rose (2967 cm^{-1}), (b) les protéines en bleu (2926 cm^{-1}), (c) les lipides en vert (2850 cm^{-1}) et (d) la superposition des trois signaux. D'après Lu *et al.*, 2015.

Plus récemment, une étude portant sur une optimisation du CARS multiplexe s'est intéressée au cycle cellulaire. La résolution spectrale et l'analyse hyper large bande permettent de réaliser des études précises et riches en informations vibrationnelles. À partir de cartographies à différents décalage Raman dans la zone biologique et la zone CH de cellules en interphase, la signature associée aux protéines et celle associée au ADN/ARN permettent de mettre en évidence les nucléoles et le cytoplasme (**figure 47A**). Comme les précédentes études, la signature des protéines tend à être présente dans toute la cellule et celle des lipides met en évidence les gouttelettes. La condensation de la chromatine est observée par l'intermédiaire de la signature associée aux ADN/ARN dans la zone biologique uniquement (1574 cm^{-1} et 1098 cm^{-1}) (Yoneyama *et al.*, 2018) (**figure 47B**).

Au vu de ces études peu nombreuses, nous constatons que les signaux vibrationnels varient en fonction du cycle cellulaire, majoritairement durant la mitose, phase cellulaire subissant le plus de modification. Cependant, les nombreux changements cellulaires durant le cycle, plus particulièrement la mitose, sont que très peu mis en évidence par les technologies vibrationnelles comme le réarrangement du réticulum endoplasmique et la condensation de l'ADN.

Nous constatons une certaine incohérence lorsque nous analysons de manière précise les données récentes de la littérature. En effet, la signature associée aux protéines, semble identifier uniquement les protéines cytosoliques dans le cas de cellule en mitose. Cette constatation semble surprenante, car durant la mitose, il est démontré que de nombreuses protéines interviennent pour l'hyper-condensation de l'hétérochromatine pour aboutir au chromosome métaphasique (**figure 48**). Il a été démontré qu'un chromosome contenait plus de deux tiers de protéines contre un tiers d'ADN (Salzman *et al.*, 1966 ,Ou *et al.*, 2017) . Aucune des études citées précédemment ne semble pouvoir imager cette hétérochromatine par l'intermédiaire des protéines de condensation. De plus, aucun autre organite n'est mis en évidence, tel que le réticulum endoplasmique, organite qui subit la plus grande modification durant la mitose.

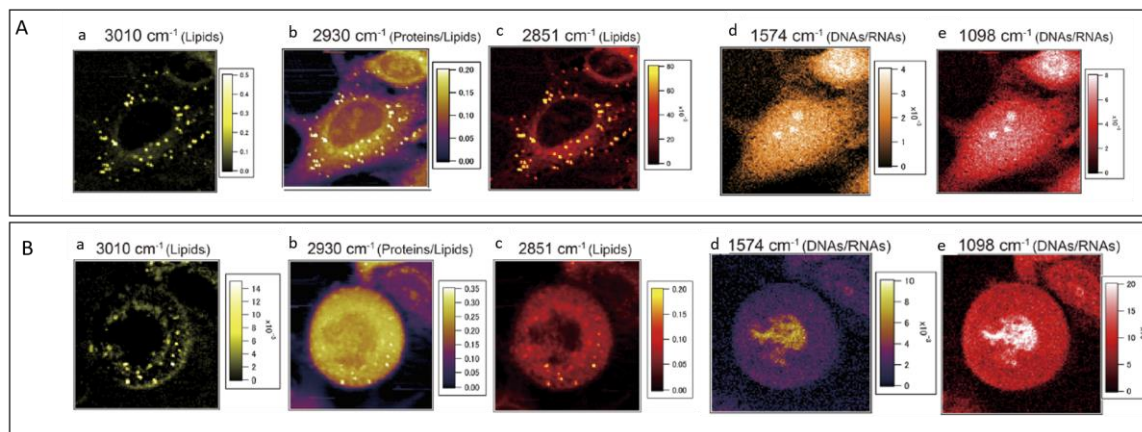


Figure 47 : Analyse du cycle cellulaire par la microspectroscopie CARS multiplexe.

Les cellules HeLa sont analysées en (A) interphase et en (B) mitose sur la plage de 600-3200 cm^{-1} . Pour chaque condition, les cartographies CARS sont reconstruites pour visualiser (a) les lipides en jaune ($=\text{C-H}$: 3010 cm^{-1}), (b) les protéines/lipides en violet (CH_3 : 2930 cm^{-1}), (c) les lipides en rouge (CH_2 : 2851 cm^{-1}), (d) l'ADN et les ARN en orange (adénine et guanine : 1574 cm^{-1}) et en (e) les liaisons phosphodiester en rouge (1098 cm^{-1}). D'après Yoneyama *et al.*, 2018.

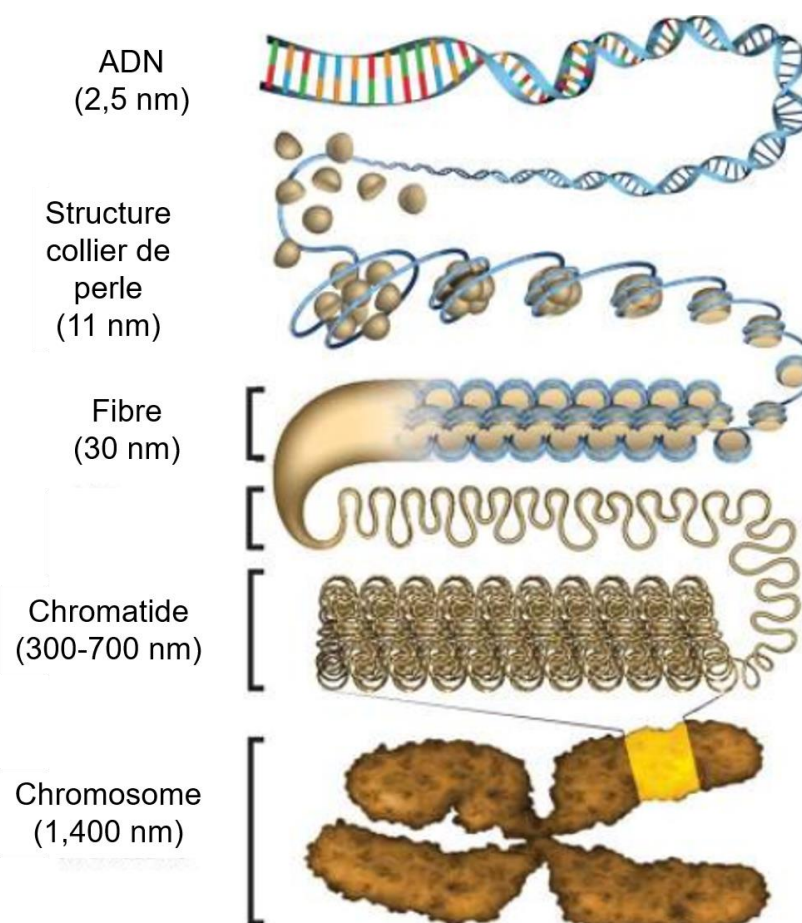


Figure 48 : Représentation du super enroulement de l'ADN jusqu'à la formation de chromosome métaphasique.

Les différentes sous étapes du super-enroulement de l'ADN sont représentées. L'épaisseur de la chromatine est précisée pour chacune d'elles. D'après Ou *et al.*, 2017.

Ainsi, au cours de ce travail, je me suis attachée à montrer qu'il est possible par la microspectroscopie CARS : (1) de mettre en évidence l'état de la chromatine grâce aux protéines de condensation ; (2) de faire le lien entre la quantité d'un récepteur membranaire à la surface d'une cellule, son activation et l'augmentation du métabolisme lipidique grâce aux gouttelettes lipidiques.

Chapitre II. Projet de thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de thèse d'Erwan Capitaine qui ont conduit à la mise en place de la microspectroscopie CARS au sein de l'institut Xlim, équipe biophotonique. Il s'est déroulé en trois grandes étapes majeures conduisant à l'utilisation de l'outil CARS sur des cellules transformées et des lignées cellulaires représentant différents stades du cancer colorectal, et à son développement comme outil précurseur de diagnostic cancéreux.

La première partie de mon travail a consisté à la prise en main et à la détermination des paramètres optimaux d'analyse par microspectroscopie CARS en configuration spectroscopie CARS uniquement. Ceci m'a permis d'identifier une problématique majeure : l'observation d'une grande hétérogénéité des signaux CARS lors d'analyse de noyaux provenant de cellules de la même lignée cellulaire. Cette hétérogénéité ne concernait pas l'apparition d'un nouveau décalage Raman mais des variations d'intensité des signaux. La modification de la configuration de l'outil CARS, et l'utilisation de la microspectroscopie se sont avérées nécessaires pour observer une cellule uniquement grâce à la capacité vibrationnelle de ces composés biochimiques. En se focalisant uniquement sur les liaisons CH (CH_2 et CH_3 associées aux lipides et aux protéines, respectivement). Cela nous a permis de comprendre la fluctuation des signaux en spectroscopie CARS, due aux légères variations d'emplacements dans la cellule des différents constituants cellulaires. Ainsi, ces variations peuvent être attribuées aux changements « d'état » des cellules selon leur position dans le cycle cellulaire.

Afin de confirmer cette hypothèse, la deuxième partie de mon travail de thèse s'est orientée sur la cartographie CARS de cellules de même lignée, en utilisant les signatures protéique et lipidique. Pour s'affranchir des variations dues au cycle cellulaire, les cellules ont été bloquées dans deux grandes phases du cycle cellulaire : interphase (transition G1/S) et mitose (prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase). Ainsi, des cartographies ont été réalisées en connaissant la position des cellules dans l'une ou l'autre des phases.

Une analyse comparative a conduit à identifier la localisation de différents composants cellulaires en fonction du cycle. Il a été alors possible d'assigner la signature des liaisons CH₂, correspondant majoritairement aux lipides, à la visualisation du réticulum endoplasmique. Concernant les vibrations des liaisons CH₃, elles correspondent majoritairement aux protéines de condensation de l'ADN, permettant de visualiser l'hétérochromatine (durant la mitose), les nucléoles et l'hétérochromatine attachée à la lamina nucléaire (durant l'interphase). Ainsi, en opposition à la littérature étudiant le cycle cellulaire par les technologies vibrationnelles (Lu *et al.*, 2015; Matthäus *et al.*, 2006; Pliss *et al.*, 2010), ce travail a permis de démontrer que la signature associée aux protéines met en évidence les protéines impliquées dans la condensation de la chromatine plutôt que les protéines cytosoliques. De plus, il est possible d'observer les réorganisations du réticulum endoplasmique et de la chromatine durant la mitose. Par cette dernière observation, il a été possible de préciser la phase mitotique dans laquelle se situaient les cellules. Cette étude à l'avantage supplémentaire, comparé aux autres, d'utiliser un algorithme de traitement de données simple d'utilisation et rapide, l'algorithme d'entropies maximum (MEM). Ce deuxième axe de recherche a permis de présenter mes résultats à deux congrès (national et international), et de les valoriser par une publication dans Scientific Reports.

La troisième partie de ma thèse avait pour objectif de comparer les signaux CARS entre des cellules saines et cancéreuses. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur l'activation d'un récepteur transmembranaire impliqué dans la carcinogenèse, le récepteur TrkB, régulièrement associé à la carcinogenèse colorectale et en lien avec un mauvais pronostic vital (Akil *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2017). Pour cela, il a fallu mener de front une étude biologique qui a consisté à la création de clones cellulaires exprimant le récepteur dans une lignée cellulaire ne l'exprimant pas naturellement afin de permettre l'étude spécifique des « effets » du récepteur TrkB.

Après avoir caractérisé les clones (niveau d'expression génique, protéique et localisation du récepteur), et vérifié la fonctionnalité de TrkB par activation avec le BDNF, son ligand préférentiel, les cellules ont été analysées par la microspectroscopie CARS dans la zone CH. Ces analyses ont permis de montrer que le récepteur TrkB, une fois activé par le BDNF, induisait une synthèse *de novo* d'acides gras et leur accumulation sous la forme de gouttelettes lipidiques dans la cellule. Afin de s'assurer que la modification du métabolisme lipidique résulte bien de l'activation du récepteur TrkB, un double traitement a été effectué par le BDNF et par le K252a, un inhibiteur compétitif spécifique du BDNF (Nye *et al.*, 1992 ; Perez-Pinera *et al.*, 2007). Les cartographies CARS résultantes sont semblables à celles observées en absence de traitement. L'activation du récepteur TrkB serait donc nécessaire pour la formation de gouttelettes lipidiques dans la cellule.

Il a déjà été montré dans la littérature que le métabolisme lipidique joue un rôle non négligeable dans le processus cancéreux tel que la prolifération, la résistance aux chimiothérapies, ... et est souvent associé à un mauvais pronostic (Liu *et al.*, 2017). Quelques récepteurs transmembranaires ont déjà été étudiés par les technologies vibrationnelles tels que le récepteur HER2 (Bi *et al.*, 2014). Mais, il n'y a pas de lien dans la littérature entre le récepteur TrkB, son activation et un niveau métabolique lipidique accru. L'analyse de cellules cancéreuses colorectales présentant différents niveaux d'expression du récepteur TrkB, mimant les stades I (HCT116), II (HT29) et III (SW620) du cancer m'a permis de valider cette hypothèse. Leur fort métabolisme lipidique est en lien avec l'expression du récepteur TrkB. Ce troisième axe de recherche a conduit à une présentation orale à un congrès national et à la soumission d'une publication (PNAS).

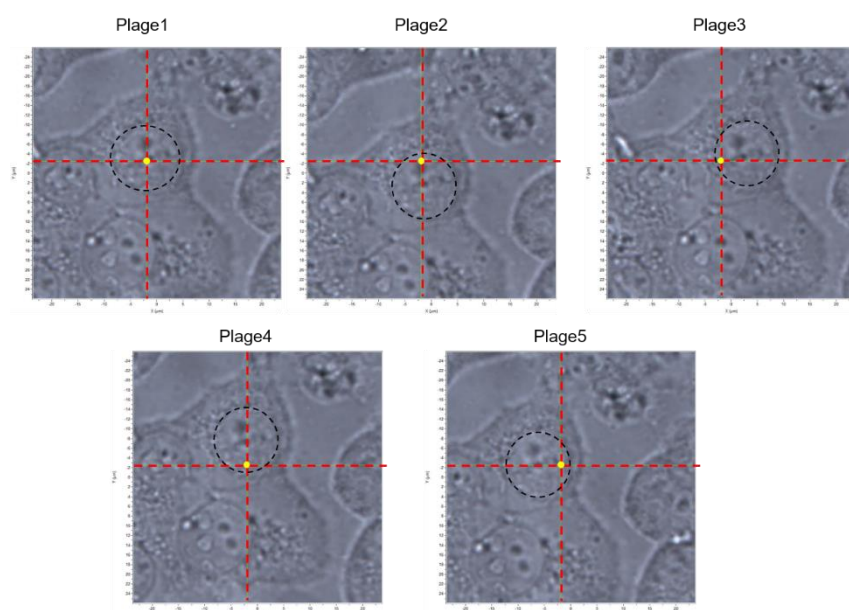
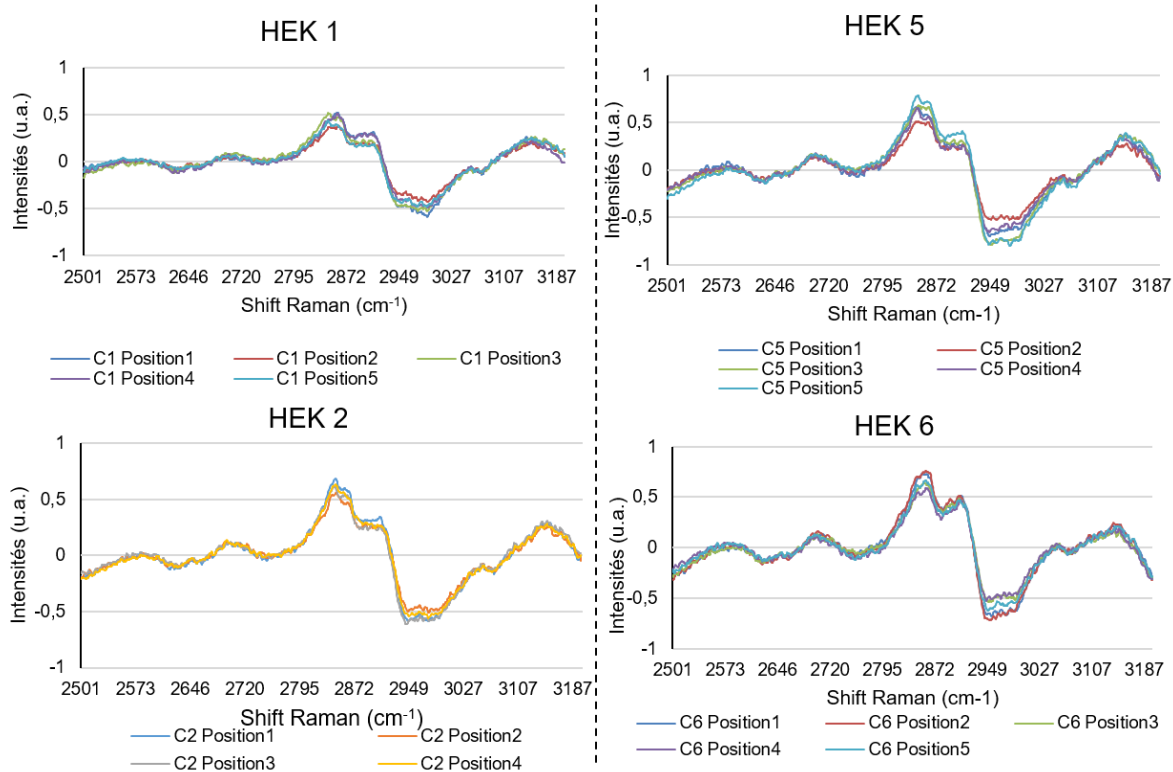


Figure 49 : Analyse en 5 points différents du noyau d'une cellule HEK.

À partir de l'observation d'une cellule HEK en microscopie en lumière blanche, 5 plages différentes pointées en jaune sont analysées dans le noyau : la plage 1 est au centre du noyau ; la 2 est en haut ; la 3 à gauche ; la 4 en bas ; et la 5 à droite.



Chapitre III. Résultats préliminaires

Mes premiers travaux ont consisté à utiliser l'appareil en configuration spectroscopie afin d'identifier d'éventuelles différences spectrales correspondant à des organites intracellulaires. Pour ce faire, deux types de traitement algorithmique ont été testés (données brutes, traitement PCA et traitement MSC), et ont révélé des variations d'intensité. Pour associer ces variations à des constituants cellulaires des cartographies ont été réalisées.

I. Analyse spectrale

1. Différentes mesures pour un même organite

Durant la première partie de ma thèse, je me suis intéressée à visualiser des spectres CARS correspondant à plusieurs mesures effectuées à divers endroits d'une même cellule. Pour cela, j'ai utilisé la lignée cellulaire HEK, et 5 points différents dans le noyau ont été analysés par la spectroscopie CARS (**figure 49**). Je me suis limitée à la zone CH ($2500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) car elle possède deux vibrations importantes et de grandes intensités : celles associées aux liaisons CH_2 et CH_3 , à 2850 et 2930 cm^{-1} respectivement. Les spectres sont traités par l'algorithme de MSC, qui soustrait le bruit de fond (l'extérieur de la cellule). Pour finir, un lissage des spectres est réalisé suivant la technique Savitzky-Golay (polynôme d'ordre 3 et une fenêtre de 31 points). La comparaison des divers points de mesures par cellule sur 12 cellules HEK révèle que les spectres restent similaires entre eux (**figure 50**). Aucun point de mesure ne permet de visualiser un décalage Raman supplémentaire. Cependant, on observe une différence nette d'intensité entre les différents points de mesure par cellule, ceci majoritairement pour les cellules HEK 4, 5, 12, 13 et 15.

Afin de visualiser ces différences d'intensités, les 5 points de mesure par cellule ont été moyennés (**figure 51**). Nous constatons une grande variabilité d'intensité pour les pics correspondant aux vibrations des liaisons CH_2 (en rouge) et CH_3 (en vert).

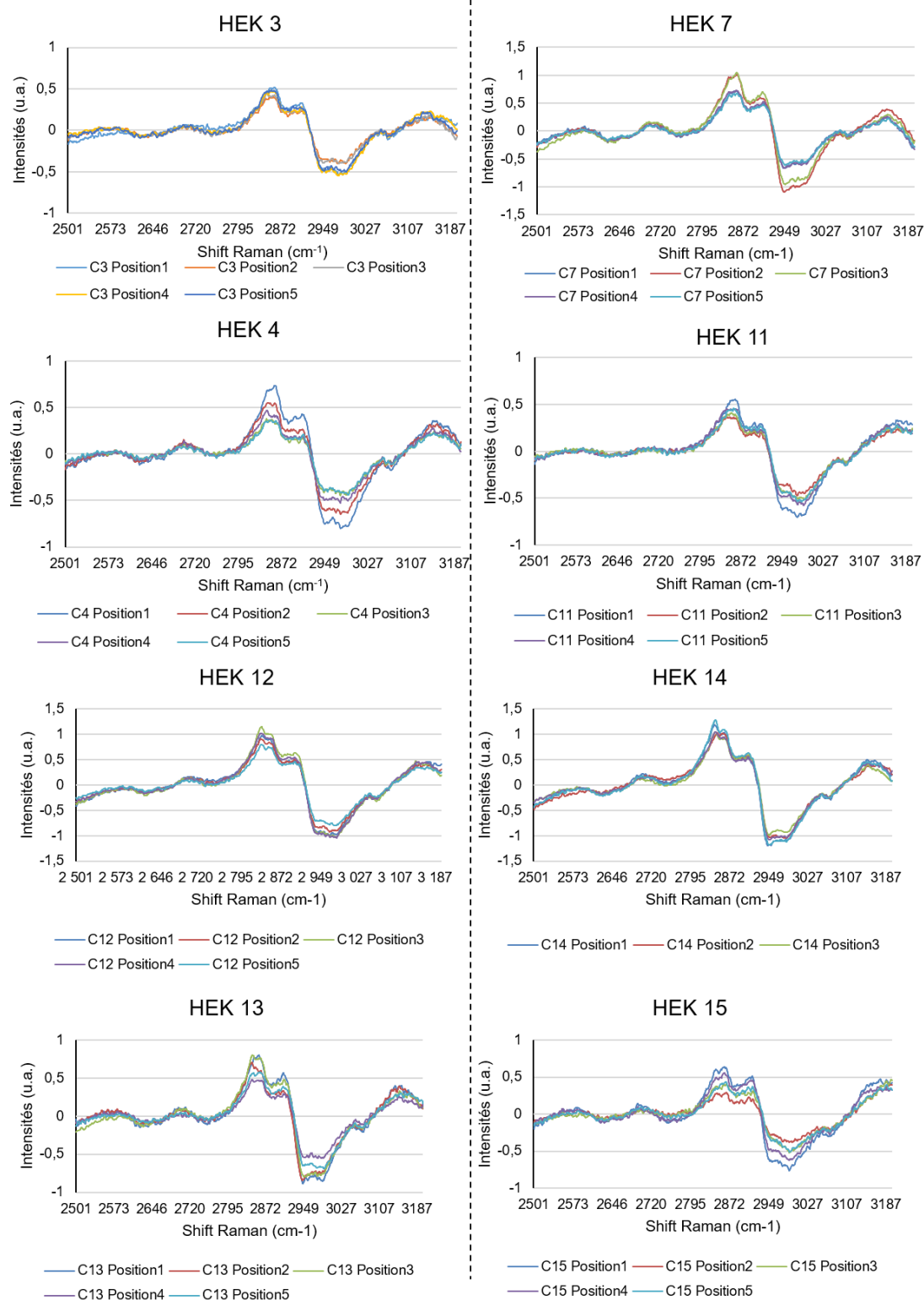


Figure 50 : Analyse par spectroscopie CARS en différents points du noyau d'une cellule HEK.

Représentation des spectres CARS correspondant aux 5 points différents dans le noyau (Figure 47) dans la zone CH ($2500-3200\text{ cm}^{-1}$). Les analyses ont été effectuées sur 12 cellules HEK ; les données ont été traitées par MSC.

Une variation d'intensité d'un facteur 2,67 est observée pour la liaison CH_2 , intensité la plus faible de 0,41 pour HEK15 et la plus forte 1,09 pour HEK14. La variation pour la liaison CH_3 est du même ordre de grandeur (2,61) avec pour l'intensité la plus faible 0,21 (HEK15) et 0,55 (HEK14) pour la plus élevée.

Ainsi, il semblerait y avoir des fluctuations d'intensités au sein d'un même compartiment cellulaire. Dans le but de rechercher l'origine des fluctuations (cellules et/ou compartiment cellulaire analysé), j'ai réalisé lors d'une deuxième étude pour une même cellule des mesures dans la zone CH du spectre Raman à divers points du noyau et du cytoplasme de cellules HEK. Les résultats ont été traités par ACP (Analyse en Composantes Principales qui permet d'identifier les différences majeures au sein d'un même compartiment cellulaire (noyau ou cytoplasme) ainsi qu'entre ces deux compartiments.

2. Analyse comparative entre deux compartiments cellulaires

Cette étude a été menée en étroite collaboration avec le Professeur Ludovic Duponchel, au sein du LASIR de l'Université de Lille UMR 8516 (Infrared and Raman spectroscopy Laboratory). Les spectres obtenus (**figure 52A,a**) sont moyennés (**figure 52A,b**) puis analysés par ACP. Seules les 3 premières composantes principales sont montrées, car elles ont le pourcentage de variance le plus important. Une comparaison sous forme de plot entre la CP1/CP2 ainsi que CP1/CP3 est réalisée (**figure 52B**), et les spectres des trois composantes sont obtenus. Les comparaisons CP1/CP2 ne permettent pas d'obtenir des regroupements de données. Concernant la comparaison CP1/CP3, une discrimination semble être plus prononcée. Elle indiquerait que les spectres du cytoplasme auraient une contribution plus importante pour le décalage Raman à 3000 cm^{-1} tandis que les spectres du noyau possèderaient une contribution plus importante à 2870 cm^{-1} . Malgré cela, cette séparation n'est pas parfaite, elle n'autorise pas une discrimination fiable entre spectres du noyau et spectres du cytoplasme. De plus, on ne constate pas de séparation au sein d'un même compartiment cellulaire, comme le laissait supposer les premières analyses spectrales point par point du noyau de cellules HEK.

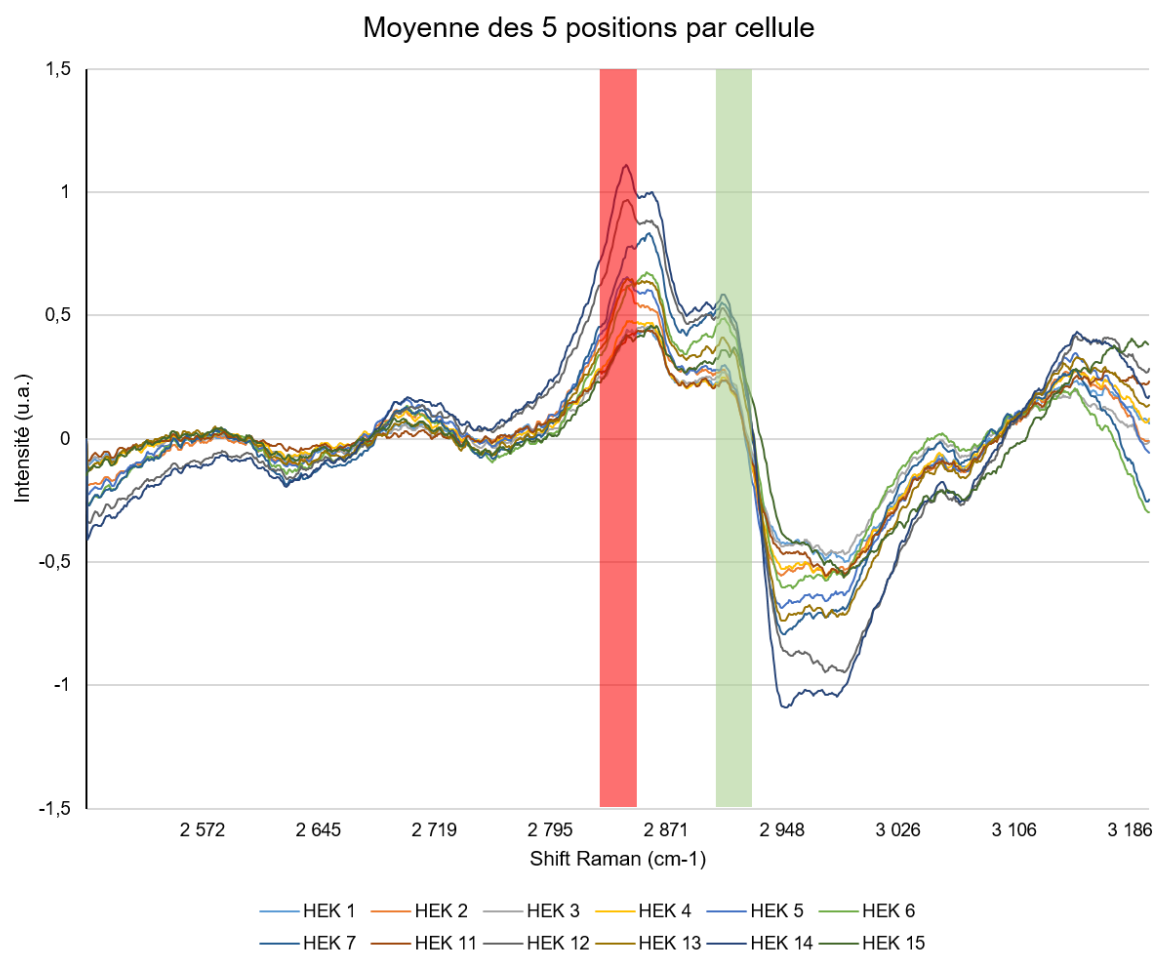


Figure 51 : Comparaison des spectres CARS de noyaux de cellules HEK.

Représentation des moyennes des 5 points par cellule des spectres CARS dans la zone CH (2500-3200 cm⁻¹). En rouge la région vibrationnelle associée aux liaisons CH₂ et en vert celle associée aux liaisons CH₃. Les données ont été traitées par MSC.

A la vue de ces résultats, il semble relativement difficile de réaliser des comparaisons entre différents types de cellules, d'observer des différences spectrales entre les compartiments cellulaires, voire entre même compartiment. Ainsi, selon la zone de la cellule analysée, les spectres seront obligatoirement différents, ne permettant pas de conclure sur la nature des différences entre les diverses cellules analysées. Cette supposition s'appuie sur la constitution même d'une cellule avec ses nombreux organites présents dans le cytoplasme (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules cytoplasmiques comme les gouttelettes lipidiques, les autophagosomes, ...). Ces organites, bien que présents exclusivement dans le cytoplasme, n'ont pas de localisation spécifique, et peuvent s'y retrouver dispersés. Le noyau est aussi un organite avec différentes structures telles que l'euchromatine (chromatine décondensée, pauvre en protéines), l'hétérochromatine (chromatine condensée, riche en protéines). Ainsi, la comparaison entre cellules par analyse spectrale en un point de la cellule ne permet pas de conclure sur des différences cellulaires, les spectres générés pouvant provenir d'organites différents entraînant de l'hétérogénéité dans les signatures.

À partir de ce constat, il s'est avéré nécessaire d'utiliser la microspectroscopie CARS afin de s'affranchir de ces problèmes.

II. Analyse par microspectroscopie CARS

1. Première cartographie de cellules

Un premier test de cartographie d'une cellule sans traitement de donnée préalable a été conduit sur des cellules HEK dans la zone CH du spectre Raman (**figure 53**).

En raison du risque de dégradation de l'échantillon et de modifications cellulaires induites par la puissance du laser et du temps d'analyse, les cellules HEK ont été préalablement fixées en utilisant du paraformaldéhyde.

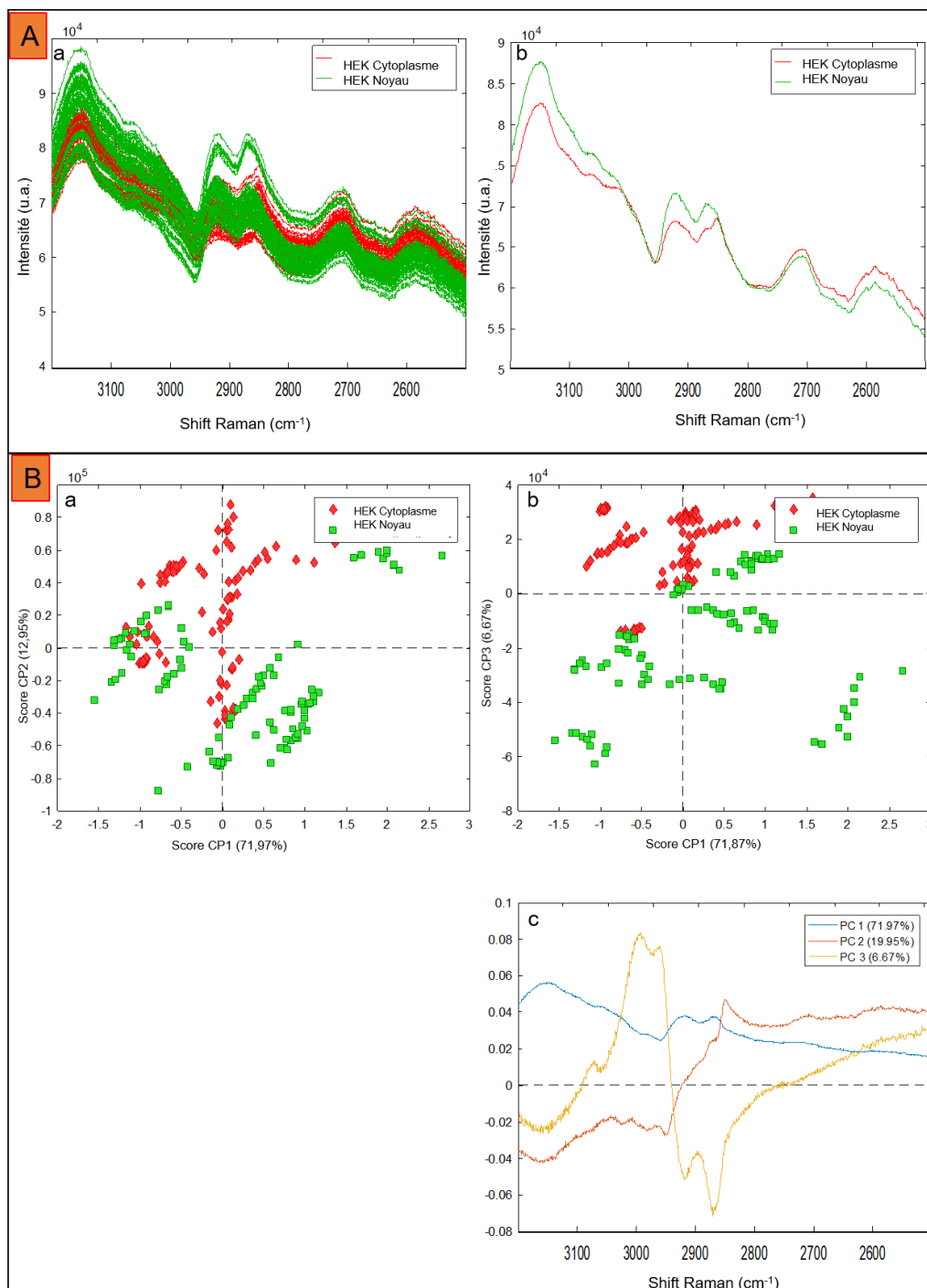


Figure 52 : Analyse en composantes principales des spectres associés au noyau et au cytoplasme des cellules HEK.

Plusieurs points de mesure dans le noyau (vert) et dans le cytoplasme (rouge) de cellules HEK ont été acquis par spectroscopie CARS, dans la zone CH ($2500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$). En A.a sont représentés tous les spectres bruts et en A.b la moyenne de ces spectres pour ceux du noyau et du cytoplasme. Ces données sont ensuite traitées par l'ACP et représentées en fonction de 2 composantes principales : B.a : CP1/CP2, B.b : CP1/CP3. Les spectres correspondant sont présentés en B.c.

Une première cartographie, peu résolue (pas de 1 μm), nous a permis, pour la première fois au laboratoire, d'observer une cellule de par sa capacité vibrationnelle, majoritairement associée aux protéines et aux lipides. Il apparaît que la signature protéique est majoritairement présente dans le noyau et celle des lipides dans le cytoplasme.

Suite à ces premiers résultats, j'ai modifié de nombreux paramètres CARS, tels que la puissance du laser, les temps d'acquisition, la résolution (la taille des pixels), afin de voir si par microspectroscopie CARS il s'avère possible de visualiser des organites au travers de l'étude des différences spectrales.

2. Analyse par microspectroscopie CARS de cellules d'une même lignée cellulaire

Différentes cellules HEK ont été analysées par microspectroscopie CARS. Les cartographies ont été traitées par MSC puis retracées pour visualiser la vibration des liaisons CH_2 et les CH_3 (**figure 54**). On constate, dans un premier temps, une nette discrimination entre la cellule et l'extérieur, pour chaque condition. Concernant la signature associée aux liaisons CH_2 , elle semble être majoritairement présente dans le cytoplasme de la cellule mais avec des intensités et des localisations différentes selon les cellules. Concernant la liaison CH_3 , elle signe majoritairement dans le noyau, soit elle se limite à certaines régions du noyau ou à la totalité des chromosomes. Cela est en accord avec l'analyse spectrale précédente montrant que pour un même organite, les intensités spectrales peuvent varier.

Dans le but de discriminer ces différences d'intensité et de les associer à des compartiments cellulaires, les cartographies ont été traitées par ACP.

3. Analyse par ACP des cartographies cellulaires

Les cartographies cellulaires ont été traitées par ACP, et seules les composantes 1, 2 et 3 sont représentées avec leur spectre correspondant (**figure 55**). Pour les pixels présentant des nuances de couleurs chaudes (du jaune au rouge), la contribution spectrale est associée uniquement aux pics présents dans la partie positive de l'ACP.

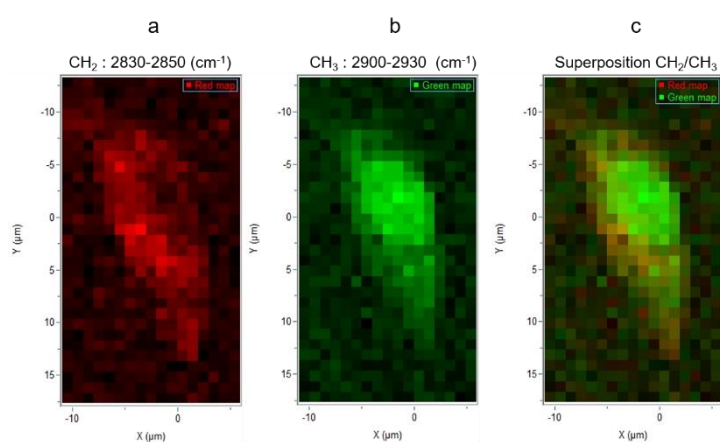


Figure 53 : Analyse par microspectroscopie CARS de cellule HEK.

La cellule HEK est scannée par microspectroscopie CARS dans la zone CH (2500-3200 cm^{-1}). Les cartographies sont retracées pour visualiser les valeurs brutes correspondant à (a) la vibration des liaisons CH_2 , (b) la vibration des liaisons CH_3 et (c) la superposition des deux.

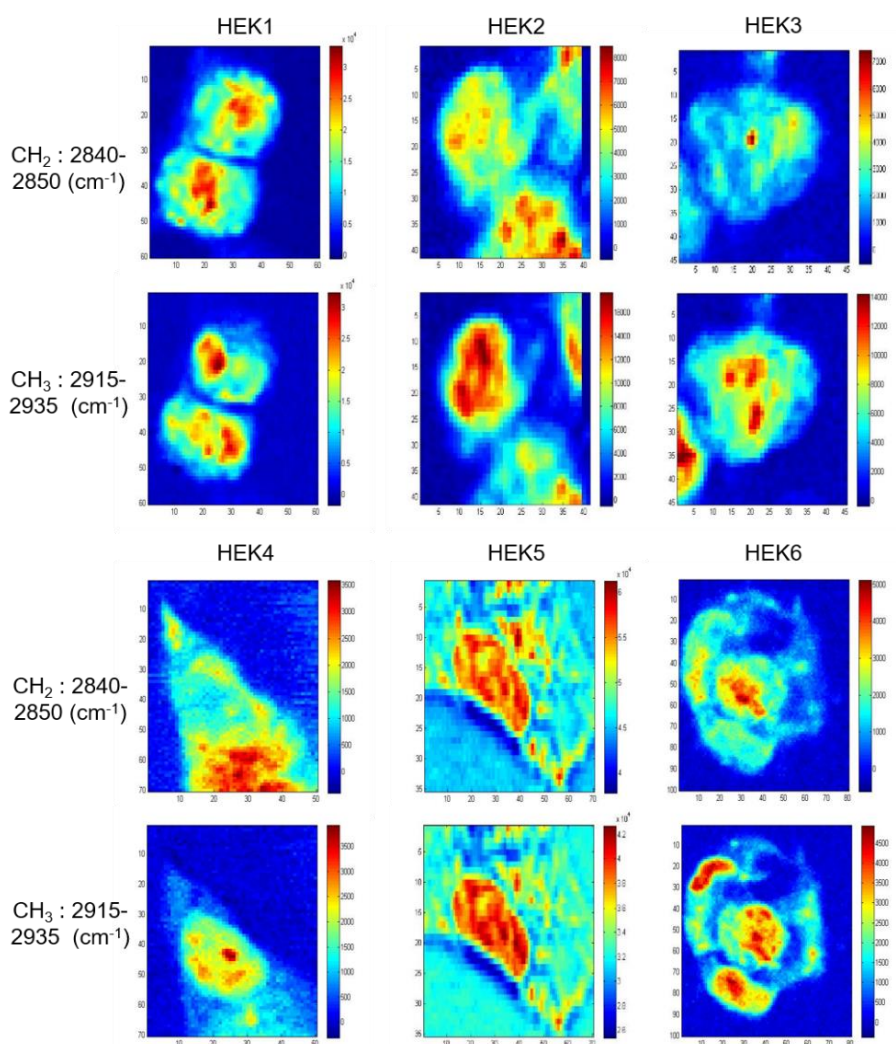


Figure 54 : Analyse par microspectroscopie CARS suivie de traitement MSC de cellules HEK. Les cellule HEK sont scannées par microspectroscopie CARS dans la zone CH (2500-3200 cm^{-1}). Les données sont traitées par MSC et les cartographies sont retracées pour visualiser (a) la vibration des liaisons CH_2 , (b) la vibration des liaisons CH_3 . Plus l'intensité des pixels est rouge, plus l'intensité du signal correspondant est importante.

A l'inverse, les pixels présentant des nuances de couleurs froides (du vert au bleu foncé) ont une contribution spectrale associée uniquement aux pics présents dans la partie négative de l'ACP. En prenant en compte le résultat de la cartographie ainsi que le spectre correspondant afin d'assigner un décalage Raman spécifique à une localisation cellulaire, nous constatons une grande variabilité des résultats. On peut en conclure que pour des cellules provenant d'une même lignée cellulaire, les résultats par composantes varient (en adéquation avec les spectres correspondant). L'hypothèse concernant cette fluctuation du signal CARS proviendrait certainement du cycle cellulaire. En effet, ces cellules proviennent toutes de la même lignée cellulaire commerciale, et expriment les mêmes types de protéines (intracellulaires, transmembranaires, ...) et de lipides. La seule variation pouvant exister au sein d'une population cellulaire est la position des cellules dans le cycle. De manière classique, il est retrouvé environ 10 % de cellules en mitose et 90 % en interphase (incluant les phases G1, S et G2). Ainsi, parmi les cellules HEK analysées, il est possible qu'elles ne soient pas toutes dans la même phase du cycle, ce qui serait à l'origine des différences de signaux CARS (en intensités et localisation). De plus, les traitements par ACP et MSC ne sont pas des plus adaptés pour ce type d'analyse. Comme décrit dans la section du chapitre I, III, 3, la technologie CARS est capable de générer deux signaux confondus : un signal vibrationnel et un électronique ; ce dernier est nommé bruit de fond non résonnant et noie l'information vibrationnelle. Ainsi, utiliser comme algorithme la méthode d'entropie maximum permet d'interpréter uniquement les cartographies correspondant à la signature vibrationnelle de l'échantillon.

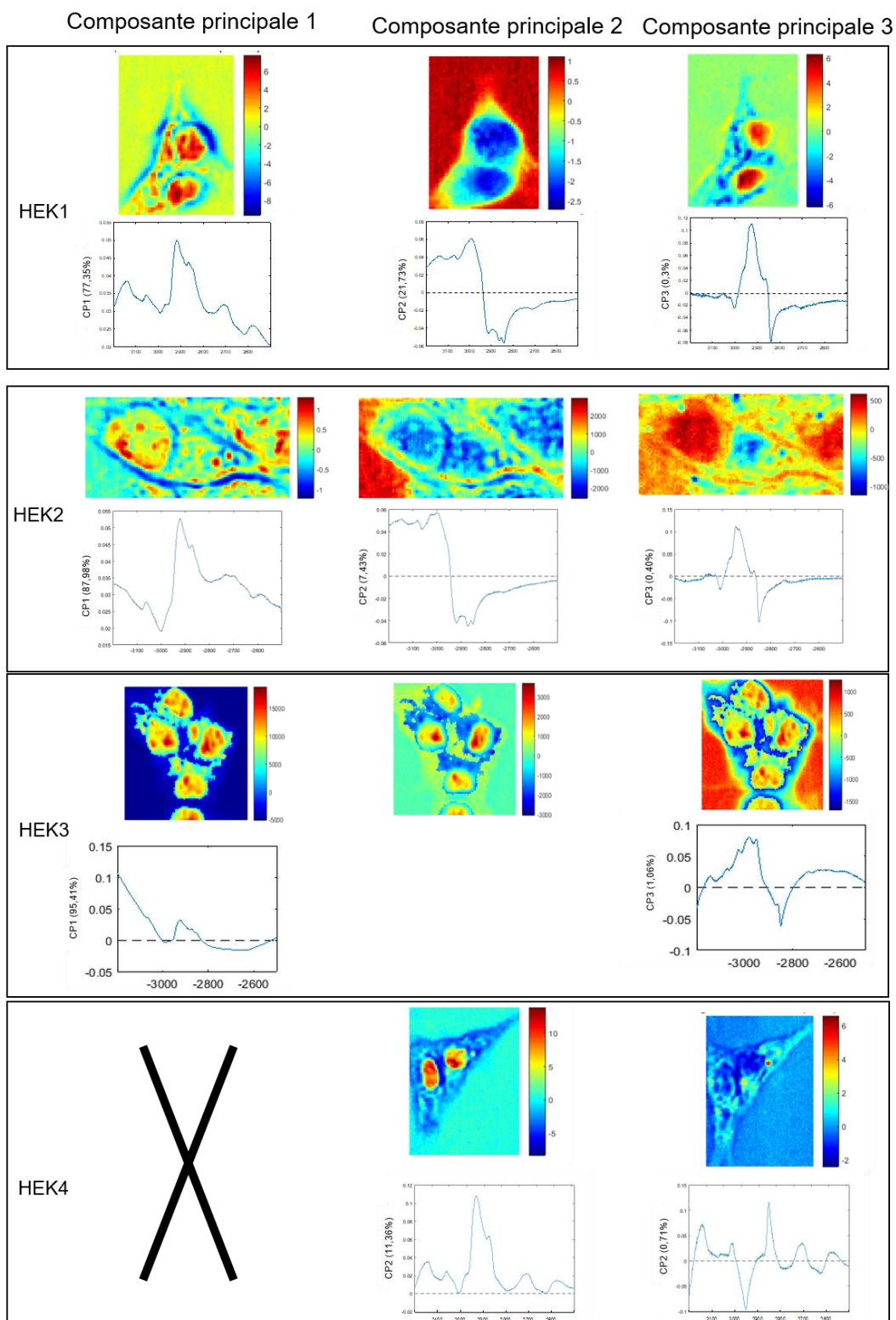


Figure 55 : Représentation des cellules après analyse en composantes principales des cartographies CARS des cellules HEK.

Les cellules HEK sont scannées par microspectroscopie CARS dans la zone CH ($2500-3200\text{ cm}^{-1}$). Les données sont traitées par l'ACP pour les 4 cellules HEK. Pour chaque cellule, sont représentées les cartographies pour chacune des composantes (1, 2 et 3) ainsi que les spectres correspondant.

III. Matériel et méthode

1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire de rein embryonnaire Humaine 293 (HEK293) est cultivée dans du milieu DMEM (4,5 g/L de glucose, Gibco) supplémenté de 10 % v/v de Sérum de Vœux Fœtal (BioWest), 100 unités/mL de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Gibco) à 37 °C, sous 5 % de CO₂, et en atmosphère humide. Pour les analyses CARS, les cellules HEK293 sont cultivées sur des lamelles de verre pour prévenir la génération de signaux CARS non souhaités. Pour cela, les lamelles de verres sont introduites dans une plaque 12 puits, chaque puits estensemencé à une densité de 35 000 cellules/puits.

Après 48 heures de culture, les cellules sont lavées trois fois au PBS puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % (v/v) dans du PBS durant 10 minutes à température ambiante. Après trois lavages au PBS pour éliminer le PFA, les lamelles sont déposées sur des lames de microscope et sellées avec du vernis.

1. MCARS microspectroscopy

Le système M-CARS est une adaptation de la configuration d'épi-détection mis au point par Erwan Capitaine (Capitaine *et al.*, 2018). Il est conçu comme suit : La source de la pompe est un laser à micropuce à commutation passive Q (laser Horus, 1064 nm, 1 ns, 20 kHz, polarisation linéaire, < 0,1 cm⁻¹ largeur de trait). Le faisceau laser est divisé en deux parties à l'aide d'une lame demi-onde et d'un polariseur Glan-Taylor. Une partie est injectée dans une fibre cristalline photonique pour générer une onde Stokes supercontinuum (600-1650 nm). Ce faisceau Stokes est collimaté au moyen d'un miroir parabolique et dirigé vers un filtre long-pass à 1050 nm (Thorlabs, FEL1050). L'autre partie est utilisée comme un faisceau pompe suite à un ajustement de sa puissance avec un filtre à densité neutre variable et son retard avec une ligne de retard.

Ensuite, les faisceaux pompe et Stokes sont combinés spatialement au moyen d'un miroir dichroïque notch (Semrock, NFD01-1064-25x36) et focalisés étroitement sur l'échantillon avec un objectif à ouverture numérique élevée (Olympus, UPlanSApo 60x, N.A. = 1.2, immersion en eau). Le signal CARS généré par l'échantillon est recueilli par un deuxième objectif (Nikon, S Plan Fluor ELWD 60x, N.A. = 0.7), nettoyé de tout signal pompe en utilisant un filtre coupe-bande (Thorlabs, NF1064-44) et dirigé vers un spectromètre (Horiba, LabRam HR Evolution, réseau 600 gr/mm, caméra CCD Synapse).

Les résolutions latérales, axiales et spectrales du microspectroscope CARS sont respectivement de ~ 300 nm, $2\text{ }\mu\text{m}$ et $0,8\text{ cm}^{-1}$. Pendant toutes les expériences, les puissances laser du faisceau de la pompe et du faisceau Stokes au niveau de l'échantillon ont été réglées à 55 mW et 9 mW, respectivement. A cette puissance laser (64 mW au total), la morphologique des cellules ne change pas. Ceci a été confirmé par la visualisation de l'échantillon par imagerie en champ clair. Les spectres ont été acquis de 2500 à 3200 cm^{-1} avec un temps d'acquisition par pixels de 50 millisecondes.

2. Algorithmes pour les traitements

Les spectres ainsi que les cartographies CARS sont traités par deux méthodes :

- Algorithme MSC ou la méthode de correction multiplicative de signal. Elle permet d'éliminer la contribution spectrale provenant du solvant ou de l'extérieur de la cellule. Cet algorithme a été adapté et mis au point durant les travaux d'Erwan Capitaine ;
- Algorithme d'ACP, ou d'analyse en composantes principales, adapté par le Pr. Ludovic Duponchel.

Chapitre IV. Publication 1

Les résultats des expériences précédentes ont conduit à la conclusion suivante : les fluctuations proviennent de la position des cellules dans le cycle cellulaire, seul paramètre variant entre des cellules d'une même lignée. En effet, au cours du cycle, l'organisation et la quantité de nombreuses biomolécules telles que l'ADN, les ARN, les lipides, les protéines varient (Jongsma *et al.*, 2015).

Peu d'études utilisant les technologies vibrationnelles se sont focalisées sur les variations de signaux dues au cycle cellulaire. Une étude en 2006, réalisée par Matthäus *et al.*, a utilisé la microspectroscopie Raman, dans la zone d'empreinte biologique, pour discriminer les différentes phases de la mitose (Matthäus *et al.*, 2006). Ce n'est qu'en 2010 que le Raman cohérent a été utilisé pour discriminer des cellules en interphase et en mitose grâce aux signaux lipidiques (2840 cm^{-1}) et protéiques (2928 cm^{-1}) (Pliss *et al.*, 2010), voire même un nouveau décalage Raman dans la zone CH du spectre (2967 cm^{-1}), associé au désoxyribose (Lu *et al.*, 2015). Ces études restent néanmoins très imprécises sur les mouvements cellulaires attribués au cycle, comme la réorganisation de certains organites ou bien la compaction de l'ADN, par l'intermédiaire de nombreuses protéines.

Afin d'apporter des informations sur la capacité de la microspectroscopie CARS multiplexe (MCARS) à mettre en évidence et à suivre l'évolution des chromosomes durant la mitose, deux signaux Raman dans la zone CH ont été privilégiés de par leurs grandes intensités : ceux correspondant aux liaisons CH_2 (2850 cm^{-1}) et CH_3 (2930 cm^{-1}) respectivement. J'ai effectué une étude sur des cellules en interphase (bloquées au niveau de la transition G1/S), dans les différentes phases de la mitose (prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase), j'ai également comparé les signaux entre des cellules vivantes et fixées par la PFA.

J'ai mis en évidence la possibilité par la microspectroscopie CARS de visualiser l'hétérochromatine, état condensé de la chromatine, grâce aux vibrations des liaisons CH_3 , majoritairement dues aux protéines ; ce phénomène se traduit par une augmentation de l'intensité des signaux lorsqu'il y a une hypercondensation de la chromatine pour donner des chromosomes. Ce changement d'état de la chromatine permet d'observer sans coloration préalable les différentes phases de la mitose. Pour les cellules en interphase (phases G1, S et G2) le contour du noyau est parfaitement visible en raison de l'hétérochromatine accolée à l'enveloppe nucléaire ainsi que les nucléoles régions denses, riches en ribonucléoprotéines (Lam, 2005). Le contour nucléaire disparaît lors d'analyse de cellule en mitose, dès la fin de la prophase en raison de la dissociation de l'enveloppe nucléaire. Grâce à la vibration des liaisons CH_2 , majoritairement associées aux lipides, la plasticité du réticulum endoplasmique peut être observée durant le cycle cellulaire. Passant d'une forme homogène composée de tubules et de feuillettes en interphase à une forme composée uniquement de tubules durant la mitose (Jongsma *et al.*, 2015). Ainsi, grâce à seulement deux décalages Raman, il m'a été possible de discriminer des cellules en interphase des cellules en mitose, avec une bonne distinction des sous-phases de celle-ci. En travaillant avec une population cellulaire synchrone, des cartographies CARS d'une grande reproductibilité ont été obtenues, chose habituellement impossible avec une population cellulaire asynchrone.

L'incidence de l'état de conservation des échantillons biologiques a également été évaluée en comparant les signaux CARS obtenus à partir de cellules fixées ou vivantes en interphase ou en mitose. Les cellules en interphase fixées perdent le signal associé à l'hétérochromatine attachée à la lamina nucléaire, et le noyau est alors moins bien délimité. Quelques études se sont intéressées à identifier les différences de signaux vibrationnels (Raman et CARS) en fonction des solutions de fixation utilisées soit des solvants organiques (méthanol, acétone, ...) ou des aldéhydes (PFA, ...).

Seule des intensités plus faibles sont constatées, comme celles associées à l'ADN et aux protéines après fixation des cellules avec des solvants organiques (Chan *et al.*, 2009 ; Hobro and Smith, 2017 ; Levchenko *et al.*, 2019 ; Read and Whiteley, 2015). De manière surprenante, mon étude a mis en évidence que la fixation des cellules par l'intermédiaire du PFA induisait un décrochage de l'hétérochromatine périphérique associée à la lamina nucléaire. Elle se retrouve ainsi diluée dans le nucléoplasme, elle n'est plus observable par la microspectroscopie CARS. Ainsi, nous démontrons une perte d'informations vibrationnelles et de résolution en cartographie liée à la fixation par la PFA.

OPEN

Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region

Received: 16 May 2019

Accepted: 6 August 2019

Published online: 25 September 2019

Tiffany Guerenne-Del Ben¹, Zakaniaina Rajaofara², Vincent Couderc², Vincent Sol¹, Hideaki Kano^{3,4}, Philippe Leproux^{2,5} & Jean-Michel Petit¹

Coherent Raman microscopy has become a powerful tool in label-free, non-destructive and fast cell imaging. Here we apply high spectral resolution multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (MCARS) microspectroscopy in the high wavenumber region to the study of the cell cycle. We show that heterochromatin - the condensed state of chromatin - can be visualised by means of the vibrational signature of proteins taking part in its condensation. Thus, we are able to identify chromosomes and their movement during mitosis, as well as structures like nucleoli and nuclear border in interphase. Furthermore, the specific organization of the endoplasmic reticulum during mitosis is highlighted. Finally, we stress that MCARS can reveal the biochemical impact of the fixative method at the cellular level. Beyond the study of the cell cycle, this work introduces a label-free imaging approach that enables the visualization of cellular processes where chromatin undergoes rearrangements.

In the last two decades, Raman microspectroscopy has become a powerful tool in label-free cell imaging. It could for example reveal cellular components in neutrophils, such as a multilobed nucleus, lipid droplets, nucleoli and mitochondria¹. It made also possible to identify the endoplasmic reticulum, the Golgi apparatus and intracellular vesicles in HeLa cells². Basically, such identifications are realised by means of the vibrational signature of lipids and proteins. However the sole lipid signature could be used to investigate cell lines such as cancer cells^{3,4} and to differentiate proliferating cells from senescent ones through modifications of the nuclear envelope⁵. Recently Raman microspectroscopy was applied to evaluate the impact of an anti-cancer treatment⁶.

On the other hand, Raman imaging has some drawbacks that limit its dissemination. Namely, the vibrational signal overlaps with autofluorescence, which is inherent in biological samples. This results in a reduction of the signal-to-noise ratio. In connection with this aspect and due to the spontaneous nature of Raman scattering, the analysis time remains long and is generally not consistent with the observation of living cells. To avoid this limitation, the use of coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy is particularly appropriate. Since the demonstration of its high sensitivity and high spatial resolution in 1999⁷, CARS microscopy has been extensively employed to image prokaryotes, mammal and plant cells, human tissues, etc. Commonly, CARS technology is used to analyse lipid content in cells through the strong vibrational signature of methylene (CH₂) groups at 2850 cm⁻¹^{7,8}. Using this signature, authors could monitor the differentiation of fetal skeletal stem cells in adipogenic or chondrogenic cells⁹, the uptake of lipids in monocytes¹⁰ or in fibroblasts¹¹. Others characterized murine stem cells during their differentiation into adipocytes¹². A link between lipid-rich tumour cells and their aggressive comportment was established by CARS analysis¹³. More specifically, it was possible to identify circulating tumour cells using the specific signature of lipids¹⁴.

In a CARS experiment, the sample is illuminated with two laser waves simultaneously, namely the pump (ω_p frequency) and Stokes (ω_s frequency) waves. When the difference $\omega_p - \omega_s$ is equal to the vibration frequency of

¹PEIRENE, EA 7500, University of Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060, Limoges, France. ²XLIM, UMR 7252, University of Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060, Limoges, France. ³Department of Applied Physics, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8573, Japan. ⁴Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8573, Japan. ⁵LEUKOS, 37 rue Henri Giffard, 87280, Limoges, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.L. (email: philippe.leproux@unilim.fr) or J.-M.P. (email: jean-michel.petit@unilim.fr)

the molecular bond of interest, the resonant CARS signal is generated at frequency $2\omega_p - \omega_s$. CARS being a coherent process, the signal intensity can be strongly enhanced compared to spontaneous Raman scattering, allowing to reduce the analysis time^{8,15}.

In order to generate the resonant CARS signal over the full range of Raman shifts (roughly 500–3500 cm^{-1} , including both the fingerprint, CH and OH stretching regions) simultaneously, it is necessary to use a Stokes wave having a very broad spectrum at wavelengths longer than that of the pump. Such radiation can be obtained by generating a supercontinuum in a photonic crystal fibre (PCF)¹⁶. By this way, and by ensuring the synchronicity between the pump and Stokes pulse trains, it is possible to implement so-called “multiplex CARS” (MCARS)^{17,18} or “broadband CARS” (BCARS)^{19,20} microspectroscopy. These configurations can then provide rich vibrational information from biological samples.

To date CARS microscopy/microspectroscopy has been massively applied to the label-free imaging of fixed or living cells, highlighting its ability to discern intracellular constituents such as nucleus, nucleoli, mitochondria, etc. However, these studies generally do not take into account the fact that proliferating cells *in vitro* constitute a heterogeneous cell population, mainly due to cell cycle²¹, during which all cell types change their DNA, RNA, lipid and protein contents. During cell cycle, the cells pass through four distinct phases: G₁, S, G₂ and M. G₁ and G₂ phases are characterized by protein and RNA syntheses in order to prepare cells to S phase (DNA synthesis) then M phase (mitosis)²² respectively. Moreover, the location and organisation of chromatin differs according to M sub-phases: (1) during prophase the chromosomes become observable due to a higher level of chromatin condensation, and the nuclear envelope dissociates; (2) the prometaphase is characterized by the chromosome capture by microtubules, and by the organization of mitotic spindle; (3) in metaphase chromosomes are aligned at the metaphase plate; (4) during anaphase, the sister chromatids of each chromosome separate; (5) telophase corresponds to the end of mitosis with chromatin decondensation and nuclear envelope restructuring; cytokinesis marks the end of cell division.

Since the work by Matthäus *et al.* in 2006 based on spontaneous Raman scattering²³, very few studies of cell cycle have been realised by means of coherent Raman microscopy. In 2010, CARS imaging of proteins (2928 cm^{-1}) and lipids (2840 cm^{-1}) in live mitotic and interphase cells was done, but no correlation was observed between the DNA compaction level and the proteins' signal²⁴. Recently, cell division (prometaphase, anaphase, telophase) was investigated by using CARS in the CH stretching region, as well, and by applying a cumbersome data analysis method rendering images of water, proteins, DNA/proteins and lipids²⁵. The reproducibility of the study was considered by merely analysing a second prometaphase cell. Moreover, this study is somewhat reminiscent of a previous work where linear decomposition of multicolour stimulated Raman scattering (SRS) data was used to image DNA in live mitotic and interphase cells²⁶. Finally, MCARS with 600–3200 cm^{-1} coverage could be used to achieve molecular fingerprinting of living cells at different phases of the cell cycle²⁷. Such spectral coverage includes many vibrational bands in the fingerprint and CH stretching regions with selectivity to DNA/RNA, proteins and lipids.

In this work, we apply MCARS microspectroscopy in the CH stretching vibrational region (2500–3200 cm^{-1}) with high spectral resolution ($<1 \text{ cm}^{-1}$) to the study of cell cycle, including a high number of fixed and living cells in interphase and all sub-phases of mitosis. We show that, throughout the cell cycle, heterochromatin - the condensed state of chromatin - can be visualised in the CH₃ stretching band by means of the vibrational signature of proteins that take part in its condensation. This allows, in particular, localising chromosomes in mitotic cells. Significant spatial discrimination is demonstrated between the CH₃ signal, predominantly localised in the nucleus, and the CH₂ signal that highlights a greater quantity of lipids in the cytoplasm. Moreover, we look into the impact of cell fixation using paraformaldehyde (PFA) on the vibrational signature, with living cells as a reference. This work shows that high spectral resolution MCARS in the CH region is a user-friendly, label-free method enabling the observation of DNA/protein/lipid content with high contrast and short time, suitable for the analysis of living cells.

Results

Verification of cell cycle distribution and morphology. Figure 1 displays the results of flow cytometry analysis for different HEK293 cell cultures. For asynchronous culture, 46% of cells were in G₁ phase, 46% in S phase and only 8% in G₂/M phases (Fig. 1a). After double thymidine block, a large number of cells (68%) was in G₁ phase, versus 32% in S phase (Fig. 1b). As a matter of fact, the thymidine treatment is unable to block all cells at the G₁/S boundary, but it can be concluded that all cells were in interphase. After thymidine and nocodazole treatment, 70% of cells were arrested in M phase (Fig. 1c).

Furthermore, we analysed cell cultures after DAPI staining by means of bright-field and fluorescence microscopies, which allow visualising the morphology of cells and nuclei, respectively (Fig. 1d). For interphase (G₁/S) cells, a typical spread morphology is observed; the nucleus is well delimited, and its staining is heterogeneous. In contrast, mitotic cells exhibit a preferably round shape²⁸; the staining reveals the presence of hypercondensed chromatin (heterochromatin), which contributes to chromosome formation. Moreover, the overall higher fluorescence intensity is characteristic of an abundant binding of DAPI to more condensed DNA. It is noticeable that cells arrested in M phase are prophase cells.

Analysis of fixed cells in interphase (G₁/S) and mitosis (prophase). Figure 2 illustrates the experimental and numerical methodology used for analysing HEK293 cell cultures. First, cells of interest were selected using bright-field and/or fluorescence imaging, depending on whether or not they were stained with DAPI. Then selected cells were mapped by means of high spectral resolution ($<1 \text{ cm}^{-1}$) MCARS microspectroscopy in the 2500–3200 cm^{-1} range. Finally, the vibrational information was extracted by using the maximum entropy method (MEM)²⁹, and cell images were reconstructed at 2850 cm^{-1} (CH₂ symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH₃ symmetric stretching).

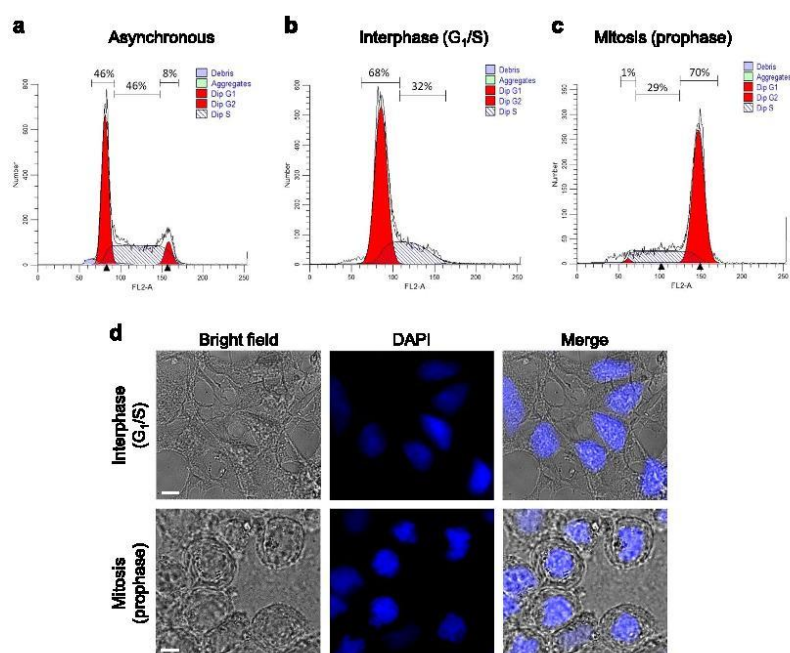


Figure 1. Analysis of HEK293 cell cultures by means of flow cytometry and conventional optical microscopy. (a–c) Flow cytometry histograms of asynchronous, interphase (G₁/S) and mitosis (prophase) populations. Percentages correspond to cells in each cycle phase. (d) Bright-field and fluorescence microscopy images of the same interphase and mitosis populations. Scale bar, 10 μm .

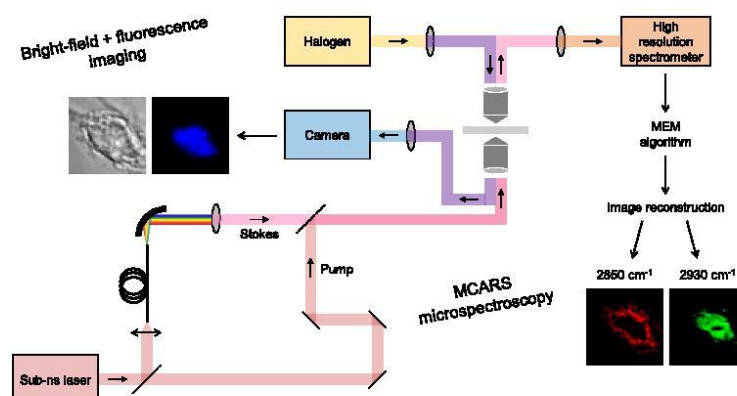


Figure 2. Experimental and numerical methodology for the analysis of cell cultures. First, cells of interest were selected using bright-field and/or fluorescence imaging. Then selected cells were mapped by means of high spectral resolution ($<1 \text{ cm}^{-1}$) MCARS microspectroscopy in the 2500–3200 cm^{-1} range (see Methods for details of the MCARS system). Finally, the vibrational information was extracted by using MEM algorithm, and cell images were reconstructed at 2850 cm^{-1} (CH₂ symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH₃ symmetric stretching).

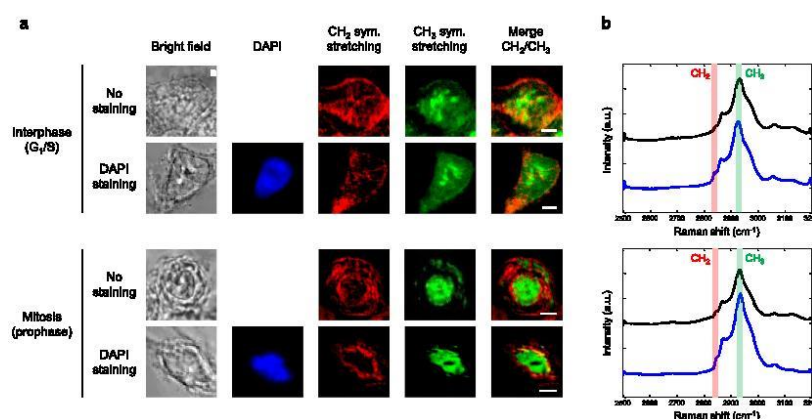


Figure 3. Analysis of interphase and mitotic, stained and unstained, fixed HEK293 cells. (a) Bright-field, fluorescence and MCARS (CH₂, CH₃, merge) images of selected cells. MCARS images were reconstructed at 2850 cm⁻¹ (CH₂ symmetric stretching) and 2930 cm⁻¹ (CH₃ symmetric stretching). Scale bar, 5 μm. (b) Standard deviation of the vibrationally resonant CARS signal between 2500 and 3200 cm⁻¹, computed over the whole analysis window of each cell. Spectra are plotted vertically in the same order as corresponding cells. CH₂ and CH₃ channels are highlighted.

We investigated interphase and mitotic, stained and unstained, HEK293 cells. Figure 3a shows the images obtained in each case. On the whole, CH₂ and CH₃ vibrational signatures do not overlap and thus bring complementary information from the sample. The CH₂ signal - highlighting lipids - is mainly localised in the cytoplasm, when the CH₃ signal - primarily associated with proteins - appears predominantly in the nucleus. The difference in CH₂ signal distribution between interphase and mitosis would indicate the specific organization of the endoplasmic reticulum (ER) during these phases and will be discussed subsequently. Regarding the CH₃ signal, bright spots corresponding to nucleoli are observed inside the nucleus of interphase cells, while the signal extends more homogeneously to the nucleus in mitotic cells. These findings are similar for stained and unstained cells, since the Raman signature of DAPI labelling is expected in the fingerprint region^{30,31}. To confirm this, we computed the standard deviation of the vibrationally resonant CARS signal between 2500 and 3200 cm⁻¹ over the whole analysis window of each cell, as plotted in Fig. 3b. The standard deviation spectra have the same profile in the CH stretching range, and no additional band arises because of DAPI staining. Thus, stained and unstained cells can be indifferently studied by MCARS microspectroscopy in the 2500–3200 cm⁻¹ range.

Next, we quantified the contrast between CH₂ and CH₃ signal intensities in the nucleus for a set of 10 cells in interphase (5 stained, 5 unstained, see Supplementary Fig. 1) and 10 cells in mitosis (4 stained, 6 unstained, see Supplementary Fig. 2). For each cell, a region of interest (ROI) was drawn in the area of strong CH₃ signature (Fig. 4, lower panel), then both CH₂ and CH₃ signal intensities were integrated in this ROI. Figure 4 (upper panel) displays the mean value of CH₂ and CH₃ integrated intensity for the set of interphase and mitotic cells. In either case, the intensity level of CH₃ signature is significantly higher than that of CH₂ signature. It is 3.10-fold higher than that of CH₂ for interphase cells (6.55 ± 1.62 and 2.11 ± 0.65 , respectively), and 2.56-fold higher for mitotic cells (7.77 ± 2.26 and 3.04 ± 0.87 , respectively). These results demonstrate that the biologically relevant complementarity between CH₂ and CH₃ vibrational signatures is obtained with high reproducibility. The CH₂ stretching channel can reveal the ER organization in the cytoplasm. The CH₃ one indicates the protein signal in the nucleus, highlighting nucleoli in particular.

Investigation of all sub-phases of mitosis. The aforementioned methodology was applied to the analysis of DAPI-stained HEK293 cells in the different sub-phases of mitosis (see Fig. 5). To identify each sub-phase easily, cells were observed by fluorescence microscopy before operating MCARS microspectroscopy. It is obvious that, in all sub-phases of mitosis, CH₂ and CH₃ signatures do not overlap, in agreement with previous observations. Interestingly, DAPI and CH₃ signals show a significant colocalization, since the lateral shift between both images in some cases (prophase, prometaphase, metaphase) is clearly due to the different physical principles of these modalities. In other words, there is an uncertainty in the choice of the focal plane for MCARS imaging with respect to that used for fluorescence microscopy. Consistently, CH₂ vibrational signal is predominant in the cytoplasm and does not overlap with the fluorescence signal of DAPI, whatever the sub-phase. The CH₃ vibrational signature allows following the movement of chromosomes during the different sub-phases of mitosis; e.g., the alignment of chromosomes in metaphase, their separation in anaphase, or the formation of chromosome clusters at cell opposite poles in telophase.

Comparative analysis of fixed and living cells. Hoechst 33342 was used for staining the nucleus of living HEK293 cells, since it allows efficient labelling without cell permeabilization. We first investigated interphase

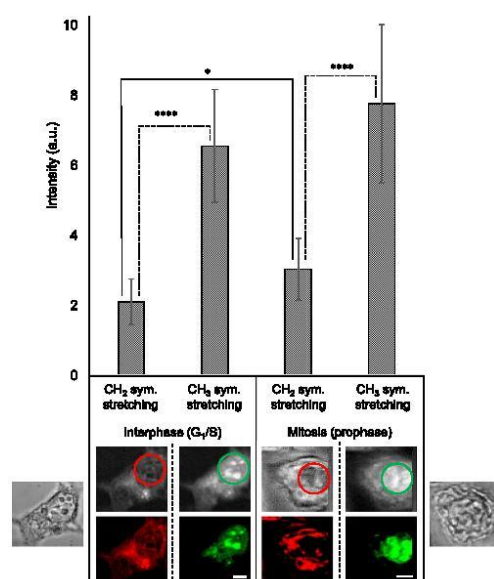


Figure 4. Quantification of the contrast between CH₂ and CH₃ signal intensities in the nucleus of fixed HEK293 cells. Lower panel represents bright-field and MCARS (CH₂, CH₃) images of one interphase (G₁/S) cell and one mitotic (prophase) cell. For each cell, an ROI was drawn in the area of strong CH₃ signature, then CH₂ and CH₃ signal intensities were integrated in this ROI. This method was applied to 10 cells in interphase (5 stained, 5 unstained, see Supplementary Fig. 1) and 10 cells in mitosis (4 stained, 6 unstained, see Supplementary Fig. 2), throughout three independent experiments. Scale bar, 5 μm. Upper panel displays the mean value of CH₂ and CH₃ integrated intensity for this set of interphase and mitotic cells.

(G₁/S), stained and unstained, living cells so as to assess the possible impact of Hoechst labelling on the vibrational signature in the CH stretching region. Actually, this fluorophore is expected to have specific Raman bands in the fingerprint region³², but its contribution in the high wavenumber region, even weak, must be considered³³. Figure 6a shows bright-field, fluorescence and MCARS images obtained for two unstained (upper panel) and two stained (lower panel) cells. As previously, CH₂ and CH₃ signatures are complementary. Two particular features can be observed in the CH₃ channel for both stained and unstained cells, namely the presence of bright intranuclear structures and the visualisation of nucleus border. Based on the images of Hoechst fluorescence, this corresponds to nucleoli and to heterochromatin contiguous to the nuclear envelop, respectively. Therefore, stained living cells can be accurately analysed by MCARS microspectroscopy in the 2500–3200 cm⁻¹ range, since Hoechst labelling does not have any noteworthy effect on the vibrational signature. This assumption was corroborated by computing the standard deviation spectra of the vibrationally resonant CARS signal (Fig. 6b), which did not show substantial features due to Hoechst staining.

Then, we could compare fixed and living cells in the presence of DAPI and Hoechst staining, respectively. This study was realised for HEK293 cells and fibroblasts in interphase (G₁/S) and mitosis (prophase), as presented in Fig. 7. In interphase, nucleoli are visible in the CH₃ channel for both fixed and living cells, but the nucleus border is visible in the case of living cells only. This last observation was verified for a set of 10 fixed interphase cells (see Supplementary Fig. 1, where no nucleus border is visible) and 5 living interphase cells (see Figs 6a and 7, where the nucleus border is noticeable). Such phenomenon is therefore related to the cell fixation process and could be probed by means of MCARS microspectroscopy. In mitosis, only chromosomes are observed for both fixed and living cells, as expected.

Discussion

In this work, we apply MCARS microspectroscopy in the CH stretching vibrational region (2500–3200 cm⁻¹) to the analysis of a human cell line during the cell cycle. Generally, to observe the nucleus by vibrational technique through its DNA content, authors use the fingerprint region with Raman shifts at (1) 785 cm⁻¹ corresponding to uracil/thymine ring breathing^{2,6}, (2) 1095 cm⁻¹ corresponding to phosphate symmetric stretching in the DNA backbone^{8,19,34}, (3) 1487 cm⁻¹ and 1578 cm⁻¹ corresponding to adenine/guanine ring breathing, respectively^{19,34}. Another strategy consists in focusing on proteins, which are the main component of heterochromatin (they represent two thirds of its mass). So, in view of the quantity of proteins present in heterochromatin, the analysis in

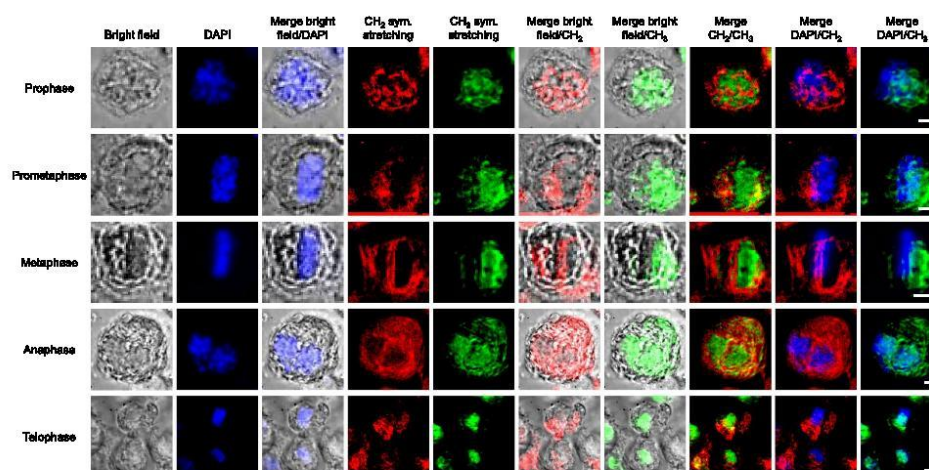


Figure 5. Analysis of DAPI-stained HEK293 cells in the different sub-phases of mitosis, including bright-field, fluorescence and MCARS (CH_2 , CH_3) imaging. Scale bar, 5 μm .

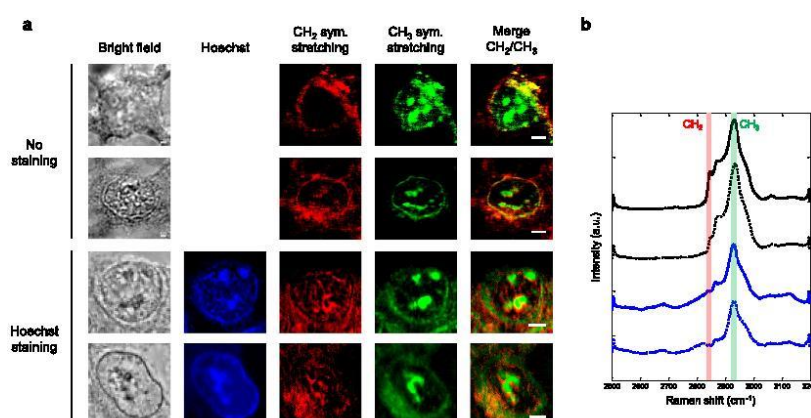


Figure 6. Analysis of interphase (G_1/S), stained and unstained, living HEK293 cells. (a) Bright-field, fluorescence and MCARS (CH_2 , CH_3 , merge) images of selected cells. MCARS images were reconstructed at 2850 cm^{-1} (CH_2 symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching). Scale bar, 5 μm . (b) Standard deviation of the vibrationally resonant CARS signal between 2500 and 3200 cm^{-1} , computed over the whole analysis window of each cell. Spectra are plotted vertically in the same order as corresponding cells. CH_2 and CH_3 channels are highlighted.

the CH region is expected to provide stronger vibrational signatures compared to the fingerprint region, in favour of obtaining high contrast CARS images.

The difference in CH_3 signature intensity between mitotic (prophase) and interphase (G_1/S) cells (Fig. 4) may be due to the condensation state of chromatin: a strong condensation during mitosis (only heterochromatin) which requires a large amount of proteins such as histones, condensins and cohesins; and a lower condensation in interphase during which heterochromatin represents only a part of the whole chromatin in nucleus, mainly in nucleoli³⁵. In this case, the rest of DNA is packaged in euchromatin, which is less condensed and includes a small amount of proteins, mostly histones. Besides, for interphase fixed (Figs 3 and 4) and living (Figs 6 and 7) cells, heterochromatin is depicted in the CH_3 stretching channel as the nucleolar structures, corresponding to the bright spots observed in the nucleus with DAPI or Hoechst fluorescence, respectively. We cannot exclude that

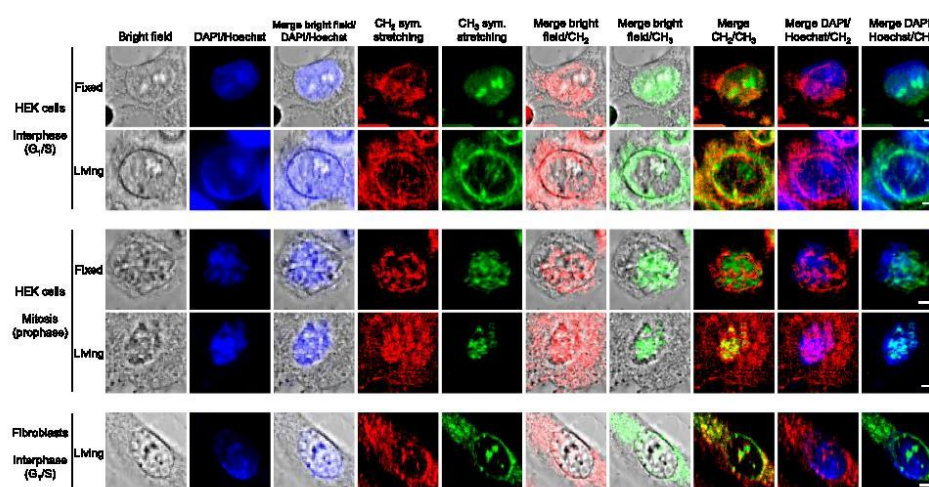


Figure 7. Analysis of interphase and mitotic, stained, fixed and living, HEK293 cells and fibroblasts, including bright-field, fluorescence and MCARS (CH_2 , CH_3) imaging. Fixed and living HEK293 cells were stained with DAPI and Hoechst 33342, respectively. Living fibroblasts were stained with Hoechst 33342. Scale bar, 5 μm .

CH_3 stretching at 2930 cm^{-1} corresponds mainly to proteins. It may also include a signal due to the presence of 5-methylcytosine, which is a hallmark of heterochromatin³⁶.

Regarding the CH_2 vibrational signature, it is primarily associated to lipids and therefore to plasma and organelle membranes. During the cell cycle, there is a remodelling and reorganization of the organelles in the cytoplasm. Among them, the ER corresponds to a large part of endogenous membranes. During interphase, the ER displays a typical reticular network of cisternae (sheets) and tubules, but it is predominantly organised as extended cisternae during mitosis³⁷. This cisternal organisation of the ER is obvious for unstained prophase cells of Supplementary Fig. 2, indicating the effectiveness of MCARS microspectroscopy for probing the specific ER morphology during mitosis. Additionally, we could observe that the ER accumulates at the spindle poles and is excluded from the central area in prometaphase/metaphase³⁸: this phenomenon is clearly visualised in the CH_2 stretching channel for the prometaphase cell of Fig. 5.

We now discuss the impact of cell fixation on the visualisation of the nucleus border. For living cells only, the border of the nucleus is clearly visible through CH_3 vibrational signature (Figs 6 and 7). This may be explained by the presence of heterochromatin, which binds indirectly to the nuclear envelope by means of proteins involved in tethering chromatin during interphase. Many nuclear envelope transmembrane proteins (NETs) binding chromatin have been identified, such as MAN1, LAP2 β or emerin. They interact with chromatin proteins or methylated histones, and also with nuclear lamina^{39,40}. Therefore, heterochromatin is retained at the inner nuclear membrane and allows to delimitate the nucleus in cell through its CH_3 vibrational signature. When cells are fixed with PFA, the nuclear envelope is biochemically modified. The treatment may induce a loss of interaction between the NETs and the heterochromatin, which is no more connected to the inner nuclear membrane and may be released in the nucleoplasm. Only nucleoli, which contain a high quantity of heterochromatin, remain observable. These results are relevant in view of the numerous studies of cells fixed by PFA based on vibrational technologies.

For the simultaneous observation of chromosome movement during mitosis and of other structures in cell such as ER by epifluorescence, confocal, or two-photon microscopy, it is necessary to label DNA with specific dyes and cell compartment with specific antibodies. In both cases, cells must be permeabilized. Specific cell compartment labelling often requires the use of a primary antibody associated to a secondary one coupled to a fluorochrome. We show that MCARS microspectroscopy allows to directly visualize different cell components (chromosomes, ER) without labelling and cell permeabilization.

This work shows that high spectral resolution MCARS microspectroscopy in the high wavenumber region allows to visualise proliferation, the most common cellular process, with no prior labelling. By means of the vibrational signature of condensation proteins, structures like nucleoli, nuclear border and chromosomes can be identified. Furthermore, the structuration of the cytoplasm and especially the ER organisation can be effectively probed through the signature of lipids. It is also stressed that MCARS can reveal the impact of the fixative method on these structures. With this label-free imaging approach, it will be possible to visualize other cellular processes for which chromatin undergoes rearrangements.

Methods

Cell culture. Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were cultured in a DMEM medium (4.5 g/L of glucose, Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (BioWest), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco) at 37°C under humidified atmosphere and 5% CO₂.

Fibroblast primary culture was seeded in a DMEM medium (4.5 g/L of glucose, Gibco) supplemented with amphotericin B at 1 µg/mL (Gibco), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and 10% (v/v) fetal calf serum at 37°C under humidified atmosphere and 5% CO₂.

HEK293 cells and fibroblasts were grown on uncoated glass slides to prevent generation of vibrational signal from the holder during the upcoming MCARS analysis. We used 12-well plates in which we introduced 18 mm diameter round glass coverslips. Cells were seeded at a density of 35,000 cells per well.

Cell synchronization. To obtain populations of cells at G₁/S boundary, we used a double thymidine block, since thymidine is inhibitor of DNA synthesis. After 48 h of culture in 12-well plate, cells were treated with thymidine at 2 mM during 18 h, released for 9 h by washing out the thymidine and then blocked again by addition in the culture medium of 2 mM of thymidine for 17 h⁴¹.

Concerning cell arrest in mitosis (prophase), after 48 h of culture, cells were treated with thymidine at 2 mM during 18 h. Then, cells were washed in DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) and released for 3 h in complete medium allowing to enter S phase. Finally, cells were blocked with nocodazole at 100 ng/mL during 12 h⁴¹.

To analyse the different sub-phases of mitosis, cells were blocked in prophase as described above. After washing with DPBS to remove nocodazole, 1 mL of complete culture medium was added to the wells. Therefore, cells could advance synchronously in mitosis. Every 30 min, cells were washed and fixed.

Cell fixation and staining. *Unlabelled fixed cells.* After synchronization, cells were washed three times with DPBS and fixed by PFA 4% (v/v) in DPBS during 10 min at room temperature. After three washings to eliminate PFA, the coverslip was sealed with nail polish on a microscopy glass slide.

Fixed cells with DAPI staining. After fixation and washing, the nuclei were labelled with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) at 1 µg/mL for 5 min. Then the cells were washed, and the coverslip sealed as previously.

Living cells with Hoechst staining. Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) at 10 µg/mL was used during 15 min for staining living cells. Then the cells were washed, and the coverslip sealed as previously.

Flow cytometry. Flow cytometry analysis was realized before (as a negative control) and after cell synchronization with 10⁶ cells. After centrifugation at 1500 RPM, the pellet was suspended in 300 µL of cold PBS and rapidly in 700 µL of cold ethanol (100%). The cell suspension was preserved at -20°C overnight. Then cells were washed twice with DPBS, re-suspended with 1 mL of DPBS and treated with RNase A (Sigma-Aldrich) at 1 µg/mL for 20 min at room temperature. After that, cells were labelled with propidium iodide (0.5 mg/mL) and immediately analysed by means of FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer. The resulting cell distributions were computed by Modfit software in order to determine the proportion of cells in the different phases of the cell cycle.

Fluorescence microscopy. Stained cells were observed with an epifluorescence microscope (Leica DMI4000B). Data were processed using MetaMorph software (Molecular Devices).

MCARS microspectroscopy. The MCARS system is an adaptation, in forward configuration, of our epi-detected custom-built setup⁴². It is designed as follows. The pump source is a passively Q-switched microchip laser (Horus Laser, 1064 nm, 1 ns, 20 kHz, linearly polarized, <0.1 cm⁻¹ linewidth). The laser beam is divided into two parts by using a half-wave plate and a Glan-Taylor polarizer. One part is injected into a photonic crystal fibre to generate a supercontinuum Stokes wave (600–1650 nm). This Stokes beam is collimated by means of a parabolic mirror and directed to a long-pass filter at 1050 nm (Thorlabs, FEL1050). The other part is used as the pump radiation of the CARS process after adjusting its power with a variable neutral density filter and its delay with a delay line. Then pump and Stokes beams are spatially combined through a notch dichroic beamsplitter (Semrock, NFD01-1064-25 × 36) and tightly focused onto the sample with a high numerical aperture microscope objective (Olympus, UPlanSApo 60x, N.A. = 1.2, water immersion). The position of the sample is controlled by means of a translation stage. The CARS signal generated by the sample is collected by a second microscope objective (Nikon, S Plan Fluor ELWD 60x, N.A. = 0.7), cleaned from any remaining pump signal by using a notch filter (Thorlabs, NF1064-44) and guided into a spectrometer (Horiba, LabRam HR Evolution, 600 gr/mm grating, Synapse CCD camera). In order to observe stained cells via the fluorescence of DAPI or Hoechst, the M-CARS system was complemented with a halogen light source, appropriate excitation and emission filters, and a dedicated CCD camera (Thorlabs, 1500M-GE).

The lateral, axial and spectral resolutions of the CARS microspectroscope are ~300 nm, 2 µm and 0.8 cm⁻¹ respectively. During all experiments, the laser power of pump and Stokes radiations at the sample position was set at 55 mW and 9 mW, respectively. At this laser power (64 mW in total), no morphological change of cells was observed. This was confirmed by visualizing the sample with bright-field and/or fluorescence imaging.

After being selected by means of bright-field and/or fluorescence imaging, cells were analysed by MCARS microspectroscopy, using a lateral step of 300 nm for the cross-section mapping. Spectra were acquired from 2500 to 3200 cm⁻¹ with 50 ms pixel dwell time and processed by using the MEM so as to extract the pure vibrationally resonant signal, which corresponds to the imaginary part of the third order nonlinear susceptibility (Im{χ⁽³⁾})²⁹.

Data Availability

The datasets generated during the current study are available from corresponding author P.L. (philippe.leproux@unilim.fr) on reasonable request.

References

- van Manen, H.-J., Kraan, Y. M., Roos, D. & Otto, C. Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 10159–10164 (2005).
- Matthäus, C., Chernenko, T., Newmark, J. A., Warner, C. M. & Diem, M. Label-Free Detection of Mitochondrial Distribution in Cells by Nonresonant Raman Microspectroscopy. *Biophysical Journal* **93**, 668–673 (2007).
- Scalfi-Happ, C., Udart, M., Hauser, C. & Rück, A. Investigation of lipid bodies in a colon carcinoma cell line by confocal Raman microscopy. *Medical Laser Application* **26**, 152–157 (2011).
- Abramczyk, H. *et al.* The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *The Analyst* **140**, 2224–2235 (2015).
- Mariani, M. M. *et al.* Micro-Raman Detection of Nuclear Membrane Lipid Fluctuations in Senescent Epithelial Breast Cancer Cells. *Analytical Chemistry* **82**, 4259–4263 (2010).
- Kang, J. *et al.* Investigating Effects of Proteasome Inhibitor on Multiple Myeloma Cells Using Confocal Raman Microscopy. *Sensors* **16**, 2133 (2016).
- Zumbusch, A., Holtom, G. R. & Xie, X. S. Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Physical Review Letters* **82**, 4142–4145 (1999).
- Cheng, J.-X., Jia, Y. K., Zheng, G. & Xie, X. S. Laser-Scanning Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy and Applications to Cell Biology. *Biophysical Journal* **83**, 502–509 (2002).
- Moura, C. C., Tare, R. S., Oreffo, R. O. C. & Mahajan, S. Raman spectroscopy and coherent anti-Stokes Raman scattering imaging: prospective tools for monitoring skeletal cells and skeletal regeneration. *Journal of The Royal Society Interface* **13**, 20160182 (2016).
- Weeks, T., Schie, I., den Hartigh, L. J., Rutledge, J. C. & Huser, T. Lipid-cell interactions in human monocytes investigated by doubly-resonant coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics* **16**, 021117 (2011).
- Nan, X., Cheng, J.-X. & Xie, X. S. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Lipid Research* **44**, 2202–2208 (2003).
- Lee, Y. J. *et al.* Quantitative, Label-Free Characterization of Stem Cell Differentiation at the Single-Cell Level by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Tissue Engineering Part C: Methods* **20**, 562–569 (2014).
- Le, T. T., Huff, T. B. & Cheng, J.-X. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer* **9** (2009).
- Mitra, R., Chao, O., Urasaki, Y., Goodman, O. B. & Le, T. T. Detection of Lipid-Rich Prostate Circulating Tumour Cells with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *BMC Cancer* **12** (2012).
- Rodriguez, L. G., Lockett, S. J. & Holtom, G. R. Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: A biological review. *Cytometry Part A* **69A**, 779–791 (2006).
- Leproux, P. *et al.* New opportunities offered by compact sub-nanosecond supercontinuum sources in ultra-broadband multiplex CARS microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **42**, 1871–1874 (2011).
- Okuno, M., Kano, H., Leproux, P., Couderc, V. & Hamaguchi, H. Ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared. *Optics Letters* **33**, 923 (2008).
- Okuno, M. *et al.* Quantitative CARS Molecular Fingerprinting of Single Living Cells with the Use of the Maximum Entropy Method. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 6773–6777 (2010).
- Parekh, S. H., Lee, Y. J., Amer, K. A. & Cicerone, M. T. Label-Free Cellular Imaging by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Biophysical Journal* **99**, 2695–2704 (2010).
- Camp, C. H. Jr. *et al.* High-speed coherent Raman fingerprint imaging of biological tissues. *Nature Photonics* **8**, 627–634 (2014).
- Czamara, K. *et al.* Impact of cell cycle dynamics on pathology recognition: Raman imaging study. *Journal of Biophotonics* **12**, e201800152 (2019).
- Harper, J. V. & Brooks, G. The Mammalian Cell Cycle: An Overview. in *Cell Cycle Control* **296**, 113–154 (Humana Press, 2004).
- Matthäus, C., Boydston-White, S., Miljković, M., Romeo, M. & Diem, M. Raman and Infrared Microspectral Imaging of Mitotic Cells. *Applied Spectroscopy* **60**, 1–8 (2006).
- Pliss, A., Kuzmin, A. N., Kachynski, A. V. & Prasad, P. N. Nonlinear Optical Imaging and Raman Microspectrometry of the Cell Nucleus throughout the Cell Cycle. *Biophysical Journal* **99**, 3483–3491 (2010).
- Karuna, A. *et al.* Label-Free Volumetric Quantitative Imaging of the Human Somatic Cell Division by Hyperspectral Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Analytical Chemistry* **91**, 2813–2821 (2019).
- Lu, F.-K. *et al.* Label-free DNA imaging *in vivo* with stimulated Raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 11624–11629 (2015).
- Yoneyama, H. *et al.* Invited Article: CARS molecular fingerprinting using sub-100-ps microchip laser source with fiber amplifier. *APL Photonics* **3**, 092408 (2018).
- Cadart, C., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Le Berre, M., Piel, M. & Matthews, H. K. Exploring the Function of Cell Shape and Size during Mitosis. *Developmental Cell* **29**, 159–169 (2014).
- Vartiainen, E. M., Rinia, H. A., Müller, M. & Bonn, M. Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Optics Express* **14**, 3622 (2006).
- Dou, X. *et al.* Quantitative analysis of double-stranded DNA amplified by a polymerase chain reaction employing surface-enhanced Raman spectroscopy. *Applied Optics* **37**, 759 (1998).
- Krause, M., Radt, B., Rösch, P. & Popp, J. The investigation of single bacteria by means of fluorescence staining and Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **38**, 369–372 (2007).
- Uzunbajakava, N. & Otto, C. Combined Raman and continuous-wave-excited two-photon fluorescence cell imaging. *Optics Letters* **28**, 2073 (2003).
- Pully, V. V., Lenferink, A. & Otto, C. Hybrid Rayleigh, Raman and two-photon excited fluorescence spectral confocal microscopy of living cells. *Journal of Raman Spectroscopy* **41**, 599–608 (2009).
- Matthews, Q., Jirasek, A., Lum, J., Duan, X. & Brolo, A. G. Variability in Raman Spectra of Single Human Tumor Cells Cultured *in vitro*: Correlation with Cell Cycle and Culture Confluency. *Applied Spectroscopy* **64**, 871–887 (2010).
- Lam, Y. W. The nucleolus. *Journal of Cell Science* **118**, 1335–1337 (2005).
- Lewis, J. & Bird, A. DNA methylation and chromatin structure. *FEBS Letters* **285**, 155–159 (1991).
- Lu, L., Ladinsky, M. S. & Kirchhausen, T. Cisternal Organization of the Endoplasmic Reticulum during Mitosis. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 3471–3480 (2009).
- Schlaitz, A.-L. Microtubules as key coordinators of nuclear envelope and endoplasmic reticulum dynamics during mitosis: Prospects & Overviews. *BioEssays* **36**, 665–671 (2014).
- Poleshko, A. & Katz, R. A. Specifying peripheral heterochromatin during nuclear lamina reassembly. *Nucleus* **5**, 32–39 (2014).
- Czapiewski, R., Robson, M. I. & Schirmer, E. C. Anchoring a Leviathan: How the Nuclear Membrane Tethers the Genome. *Frontiers in Genetics* **7**, 82 (2016).

41. Whitfield, M. L. *et al.* Stem-Loop Binding Protein, the Protein That Binds the 3' End of Histone mRNA, Is Cell Cycle Regulated by Both Translational and Posttranslational Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 4188–4198 (2000).
42. Capitaine, E. *et al.* Fast epi-detected broadband multiplex CARS and SHG imaging of mouse skull cells. *Biomedical Optics Express* **9**, 245 (2018).

Author Contributions

T.G.D.B. prepared the samples. Z.R. and P.L. developed the custom-made MCARS system. T.G.D.B. and P.L. performed the experiments and analysed the data. V.C., V.S. and H.K. contributed to discussions. J.M.P. and P.L. supervised and coordinated the project. T.G.D.B., J.M.P. and P.L. wrote the manuscript with contributions from all authors.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50453-0>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary Information

Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region

Tiffany Guerenne-Del Ben¹, Zakaniaina Rajaofara², Vincent Couderc², Vincent Sol¹, Hideaki Kano^{3,4},
Philippe Leproux^{2,5,*}, and Jean-Michel Petit^{1,*}

* Correspondence to philippe.leproux@unilim.fr and jean-michel.petit@unilim.fr

¹ PEIRENE, EA 7500, University of Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

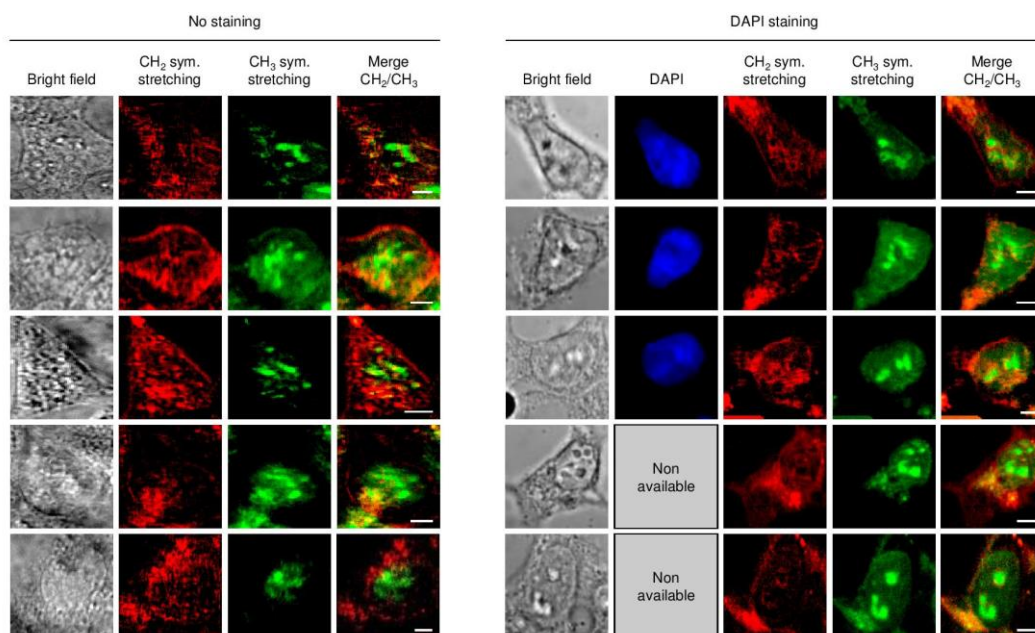
² XLIM, UMR 7252, University of Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

³ Department of Applied Physics, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

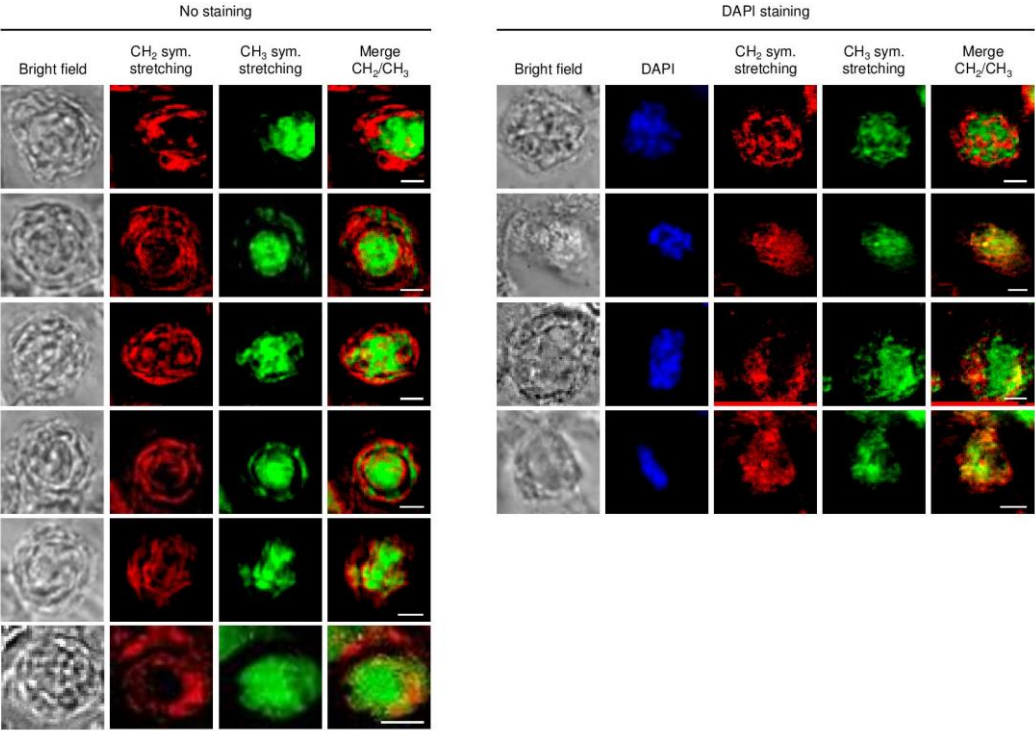
⁴ Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

⁵ LEUKOS, 37 rue Henri Giffard, 87280 Limoges, France

Supplementary Fig. 1 Analysis of interphase, stained and unstained, fixed HEK293 cells. Bright-field, fluorescence and MCARS (CH_2 , CH_3 , merge) images of selected cells. MCARS images were reconstructed at 2850 cm^{-1} (CH_2 symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching). Scale bar, $5\text{ }\mu\text{m}$.



Supplementary Fig. 2 Analysis of mitotic, stained and unstained, fixed HEK293 cells. Bright-field, fluorescence and MCARS (CH_2 , CH_3 , merge) images of selected cells. MCARS images were reconstructed at 2850 cm^{-1} (CH_2 symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching). Scale bar, $5\text{ }\mu\text{m}$.



A la suite de la compréhension, de l'identification et de l'attribution des signaux CARS de cellules en fonction de leur position dans le cycle cellulaire, il m'a été possible de réaliser des comparaisons entre cellules activées ou non, et entre cellules de lignées différentes ; l'objectif étant de pouvoir identifier une cellule cancéreuse d'une cellule saine. Je me suis alors orientée vers l'analyse par les techniques vibrationnelles des conséquences de la présence d'un récepteur transmembranaire impliqué dans le processus cancéreux. À partir d'études approfondies décrites dans la littérature et en tenant compte de nos premiers résultats, il semble difficile d'identifier de manière spécifique un récepteur au moyen de la technologie CARS. En effet, un récepteur étant une protéine, comme tant d'autres dans la cellule, elle ne peut pas avoir de signature vibrationnelle propre. En revanche, il est possible d'évaluer les modifications cellulaires provoquées par l'activation d'un récepteur, comme par exemple des variations métaboliques. Ainsi, de nombreuses études ont montré qu'au cours du processus tumoral, les cellules cancéreuses ont un métabolisme qui évolue, favorisant une prolifération accrue, un échappement aux contrôles cellulaires, et une capacité d'invasion. Parmi ces modifications, le métabolisme lipidique est clairement corrélé à un processus cancéreux, et principalement métastatique avec un mauvais pronostic (Abramczyk *et al.*, 2015; Chaturvedi *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2009; Mitra *et al.*, 2012; Paoletti and Hayes, 2016; Scalfi-Happ *et al.*, 2011).

Parmi les nombreux récepteurs impliqués dans la carcinogenèse, le récepteur TrkB est fortement associé au cancer colorectal et n'a jamais été étudié par la microspectroscopie CARS. TrkB est un récepteur à tyrosine kinase, membre de la famille des récepteurs aux neurotrophines dont le ligand majoritaire est le BDNF (Akil *et al.*, 2016). La deuxième partie de mon travail de thèse a consisté à visualiser par la microspectroscopie CARS les conséquences sur le métabolisme lipidique dues à l'activation de ce récepteur. Une première étude a été réalisée sur des cellules cancéreuses colorectales dont des niveaux d'expression de TrkB diffèrent en fonction du stade du cancer.

J'ai mis en évidence une forte signature de la liaison CH₂ associée à un marquage ponctiforme dans le cytoplasme de cellules cancéreuses présentant une forte expression du récepteur TrkB (HT29-grade II). De plus, l'intensité de signature correspond au niveau d'expression du récepteur dans les cellules HCT116 (stade I) et SW620 (stade III). Par un marquage spécifique des lipides neutres avec le BODIPY, j'ai pu établir un lien entre l'intensité de signature et la présence de gouttelettes lipidiques dans les cellules. Il apparaît clairement que l'augmentation des gouttelettes résulte d'une plus forte présence de récepteur TrkB activé à la surface des cellules.

Afin d'étudier uniquement l'implication du récepteur TrkB, j'ai mené une étude pour relier sa présence à une modification du métabolisme lipidique. Pour cela, des cellules n'exprimant pas le récepteur TrkB (cellules HEK) sont transfectées en stable pour leur faire exprimer celui-ci. L'activation du récepteur par traitement des cellules aux BDNF m'a permis d'observer une augmentation du métabolisme lipidique ; forte intensité des liaisons CH₂ localisées au niveau du pourtour nucléaire lors d'un traitement de courte durée (48 heures), puis la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme, lors d'un traitement plus long (72 heures). Un marquage des lipides neutres au BODIPY, réalisé en parallèle, m'a permis de mettre en évidence que la signature des liaisons CH₂ révèle une accumulation spécifique de lipides neutres dans le réticulum endoplasmique jusqu'à la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme. Il semble donc que l'activation du récepteur TrkB jouerait un rôle dans le métabolisme lipidique des cellules. Pour s'en assurer, un traitement avec un inhibiteur spécifique du récepteur TrkB, le K252a (Nye *et al.*, 1992; Perez-Pinera *et al.*, 2007), a été réalisé. Les cartographies CARS résultantes présentent une quantité de lipides identique à celle des conditions non traitées ou des cellules HEK « sauvages ».

Ainsi, la présence et l'activation du récepteur TrkB est à l'origine d'une accumulation de lipides neutres, majoritairement dans le RE. Grâce à une cinétique de traitement, nous avons pu observer les différentes étapes de la biogenèse des gouttelettes lipidiques : accumulation de lipides neutres au niveau du RE suivie de la formation de gouttelettes lipidiques.

Grâce à cette technique sans marquage, j'ai pu établir une corrélation entre la présence du récepteur TrkB activé et l'augmentation du métabolisme lipidique, elle semble être en lien avec le niveau d'expression du récepteur.



Main Manuscript for

Detection of lipid droplets in cancer cells expressing TrkB using MCARS microspectroscopy

Tiffany Guerenne-Del Ben*,¹, Vincent Couderc², Ludovic Duponchel³, Vincent Sol¹, Philippe Leproux^{2,4}, and Jean Michel Petit¹

¹ PEIRENE, EA 7500, University of Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

² XLIM, UMR 7252, University of Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

³ LASIR, UMR 8516, University of Lille 1, Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

⁴ LEUKOS, 37 rue Henri Giffard, 87280 Limoges, France* Paste corresponding author name(s) here.

Email: xxxxx@xxxx.xxx

Paste ORCIDs (if any) here.

This PDF file includes:

Main Text

Figures 1 to 6

Supplementary figures 1 to 9

Abstract

For many years now, researchers are focused on the identification of specific biomarkers associated to cancer cells to establish diagnosis and prognosis. These biomarkers are mainly proteins (i.e. TrkB receptor) located at the cell surface. They can be activated, and so associated to specific metabolic modifications, i.e. the formation of lipids droplets due to lipid metabolism increase. The following of metabolism changes requires specific dyes for staining of fixed cells. In this work, we propose to use MCARS microspectroscopy to follow the formation of lipid droplets in living cells without preliminary labelling. We observed that MCARS images of cells generated from signal integration of CH₂ stretching modes allow the discrimination between lipid accumulation in the endoplasmic reticulum and the lipid droplet formation. For this purpose, we have created a HEK cell line, which over-expressed the TrkB receptor. We demonstrate that TrkB activation by its ligand BDNF induces the appearance of lipid droplets in cells, which may be abolished using an inhibitor of TrkB: K252a. Moreover, using three colorectal cancer cell lines we also show that the amount of lipid droplets depends on the level of TrkB expression in cells. So, MCARS microspectroscopy allows to follow without staining a drastic metabolism change due to a receptor over-expression, which appears in a majority of cancer cells.

Introduction

Cancer is characterized by an uncontrolled cell growth, and cells spreading in different parts of the body to generate metastases (1). For a number of years, studies are focussed on the identification of specific biomarkers associated to cancer processes. Biomarkers are biomolecules associated with a biological process of physiological or pathological origin. Biomarkers can take different forms such as DNA, mRNA, proteins and metabolites. However, in most cases, cancer biomarkers are proteins such as receptors at the cell surface (1,2). The first receptor family discovered and involved in human cancers, is the ErbB family. In this family, the most common receptors are EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) and HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) (3). Other biomarkers have also been discovered depending on the cancer type. For example, breast cancer can be detected by the presence of biomarkers such as HER2, BRCA1 while KRAS, EGFR1 biomarkers are linked to colorectal cancer (4). Aside from discriminating cancer cells *versus* healthy ones, these biomarkers also allow to determine the cancer stage.

Among these many biomarkers, TrkB receptor belonging to the neurotrophin family is particularly interesting. Surprisingly, the neurotrophin family has been discovered in the central and peripheral nervous systems, thereby regulating the growth and differentiation of neurons (5). The neurotrophin family is composed of three major receptors associated to specific ligands: NGF binding TrkA, BDNF and NT-4 binding TrkB and NT-3 bind TrkC (6).

Expressed in other cells of human, they are associated with tumorigenesis and metastases such as in ovarian, breast, colorectal cancers (6). The BDNF/TrkB complex is mainly correlated with colorectal cancer (CRC) and it is of poor prognosis. The BDNF binding to TrkB induces an autophosphorylation on serine residues of its intracellular domain and an activation of three signalling pathways: Ras/MAPK, PI3Kinase (PI3K)/Akt and PLC- γ /PKC, all leading to a proliferation activation and to changes in cell metabolism (7).

In this study, we interested to identify cancer cells according to their metabolic state through Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (MCARS) microspectroscopy. MCARS microspectroscopy is a label-free and non-destructive imaging technique. It is based on a four-waves mixing process exploiting two lasers i.e. a pump beam at frequency ω_p and a Stokes beam at frequency ω_s . When these two beams are tightly focused, an anti-Stokes beam is generated at a frequency of $2\omega_p - \omega_s$ corresponding to vibrational modes of the probed molecule. Vibrational spectroscopy and more specifically Raman spectroscopy has already demonstrated its ability to highlight changes in lipid metabolism for cells overexpressing HER2 receptor (8), and increases of lipid droplets in cells expressing EGFR (9). Moreover, MCARS microspectroscopy is also a highly sensitive technology to visualize proteins, lipids and heterochromatin in cells in the mid-infrared spectral domain (10,11,12,13).

The aim of our study is to visualize and evaluate modifications of lipid metabolism induced by the activation of the TrkB receptor by BDNF in HEK transfected cells by MCARS microspectroscopy. We correlated the lipid droplet content to TrkB expression level using three colorectal cancer cell lines that represent three grades of the CRC.

Results

Expression of TrkB receptor and lipid droplet content in colorectal cancer cells

The presence of TrkB receptor was analysed in three colorectal cancer cells representing different stages of the pathology: HCT116 (stage I), HT29 (stage II) and SW620 (stage III). We observed that the three cell lines expressed *TrkB* at different levels (Fig. 1A). HT29 cell line presented a higher expression (Delta CT: 11.2 ± 0.03). Its expression was 1.45 and 1.1 lower in HCT116 and SW620 respectively. This observation agreed well with protein expression (Fig. 1B). The truncated form of the receptor was always more abundant whatever the colorectal cell line. This majority form has already been observed for the SW620 cell line (14). The total amount of full length TrkB was 5.79- and 2.07-fold higher in HT29 than in HCT116 and SW620 respectively (Fig. 1B).

These three cell lines have also been analysed by MCARS microspectroscopy by mapping with a high spectral resolution ($< 1 \text{ cm}^{-1}$) in the $2500\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$ spectral range. The CH_2 (2850 cm^{-1} , represented in red in SI Appendix, Fig. S2) and CH_3 (2930 cm^{-1} , represented in green in SI Appendix, Fig. S2) vibrational signatures, mainly associated to lipid and protein contents respectively, are more intense for HT29 than for the two other cell lines. MCARS cell images shown the presence of intense signals in cytoplasm for both vibrational signatures (Fig. 2). These two signatures overlapped and revealed an enrichment in lipids and proteins in these cytoplasm regions leading to a punctiform appearance.

We observed the same type of punctiform structures when cells were stained with BODIPY, a specific marker of neutral lipids constituting the main part of lipid droplets (SI *Appendix*, Fig. S3). The staining was more important for HT29 as observed with MCARS microspectroscopy. We conclude that HT29 cells have an increase lipid metabolism compared to the two other cell lines.

Analysis of stable HEK293 cell line overexpressing TrkB receptor

To ascertain that a link could exist between the TrkB receptor level, its activation and the amount of lipid droplets in cells, we created a cell line, which expresses *TrkB* from the parent HEK293 cell line not expressing it. We obtained from a pool several clones on which, the expression level of *TrkB* has been estimated by qRT-PCR. Two clones tested (clones 1 and 2) have a high expression of *TrkB* (Fig. 3A) whereas its expression in HEK parent cells was not significant (Ct value >30). A slightly weaker expression was observed for HEK-Clone 1 (Delta CT: 3.01 ± 1.14) compared to HEK-Clone2 (Delta CT: 2.07 ± 0.30). Western blot analysis confirmed this result, and the total amount of TrkB was 1.1-fold higher for HEK-Clone2 than for HEK-Clone1. In both clones, the two forms of TrkB receptors were present (Fig. 3B). As a consequence, HEK-Clone2 has been chosen for the following experiments.

Analysis of the TrkB activation by its ligand followed by MCARS microspectroscopy

Thanks to immunolabelling, we have shown that the TrkB receptor was well located in the plasma membrane of cells (Fig. 3C). To ensure that the TrkB receptor was functional, and may bind its ligand, the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), cells have been stimulated by BDNF in order to activate the PI3K/Akt signalling pathway. The addition of BDNF induced the phosphorylation of Akt (P-Akt) due to the activation of its signalling pathway. This form is only present in BDNF treated cells (Fig. 3D).

For HEK-Clone2 analysis, CH₂ and CH₃ vibrational signatures were mainly present in cytoplasm whatever the conditions (Fig. 4). As for colorectal cancer cell lines, these two spectral contributions slightly overlap. The CH₂ signatures were mainly located near the nucleus, and correspond to ER (13), and were of higher intensity when cells were treated with BDNF (SI *Appendix*, Fig. S4). The signal intensity increased for longer treatment times at 72 hours few lipid droplets appeared (Fig. 4). By contrast, the CH₃ peak at 2930 cm⁻¹ seems independent of cell treatment. This may be explained by its less specificity. It includes the CARS signal of lipids, and of proteins and 5-methylcytosines of heterochromatin (13). With BODIPY an accumulation of neutral lipid after 48 hours of treatment was observed, and few lipid droplets appeared at 72 hours (SI *Appendix*, Fig. S5).

For HEK cells in culture with or without BDNF during 72 hours, no differences were observed by MCARS microspectroscopic analysis as for staining with BODIPY (SI *Appendix*, Fig. S6 and Fig. S7). In both cases, only the endoplasmic reticulum could be depicted.

In order to demonstrate that lipid accumulation in ER and lipid droplet formation depend on TrkB activation, we have treated cells with K252a, an inhibitor of the neurotrophin receptor family (15,16). When HEK-Clone2 cells were treated simultaneously with BDNF and K252a, no phosphorylated forms of Akt were depicted (Fig. 5A). MCARS microspectroscopy analysis revealed that a simultaneous treatment with BDNF and K252a abolished the formation of lipid droplets. Indeed, any punctiform staining was observed after this treatment, and same result was obtained with BODIPY (SI *Appendix*, Fig. S8).

K252a inactivated also TrkB on HT29 treated cells. We observed by MCARS microspectroscopy a change in lipid organization. Whereas lipid remained present in cytoplasm in a large amount, they did not constitute lipid droplets of which the amount greatly decreased after 72 hours of treatment (Fig. 6). This observation agreed with BODIPY staining (SI Appendix, Fig. S9). Both analyses shown that activated TrkB receptor is involved in the accumulation of neutral lipid, and so in the generation of lipid droplets, associated to cancer process.

Discussion

A large amount of cancer cells present a higher lipid metabolism (17) often associated with a chemotherapy resistance. The change in lipid metabolism leads to neutral lipid accumulation in ER and to lipid droplet formation (18). The following of lipid amount in cells can be performed by CARS analysis using the strong CH₂ signature mainly associated to lipid droplets (19). Using three CRC cell lines (HCT116, HT29, SW620) we observed by CARS microspectroscopy that the lipid droplet content increased in cells if a high expression level of the neurophin receptor TrkB increased was also observed. Since the lipid droplet amount seems correlated to the expression of the TrkB receptor, we could establish a link between the presence of activated TrkB receptor in cells and the increase of lipid metabolism. Even if the lipid droplet quantities were related to TrkB expression, this cell line present other receptors that can influence the lipid metabolism, like EGF and HER2 receptor (20). So, we generated from the HEK cell line, which does not express TrkB, clones that expressed TrkB in order to only evaluate its influence on lipid metabolism. The generated clones expressed mainly the TrkB full-length form, which was present at the cell surface. The binding of its ligand, the BDNF induces an activation of one of the three majority signalling pathways: PI3Kinase/Akt pathway (8). It has been showed that an activation of PI3Kinase/Akt induces an accumulation of cholesteryl-ester, contributing to formation of the lipid droplets in prostatic cancer cells using Raman spectroscopy analysis (21).

By MCARS microspectroscopy, we observed a higher intensity of CH₂ signature, when HEK-Clone2 cells were treated with BDNF. This CH₂ signature become more intense and structured in cytoplasm at 48 hours, and after 72 hours of treatment, some lipid droplets appeared in cytoplasm. This observation was confirmed by BODIPY staining, a specific dye of neutral lipids (22). The ligand binding induced the activation of PI3Kinase/Akt pathway since we observed the presence phospho-Akt in clone cells after stimulation by BDNF.

To ensure that lipid droplets resulted well from the TrkB activation, we used an inhibitor of tyrosine kinase receptor and mainly for neurotrophin, K252a (15,16). When we analyzed HEK-Clone cells treated with BDNF and K252a simultaneously, we observed an absence of an absence of P-Akt form and no accumulation of neutral lipids. Same results were obtained when HT29 cells, which produce endogenous BDNF (23) were treated with K252a.

Earlier work has shown using specific lipid dyes or by immunolabelling of lipid droplets that biogenesis of lipid droplets occurs in two major steps: the accumulation of neutral lipids in ER bilayer then a generation of lipid droplets (24,25). By MCARS microspectroscopy we were able without preliminary staining to discriminate these both steps: the accumulation of neutral lipids in ER gives a diffuse signal near the nuclear envelop easily seen by MCARS in leaving cells (13), and the generation of lipid droplets leads to a punctiform signal in cytoplasm.

Accumulation of lipids, mainly in droplets form, can be consider as an additional hallmark of cancer (23). In our work, we shown by MCARS microspectroscopy that CRC cells expressing TrkB, which contribute to the lipid droplet formation, and to their chemotherapy resistance. So, MCARS microspectroscopy could be a useful and pertinent tool to analyse cancer cells and to predict via the content and the organization of lipids in cytoplasm their ability of chemoresistance.

Materials and Methods

We transfected HEK cell line with pCDNA3.1+/TrkB vector containing the coding sequence of the TrkB, a neurotrophin receptor, in order to generate HEK-Clone, which expressed this receptor. The expression was controlled by qRT-PCR, and the relative amount of the protein by Western-Blot and immunocytochemistry.

HEK-Clone cells were treated with BDNF, a TrkB ligand for its activation, in order to activate the lipid metabolism to generate lipid droplets in cytoplasm. The lipid increase in cells and droplet formation were followed by MCARS microspectroscopy in CH region (from 2500 to 3200 cm^{-1}) without specific cell staining. At the same time, three CRC cell lines, with different levels of TrkB expression were also analysed. To validate the MCARS observations, BODIPY labelling was also performed.

See SI *Appendix* for more details.

References

1. Wu, L. & Qu, X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. *Chemical Society Reviews* 44, 2963–2997 (2015).
2. Golubnitschaja, O. & Flammer, J. What Are the Biomarkers for Glaucoma? *Survey of Ophthalmology* 52, S155–S161 (2007).
3. Wang, Z. ErbB Receptors and Cancer. in ErbB Receptor Signaling. *Springer New York* 1652, 3–35 (2017).
4. Kamel, H. F. M. & Al-Amodi, H. S. A. B. Exploitation of Gene Expression and Cancer Biomarkers in Paving the Path to Era of Personalized Medicine. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 15, 220–235 (2017).
5. Nakagawara, A. Trk receptor tyrosine kinases: A bridge between cancer and neural development. *Cancer Letters* 169, 107–114 (2001).
6. Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 1545–1564 (2006).
7. Akil, H., Perraud, A., Jauberteau, M-O, Mathonnet, M. Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* 22, 490 (2016).
8. 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* 19, 025001 (2014).
9. Manciu, F.S., Ciubuc, J.D., Parra, K., Manciu, M., Bennet, K.E., Valenzuela, P., Sundin, E.M., Durrer, W.G., Reza, L., and Francia, G. Label-Free Raman Imaging to Monitor Breast Tumor Signatures. *Technology in Cancer Research & Treatment* 16, 461–469 (2017).
10. Mitra, R., Chao, O., Urasaki, Y., Goodman, O. B. & Le, T. T. Detection of Lipid-Rich Prostate Circulating Tumour Cells with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *BMC Cancer* 12, (2012).
11. Le, T. T., Huff, T. B. & Cheng, J.-X. Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer* 9, (2009).
12. Bao, W., Qiu, H., Yang, T., Luo, X., Zhang, H., and Wan, X. Upregulation of TrkB Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Anoikis Resistance in Endometrial Carcinoma. *PLoS ONE* 8, e70616 (2013).
13. Guerenne-Del Ben, T., Rajaofara, Z., Couderc, V., Sol, V., Kano, H., Leproux, P., and Petit, J.-M. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region. *Scientific Reports* 9. (2019).

14. Akil, H., Perraud, A., Mélin, C., Jauberteau, M.-O. & Mathonnet, M. Fine-Tuning Roles of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor, TrkB and Sortilin in Colorectal Cancer Cell Survival. *PLoS ONE* 6, e25097 (2011).
15. Perez-Pinera, P., Hernandez, T., García-Suárez, O., de Carlos, F., Germana, A., del Valle, M., Astudillo, A., and Vega, J.A. The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Molecular and Cellular Biochemistry* 295, 19–26 (2007).
16. Nye, S.H., Squinto, S.P., Glass, D.J., Stitt, T.N., Hantzopoulos, P., Macchi, M.J., Lindsay, N.S., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. *Molecular Biology of the Cell* 3, 677–686 (1992).
17. Tirinato, L., Pagliari, F., Limongi, T., Marini, M., Falqui, A., Seco, J., Candeloro, P., Liberale, C., and Di Fabrizio, E. An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. *Stem Cells International* 2017, 1–17 (2017).
18. Shyu, P., Wong, X. F. A., Crasta, K. & Thibault, G. Dropping in on lipid droplets: insights into cellular stress and cancer. *Bioscience Reports* 38, BSR20180764 (2018).
19. Nan, X., Cheng, J.-X. & Xie, X. S. Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Lipid Research* 44, 2202–2208 (2003).
20. SiShi Li, Elizabeth Buchbinder, Lihua Wu, Jeffrey D. Bjorge, Donald J. Fujita, Shudong Zhu, EGFR and HER2 levels are frequently elevated in colon cancer cells. *Discoveries Reports* 1, e1 (2014).
21. Yue, S., Li, J., Lee, S.-Y., Lee, H.J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T.A., Liu, X., Ratliff, T.L., et al.). Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metabolism* 19, 393–406 (2014).
22. Fam, T., Klymchenko, A. & Collot, M. Recent Advances in Fluorescent Probes for Lipid Droplets. *Materials* 11, 1768 (2018).
23. Tanaka, K., Okugawa, Y., Toiyama, Y., Inoue, Y., Saigusa, S., Kawamura, M., Araki, T., Uchida, K., Mohri, Y., and Kusunoki, M. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)-Induced Tropomyosin-Related Kinase B (Trk B) Signaling Is a Potential Therapeutic Target for Peritoneal Carcinomatosis Arising from Colorectal Cancer. *PLoS ONE* 9, e96410 (2014).
24. Salo, V. T. & Ikonen, E. Moving out but keeping in touch: contacts between endoplasmic reticulum and lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology* 57, 64–70 (2019).
25. Sturley, S. L. & Hussain, M. M. Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum. *Journal of Lipid Research* 53, 1800–1810 (2012).

Figures and Tables

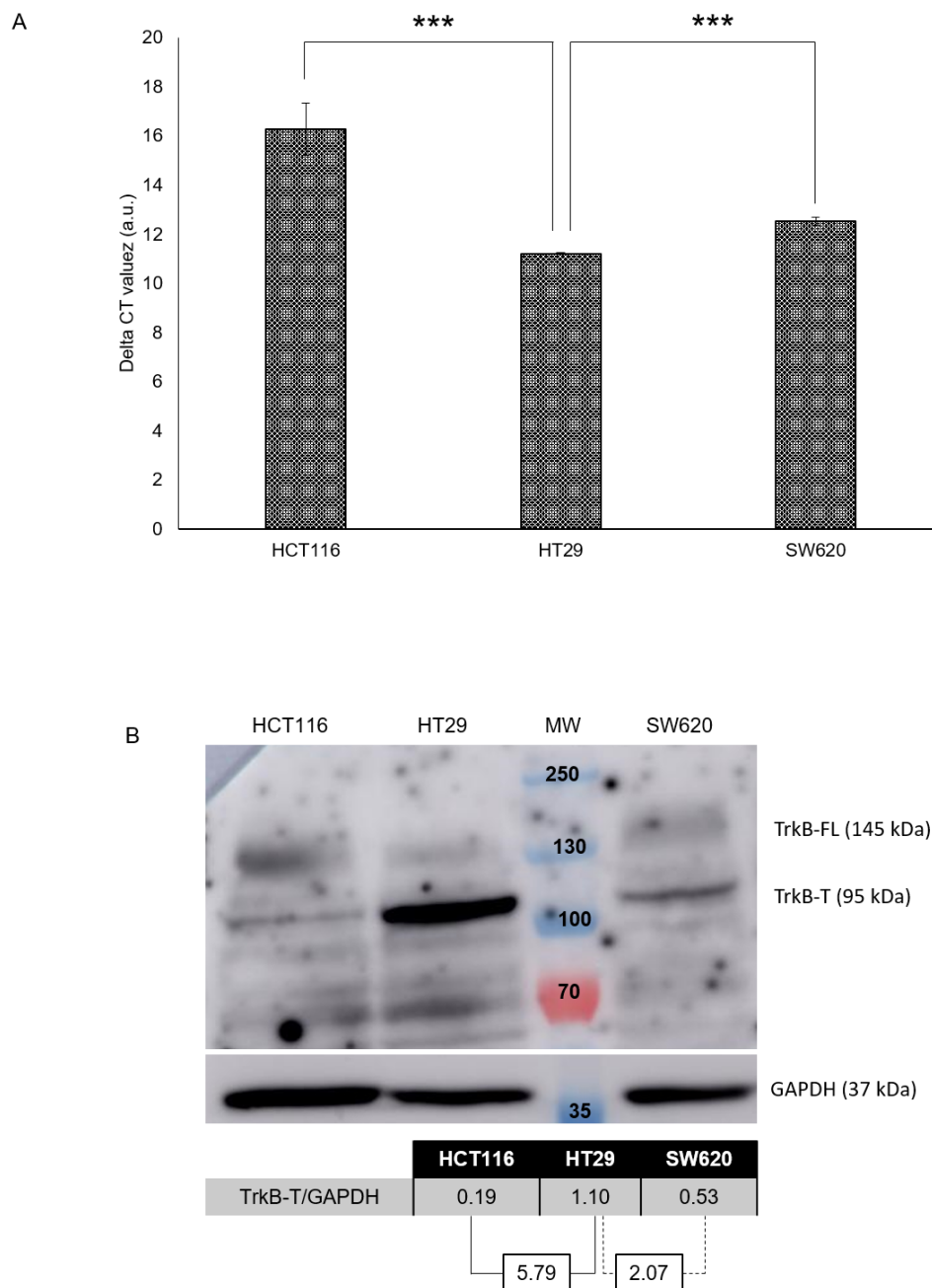


Fig. 1. TrkB expression in three CRC cells line. A: The TrkB expression was estimated by qRT-PCR from 2 ng of cDNA. Histograms correspond to delta CT values for each condition calculated using *GAPDH* expression as reference. B: Western-blot analysis of TrkB expression. After proteins extraction, Western-blot of TrkB was performed with 50 µg of proteins extracted. For each condition, relative expressions of TrkB-T were determined using *GAPDH* as reference. MW: molecular weight, *** p value < 0.001.

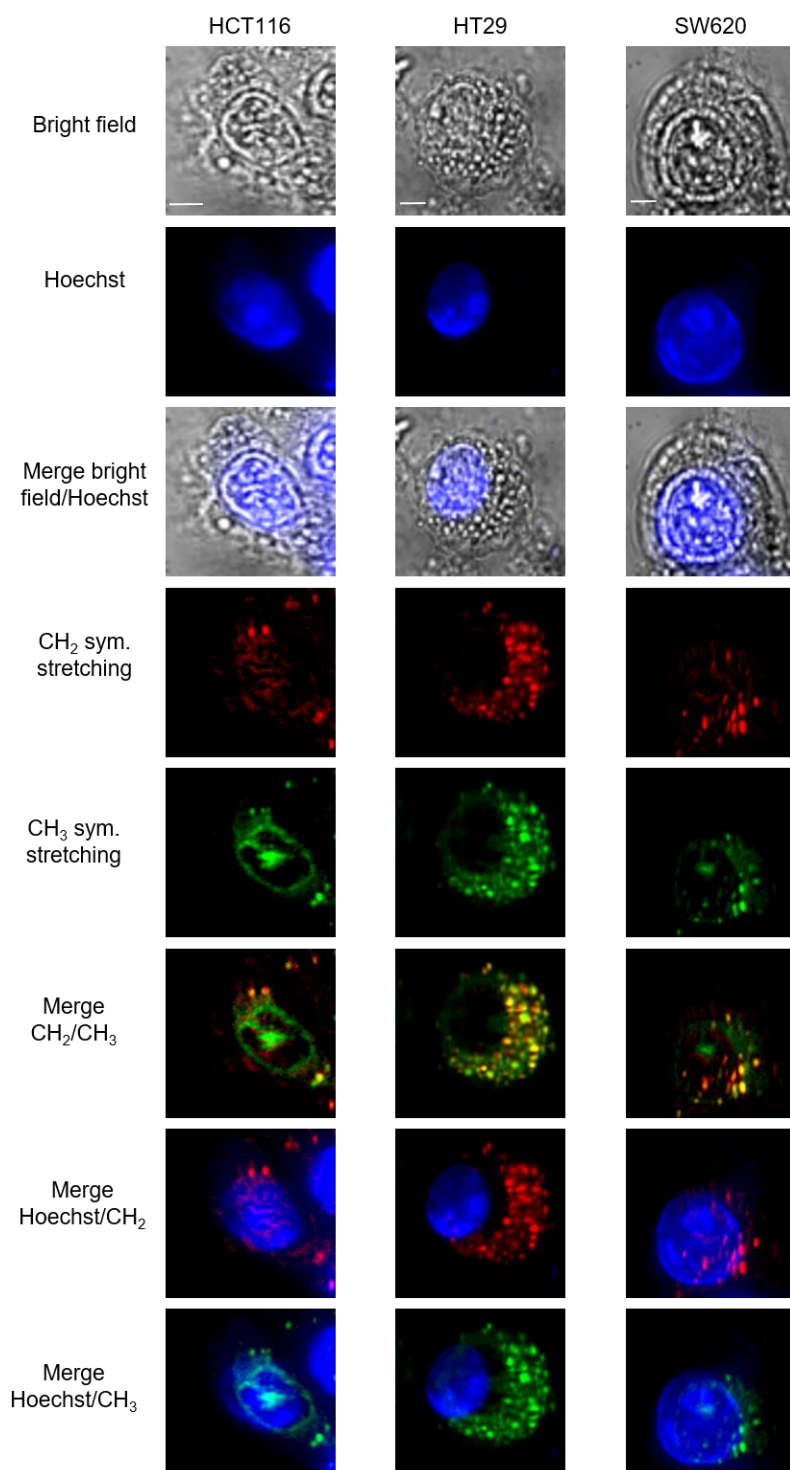


Fig. 2. Analysis of CRC cell line by MCARS. MCARS spectral images of living HCT116, HT29 and SW620 cells including bright-field, and fluorescence (Hoechst 33342) images. MCARS images were reconstructed from signal integration at 2850 cm^{-1} (CH₂ symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH₃ symmetric stretching). Scale bar, 5 μm .

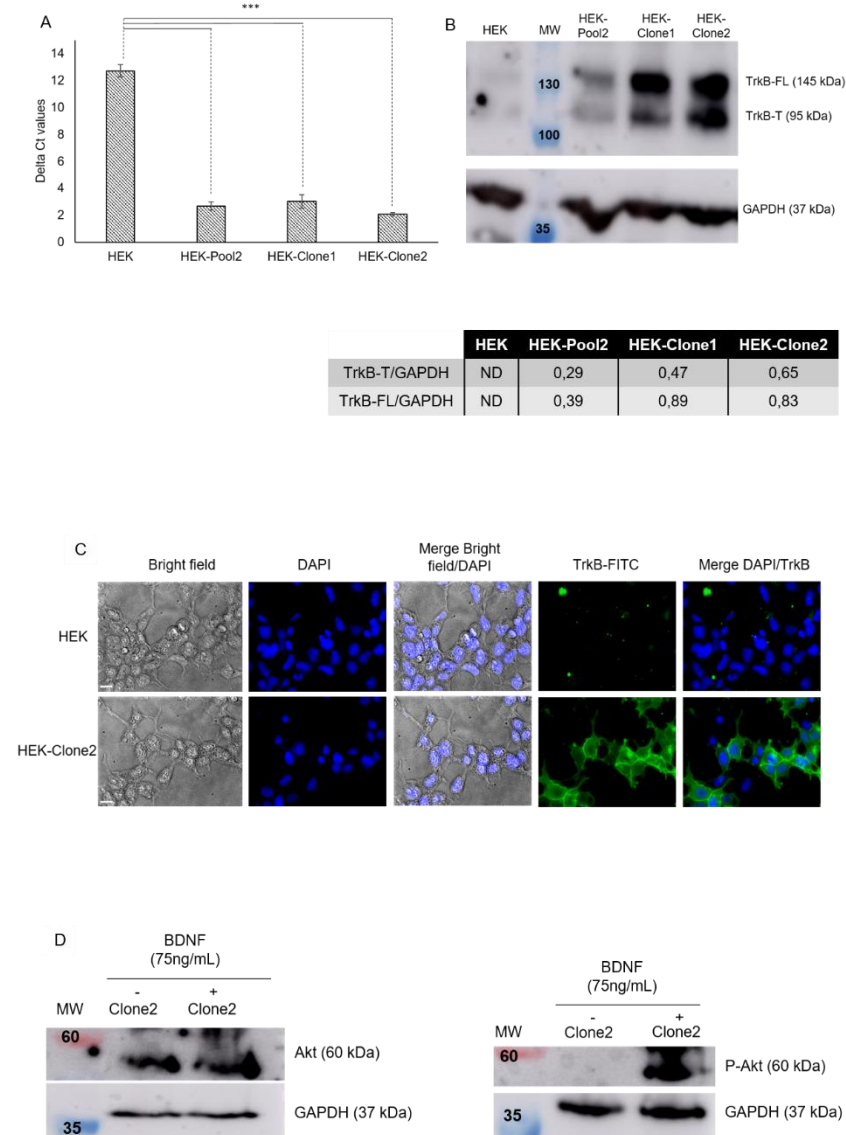


Fig. 3. TrkB expression in transfected HEK cells. A: The *TrkB* expression was estimated by qRT-PCR from 2 ng of cDNA. Histograms correspond to delta CT values for each condition calculated using *GAPDH* expression as reference. B: Western-blot analysis of TrkB expression in HEK clones. After proteins extraction, Western-blot of TrkB was performed with 50 μ g of proteins extracted. For each condition, relative expressions of TrkB-FL and TrkB-T were determined using GAPDH as reference. C: Analysis of TrkB activation by immunofluorescence analysis of parent HEK and HEK-Clone2 cells. The binding of the anti-hTrkB to the receptor was observed using a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (green fluorescence). Nuclei were stained using DAPI (blue fluorescence). D: HEK-Clone2 cells were treated with BDNF at 75 ng/ml during 1 hour. After protein extraction, Western-blot for Akt and P-Akt (phospho-akt) were realized with 50 μ g of proteins. ND: not Determined. MW: molecular weight, *** p value < 0.001.

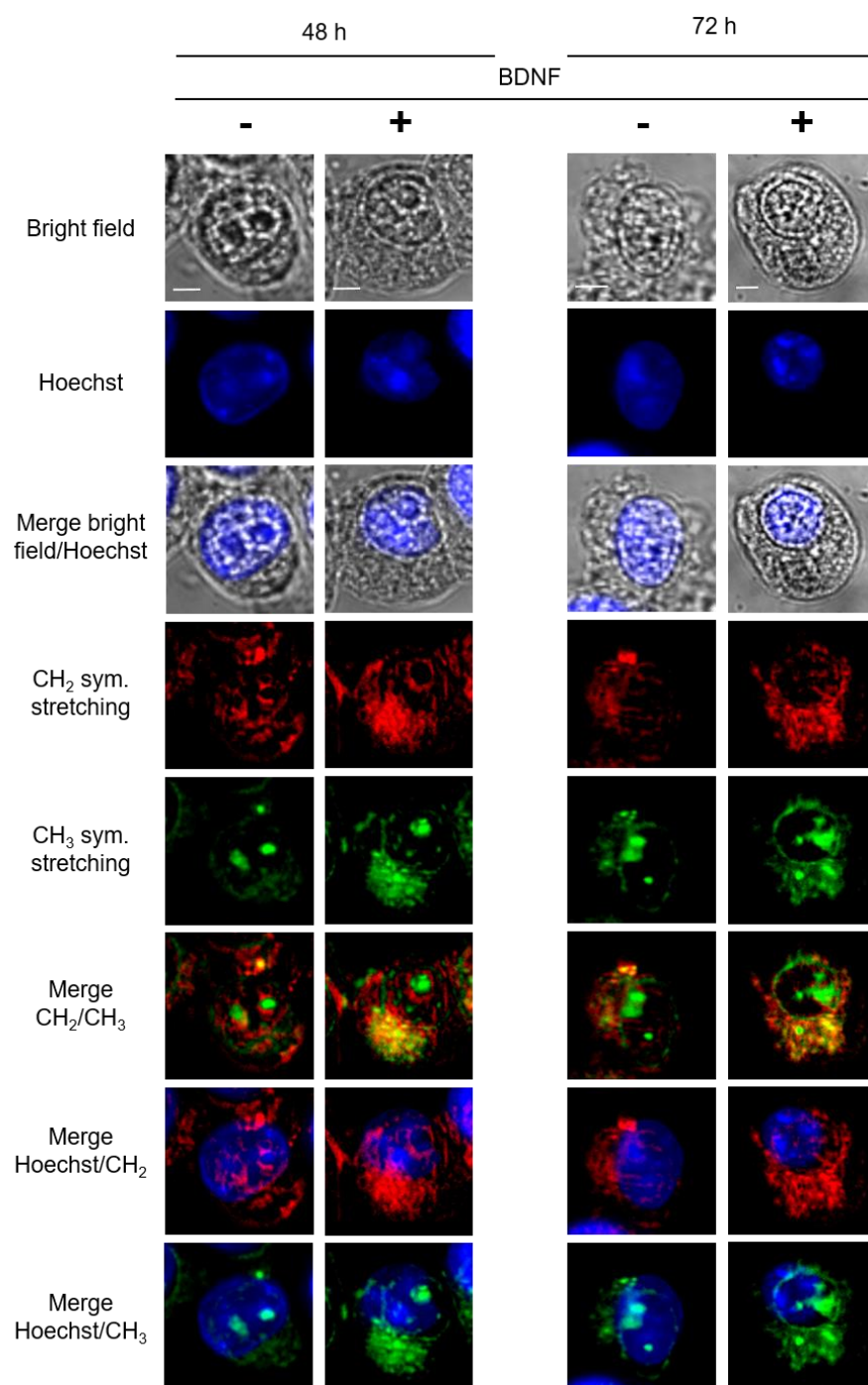


Fig. 4. Analysis of HEK-Clone2 by MCARS spectroscopy after TrkB activation by BDNF. Living HEK-Clone2 were treated with, or without BDNF at 75 ng/ml, during 48 and 72 hours, including bright-field, fluorescence (Hoechst 33342). MCARS images were reconstructed from signal integration at 2850 cm^{-1} (CH₂ symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH₃ symmetric stretching). Scale bar, 5 μm .

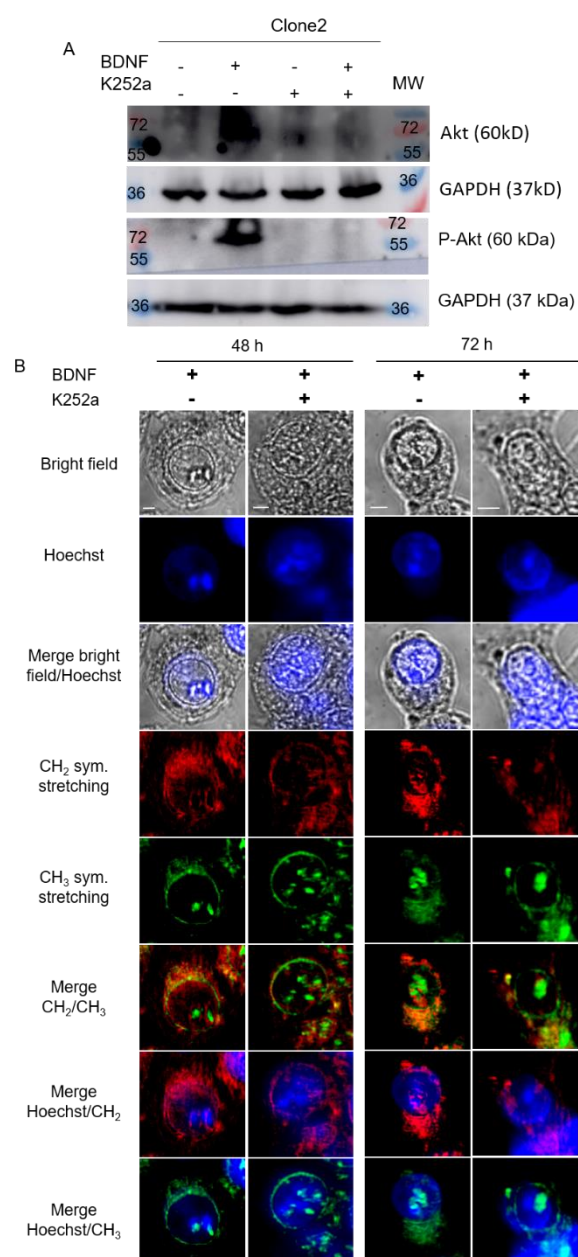


Fig. 5. Analysis of inhibition of TrkB activation by K252a. A: Western-blot analysis of HEK-Clone2 treated with BDNF at 75 ng/ml, and with or without K252a at 100 nM during 1 hour. After protein extraction, Western-blot for Akt and P-Akt (phospho-Akt) were realized with 50 μ g of proteins. B: Analysis of HEK-Clone2 by MCARS spectroscopy after a dual treatment with BDNF and K252a. Living HEK-Clone2 were treated with BDNF at 75 ng/ml and with or without K252a at 100 nM, during 48 and 72 hours, including bright-field, and fluorescence (Hoechst 33342) images. MCARS images were reconstructed from signal integration at 2850 cm^{-1} (CH_2 symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching). Scale bar, 5 μm .

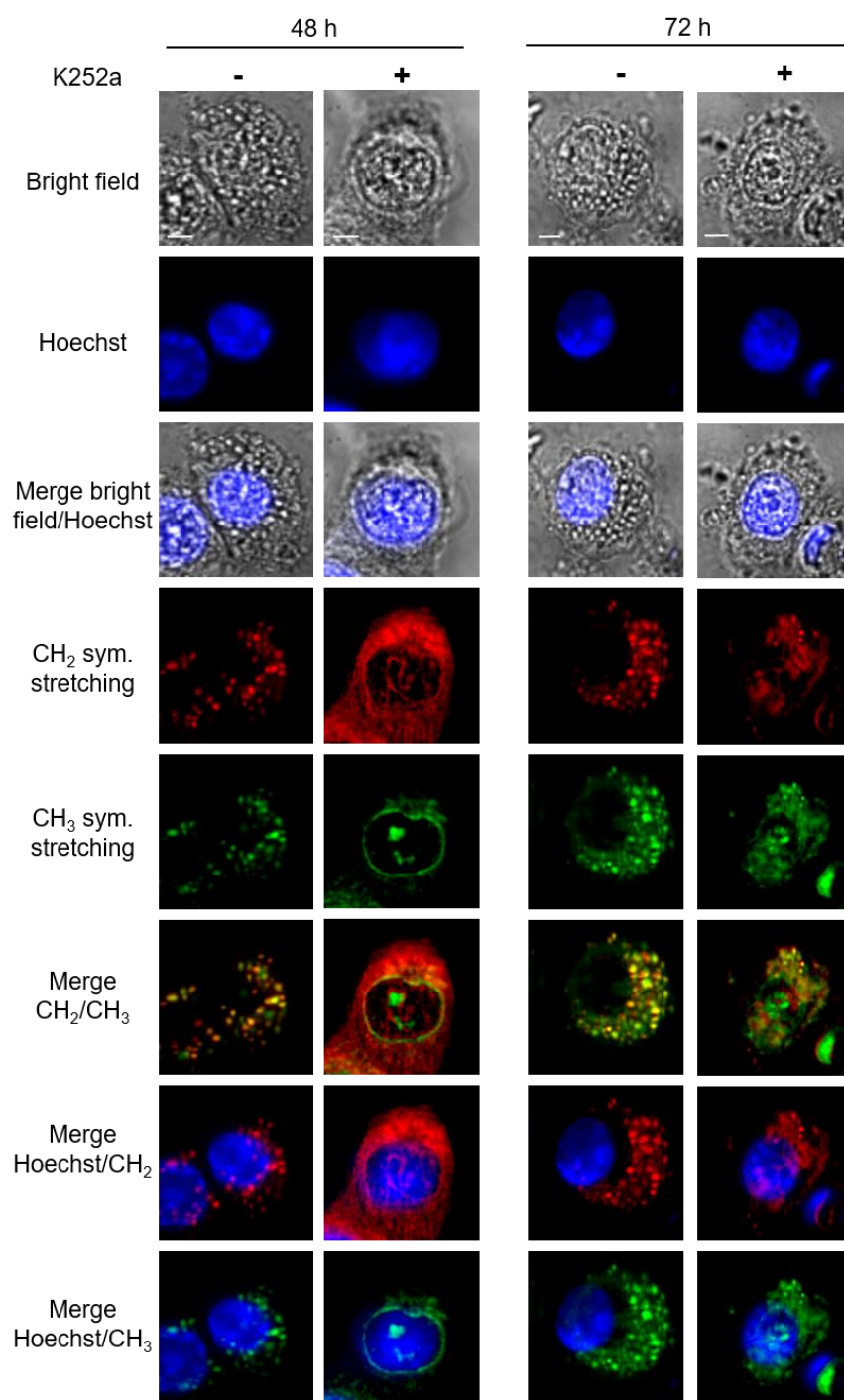


Fig. 6. Analysis of CRC cell lines (HCT116; HT29 and SW620) by MCARS spectroscopy after a treatment with K252a. Living CRC cell lines were treated with K252a at 100 nM, during 48 and 72 hours, including bright-field, and fluorescence (Hoechst 33342) images. MCARS images were reconstructed from signal integration at 2850 cm^{-1} (CH₂ symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH₃ symmetric stretching) Scale bar, 5 μm .

Supplementary information

Methods and materials

Cell culture

HEK293 cell line was provided by Pr. Lalloue; Captur, (Limoges). These well-known cells derived from Human Embryonic Kidney tissues. They were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Life Technologies) supplemented with 10 % fetal calf serum (Eurobio), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C under a humidified atmosphere with 5 % CO₂.

Three colorectal cancer cell lines were used: HCT116 (stage I), HT29 (stage II) and SW620 (stage III). HCT116 and SW620 cell lines were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies) and HT29 cell line in DMEM media. Both media were supplemented with 10 % fetal calf serum (Eurobio), 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C under humidified atmosphere and 5 % CO₂.

Generation of the expression vector allowing the overexpression of the TrkB receptor

A DNA fragment encoding the coding sequence of TrkB was amplified by PCR using pCMV-XL4-TrkB as template. The following oligonucleotide primers were used: Forward primer TrkB: 5' **GGATCCAAGAGAGCCGCAAGCGC** 3' and Reverse primer TrkB: 5' **TCTAGAGCAGCTTGGTGGCCTCC** 3' (nucleotides in bold in the sense strand indicate the location of a BamHI site, while those in the antisense strand indicate the location of a XbaI site). PCR conditions were as followed: Denaturation (98 °C-30 sec), 35 cycles of denaturation (98 °C-10 sec), hybridization (63 °C-20 sec) and extension (72 °C-45 sec). The PCR was achieved with a final extension (72 °C-5 min) using Phusion High Fidelity DNA Polymerase (ThermoScientifique). PCR product was introduced into clone vector pGEM-Teasy (Promega). A selection was then performed to find a clone with pGEM-Teasy containing the TrkB sequence (pGEM-Teasy-TrkB).

The vector pCDNA3.1+ was treated with calf intestinal alkaline phosphatase after being digested with BamHI and XbaI, and ligated with a TrkB DNA fragment. This fragment has been obtained from clone vector pGEM-Teasy-TrkB digested with BamHI and XbaI. This selection was performed to obtain a clone with vector containing the TrkB sequence called pCDNA3.1+/TrkB. The TrkB sequence in the pCDNA3.1+ was confirmed by DNA sequencing.

Generation of TrkB overexpression in HEK cell line

HEK cells were transfected with pCDNA3.1+/TrkB using JetPei (PolyPlus transfection). Briefly, Solution A with 2 µg of pCDNA3.1(+)/TrkB in 50 µL of NaCl (150 mM) and solution B with 4 µL of JetPei with 50 µL of NaCl (150 mM) were prepared. After 5 minutes at room temperature, both solutions were mixed and incubated 20 minutes at room temperature. The mix was then put on cells. After 24 h at 37 °C and 5 % CO₂, the transfection media was replaced by complete media with 750 µg/mL Geneticin (G418-Roth) as selection marker. Several clones were selected and characterized by qRT-PCR giving us their TrkB expression level.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy minikit (Qiagen). Then it has been quantified by measuring the absorbance at 260 nm using the Nanodrop spectrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies). A high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) was used for the conversion of 10 µg of total RNA to single-stranded cDNA suitable for quantitative PCR applications. Quantitative PCR was performed from 2 ng total cDNA in an ABI Prism 7900 Sequence Detector System (Thermo Fisher Scientific) using 40 cycles at 95 °C for 15 sec followed by 60 °C for 1 min. Taqman® primers and probe sets used in this study were as follows: TrkB (NTRK2) (Hs00178811_m1), GAPDH (Hs02786624_g1). Gene expression data were collected using the SDS software, version 2.2.2, (Applied Biosystems). The gene expression comparison has been carried out using delta-CT, corresponding to the CT (cycle threshold) of the gene of interest normalized by GAPDH.

Western blot analysis

Proteins were extracted from cells with RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.5 % sodium deoxycholate (*w/v*), 1 % NP-40, 0.1 % SDS (*v/v*) and protease inhibitor cocktail (complete; Roche Diagnostics)). Protein extract was centrifuged at 12.000 g for 30 min at 4 °C. Supernatants containing the proteins were recovered and the protein concentration was estimated using a Bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Sigma-Aldrich) with Bovine Serum Albumin as a standard.

Fifty micrograms of extracted proteins were separated under denaturing and reducing conditions with SDS polyacrylamide gel (8 %-10 % (*w/v*)) and then transferred to Hybond C-extra nitrocellulose membrane (GE Healthcare). Membranes were then blocked in 5 % non-fat dried milk (*w/v*) in TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20, pH 7.4) during 1 hour at room temperature. In a next step, we had an incubation overnight at 4 °C with specific primary antibodies diluted in 5 % non-fat dried milk (*w/v*) in TBST at : 1:150 dilution of anti-hTrkB (R&D systems, mab3971), 1:250 dilution of anti-Akt and anti-phospho Akt (R&D systems, MAB2055 and AF887 respectively), and 1:2000 dilution of anti-GAPDH (R&D systems, AF5718). After three washings in TBST, membranes were incubated for 1 hour at room temperature with 1:1000 dilution of secondary HRP conjugate antibodies (Dako) in 1% non-fat dried milk (*w/v*) in TBST. After last three washings, immunoblots were developed using BM Chemiluminescence Western-blotting substrate (peroxidase, POD; Applied Science). Analysis of spectral band intensities and chemical image generation were carried out using ImageJ software (NIH, v6) for relative quantification purposes.

Immunofluorescence analysis

HEK and HEK-Clone2 were seeded at 70.000 cells per well (Lab-Tek™, Fisher Scientific). After two days, cells were washed three times with PBS and fixed with 4 % of paraformaldehyde in PBS (*v/v*) for 10 min. To minimize nonspecific reactions, cells were saturated for 1 hour at room temperature using PBS-BSA 5 %. Cells were then incubated with primary antibodies: anti-hTrkB in PBS-BSA 1 % during overnight at 4 °C. After three washes in 0.1 % Tween20-PBS, cells were incubated for 1 hour at room temperature with polyclonal Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Alexa Fluor™ 488, Life Technologies).

After three washes with 0.1 % Tween20-PBS, nuclei were stained using 1 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich). Cells were washed three times before being mounted on slides with Mowiol 4-88 mounting medium and sealed with nail polish.

Stained cells were observed with an epifluorescence microscope (Leica DMI4000B). Data were processed using MetaMorph software (Molecular Devices).

BDNF and K252a treatments

Different conditions were used according to the analyses performed.

For proteins extraction

HEK293 and HEK-Clone2 cells were seeded at a density of 10.000 cells per cm² and cultured in DMEM medium supplemented with 10 % FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 700 µg/ml of G418 for HEK-Clone2 during two days at 37 °C and 5 % CO₂. Then cells were treated with 75 ng/ml recombinant human BDNF (Peprotech) in medium containing 1 % of FBS (v/v) (1). Cells were harvested after 1 hour of treatment and proteins were extracted.

A dual treatment was performed with BDNF and K252a in order to block the TrkB activation. Cells were treated with 75 ng/ml recombinant human BDNF (Peprotech) and 100 nM of K252a (Alomone) in medium containing 1 % of FBS (v/v) (2). Cells were harvested after 1 hour of treatment and proteins were extracted.

For CARS analysis

HEK293 and HEK-Clone2 cells were grown on uncoated glass slides. We used 12-well plates in which we introduced 18 mm diameter round glass coverslips. Cells were seeded at a density of 35.000 cells per well in DMEM medium containing 10 % of FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 700 µg/ml of G418 for HEK-Clone2. After two days at 37 °C and 5 % CO₂, cells were treated with 75 ng/mL recombinant human BDNF in medium containing 1 % of FBS (v/v). At the same time, a dual treatment was performed with BDNF and K252a (100 nM). After 48 hours and 72 hours of treatment, cells were washed three times with PBS and nuclei were labelled with 10 µg/mL Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) during 15 min. Cells were then washed, and the coverslip sealed with nail polish on a microscopy glass slide.

Lipid droplet staining with BODIPY

To validate BODIPY ability to label lipid droplets, a treatment with fatty acids, which stimulates the neutral lipid synthesis and thus forms lipid droplets, has been carried out. For this reason, HEK cells were seeded at a density of 10.000 cells per cm² in 12-well plate and cultured in DMEM medium supplemented with 10 % FBS, 100 units/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37 °C and 5 % CO₂. After two days, cells were treated with oleic acid at 0.7 mM (Sigma-Aldrich) during 24 h. Then, cells were washed three times with PBS and fixed with PFA (4 % (v/v) in PBS) for 10 min. After three washings with PBS, cells were stained with 5 µg/mL BODIPY (Thermofisher) for 1 hour (3). After three washes, nuclei were stained using 1 µg/mL with DAPI. Cells were rinsed three times before being mounted on slides with Mowiol 4-88 mounting medium and sealed with nail polish (SI Appendix, Fig. S1).

Concerning HEK and HEK-Clone2 cells treated with BDNF and K252a, or without K252a or without BDNF during 48 h and 72 h, the same protocol was used.

M-CARS microspectroscopy

The spectroscopic setup used in this work is presented in (4). For the M-CARS, the pump source is a passively Q-switched microchip laser (Horus Laser, 1064 nm, 1 ns, 20 kHz, linearly polarized, $< 0.1 \text{ cm}^{-1}$ linewidth). The laser beam is divided into two parts by using a half-wave plate and a Glan-Taylor polarizer (GTP). One part is injected into a photonic crystal fiber (PCF) to generate a supercontinuum Stokes wave (600-1650 nm). This Stokes beam is collimated by means of a parabolic mirror (PM) and directed to a long-pass filter (LPF) at 1050 nm (Thorlabs, FEL1050). The other part is used as the pump radiation of the CARS process after adjusting its power with a variable neutral density filter (VNDF) and its delay with a delay line (DL). Then pump and Stokes beams are spatially combined through a notch dichroic beamsplitter (NDBS) (Semrock, NFD01-1064-25x36) and tightly focused onto the sample with a high numerical aperture microscope objective (Olympus, UPlanSApo 60x, N.A. = 1.2, water immersion). The position of the sample is controlled by means of a translation stage. The CARS signal generated by the sample is collected by a second microscope objective (Nikon, S Plan Fluor ELWD 60x, N.A. = 0.7), cleaned from any remaining pump signal by using a notch filter (NF) (Thorlabs, NF1064-44) and guided into a spectrometer (Horiba, LabRam HR Evolution, 600 gr/mm grating, Synapse CCD camera). In order to observe stained cells via the fluorescence of Hoechst's staining, the M-CARS system was complemented with a halogen light source, appropriate excitation and emission filters, and a dedicated CCD camera (Thorlabs, 1500M-GE).

The lateral, axial and spectral resolutions of the CARS microspectroscope were $\sim 300 \text{ nm}$, $2 \mu\text{m}$, and 0.8 cm^{-1} respectively. During all experiments, the laser power of pump and Stokes radiations at the sample position was set at 55 mW and 9 mW, respectively. At this laser power (64 mW in total), no morphological change of cells was observed. This was confirmed by visualizing the sample with bright field and/or fluorescence imaging.

Spectra were acquired from 2500 to 3200 cm^{-1} with 50 ms pixel dwell time and processed by using the maximum entropy method (MEM) so as to extract the pure vibrationally resonant signal, which corresponds to the imaginary part of the third order nonlinear susceptibility ($\text{Im}\{\chi(3)\}$) (5). CARS chemical images were reconstructed for two Raman modes: CH_2 symmetric stretching, associated to lipids, at 2850 cm^{-1} and CH_3 symmetric stretching, associated to proteins, at 2930 cm^{-1} .

Supplementary figures

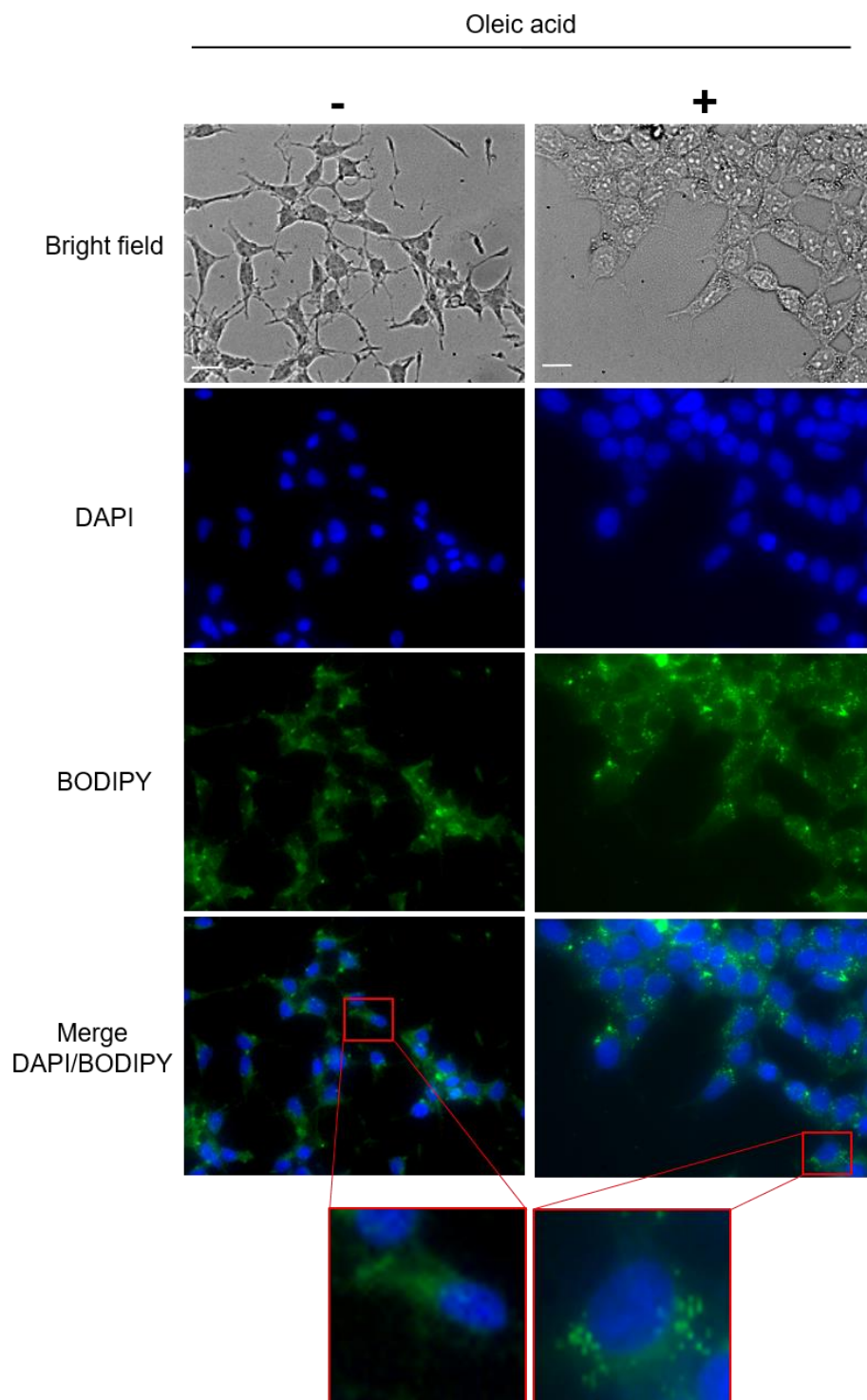


Fig. S1. Analysis of lipid content following addition of fatty acids in cell culture medium. HEK cells were treated with, or without oleic acid at 0.7 mM, during 24 hours. Then cells were fixed using PFA, and stained with BODIPY 493/503 (green fluorescence) for lipid and DAPI (blue fluorescence) for nuclei. Scale bar, 10 μ m.

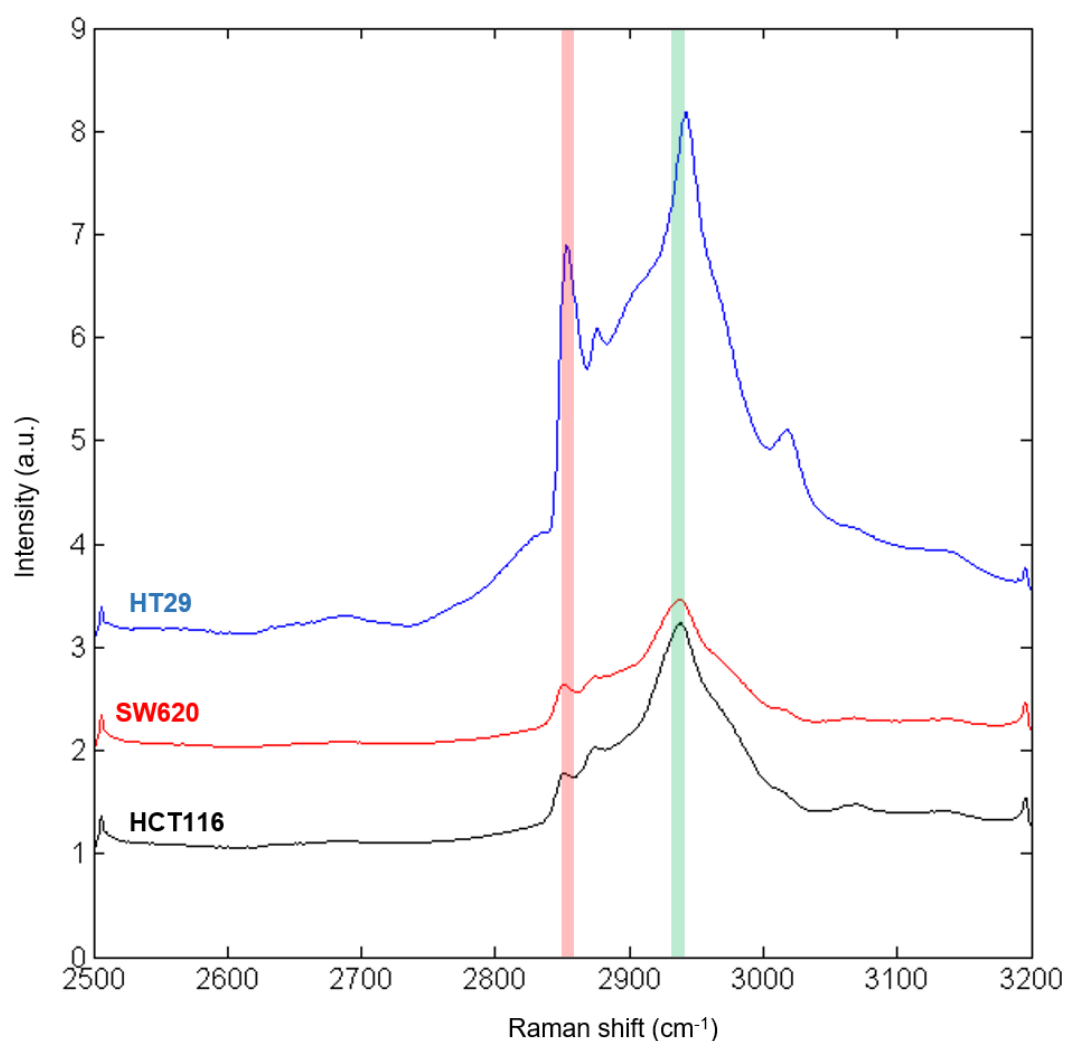


Fig. S2. **Mean of standard deviation of the vibrationally resonant CARS signal between 2500 and 3200 cm^{-1}** , computed over the whole region of interest for 8 cells for HCT116, 11 cells for HT29 and 6 cells for SW620. CH2 and CH3 spectral contributions are highlighted in red and green, respectively.

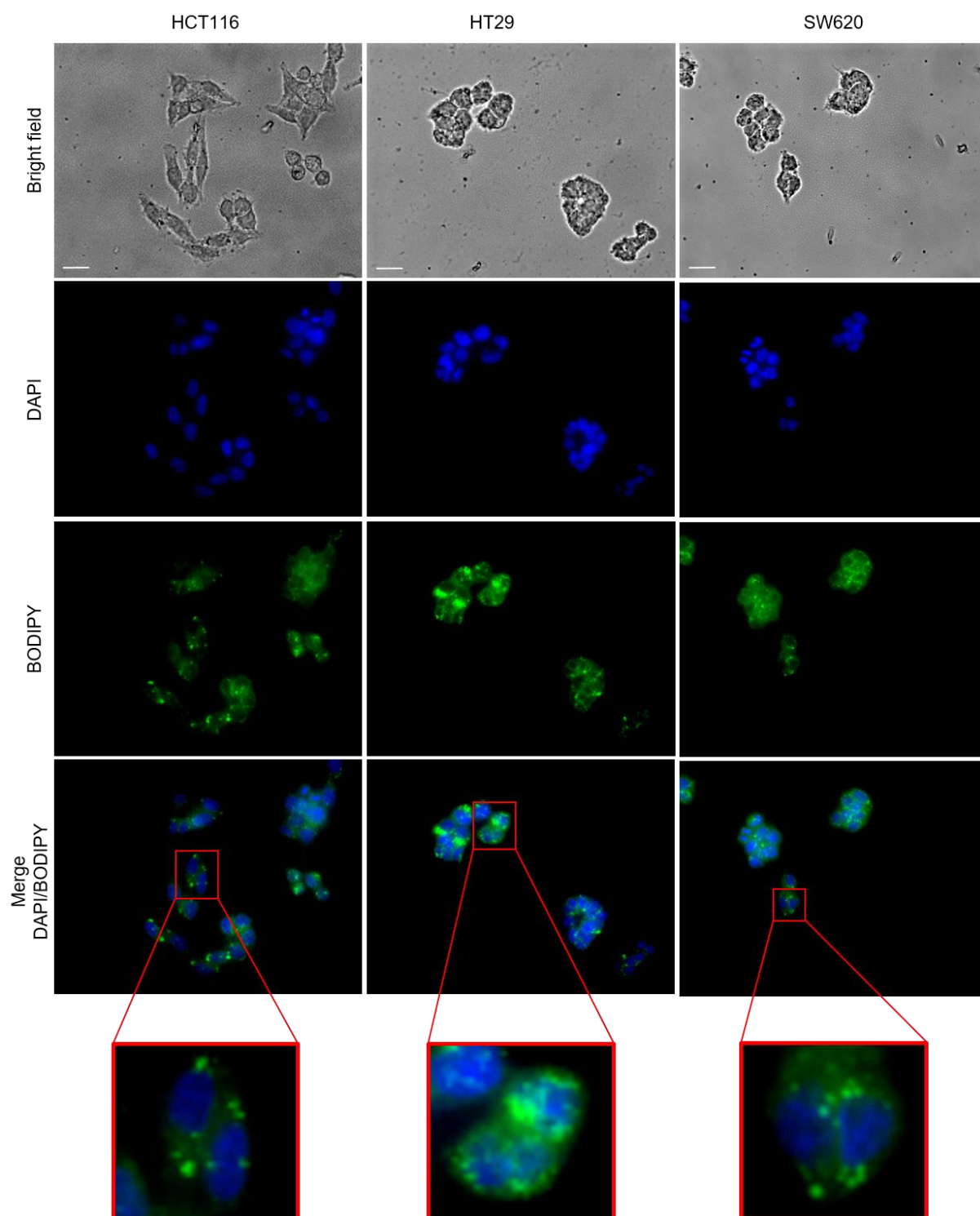


Fig. S3. **Analysis of lipid content in colorectal cancer cell lines, HCT116, HT29 and SW620.** Cells were fixed using PFA, and stained with BODIPY 493/503 (green fluorescence) for lipid and DAPI (blue fluorescence) for nuclei. Scale bar, 10 μm.

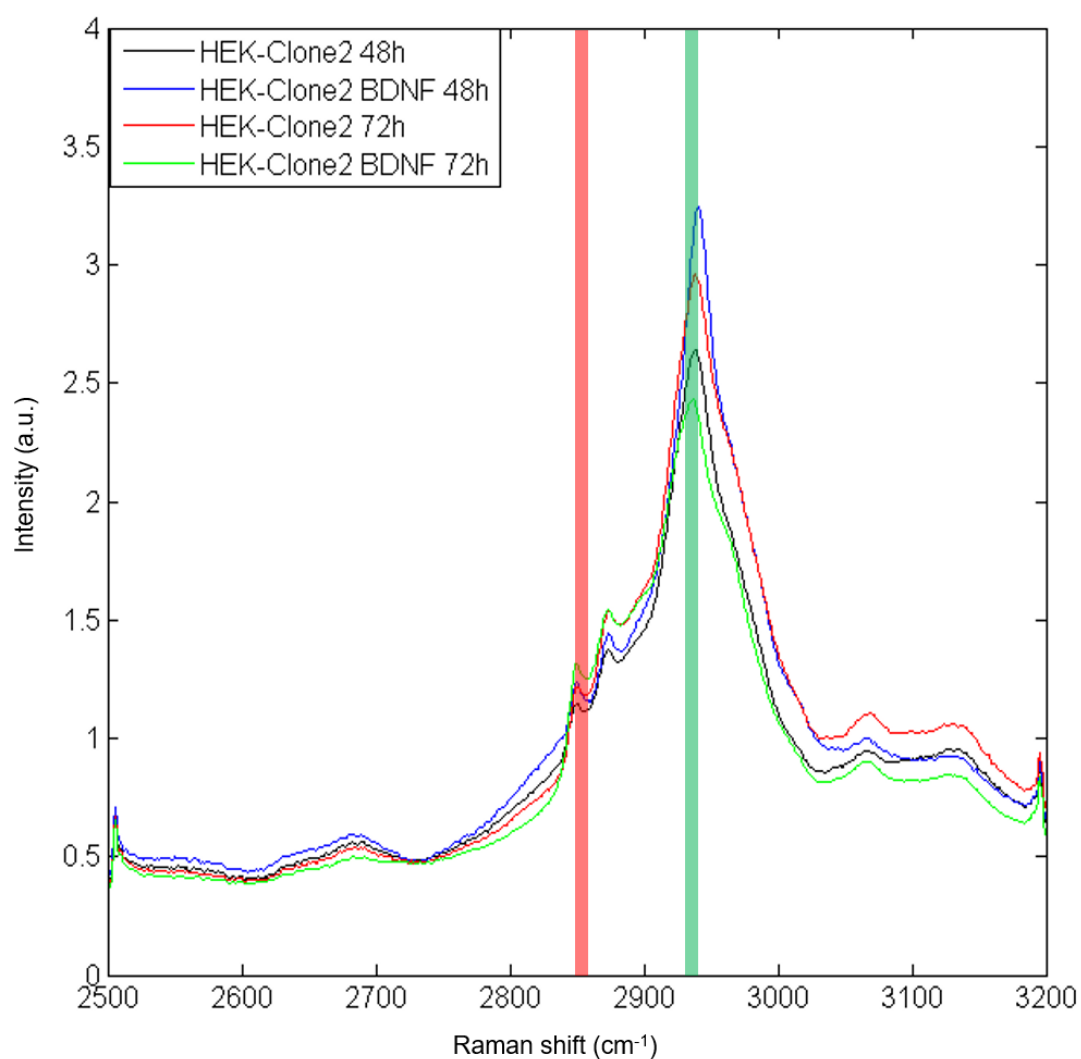


Fig. S4. Mean of standard deviation of the vibrational resonant CARS signal between 2500 and 3200 cm^{-1} , computed over the whole region of interest for 3 cells for HEK-Clone2 48h, 3 cells for HEK-Clone2 BDNF 48h, 3 cells for HEK-Clone2 72h and 6 cells for HEK-Clone2 BDNF 72h. CH_2 and CH_3 spectral contributions are highlighted in red and green, respectively.

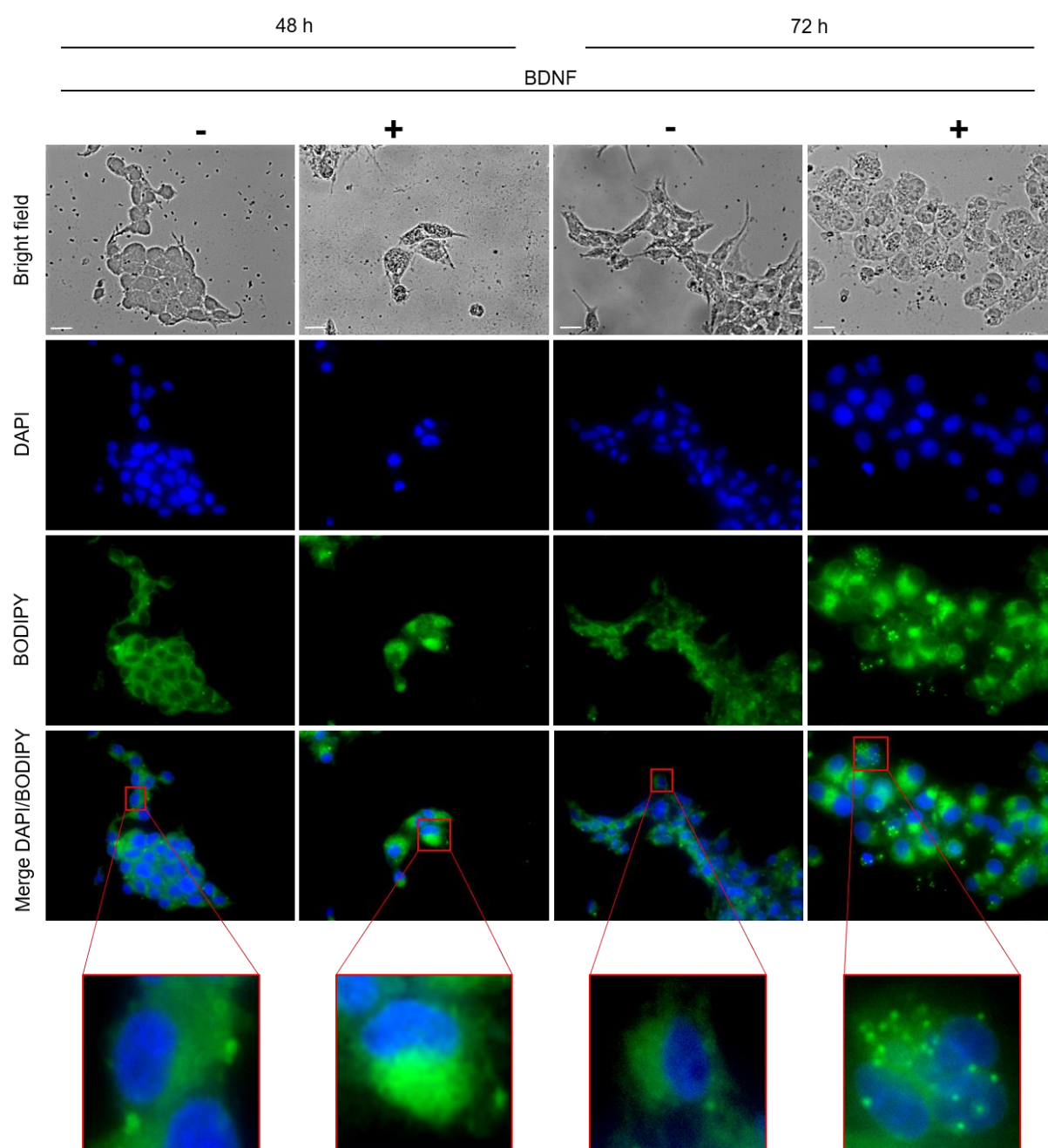


Fig. S5. Analysis of lipid content in HEK-Clone2 cells after activation of TrkB receptor. HEK-Clone2 were treated with, or without BDNF at 75 ng/ml, during 48 and 72 hours. Then cells were fixed using PFA, and stained with BODIPY 493/503 (green fluorescence) for lipid and DAPI (blue fluorescence) for nuclei. Scale bar, 10 μ m.

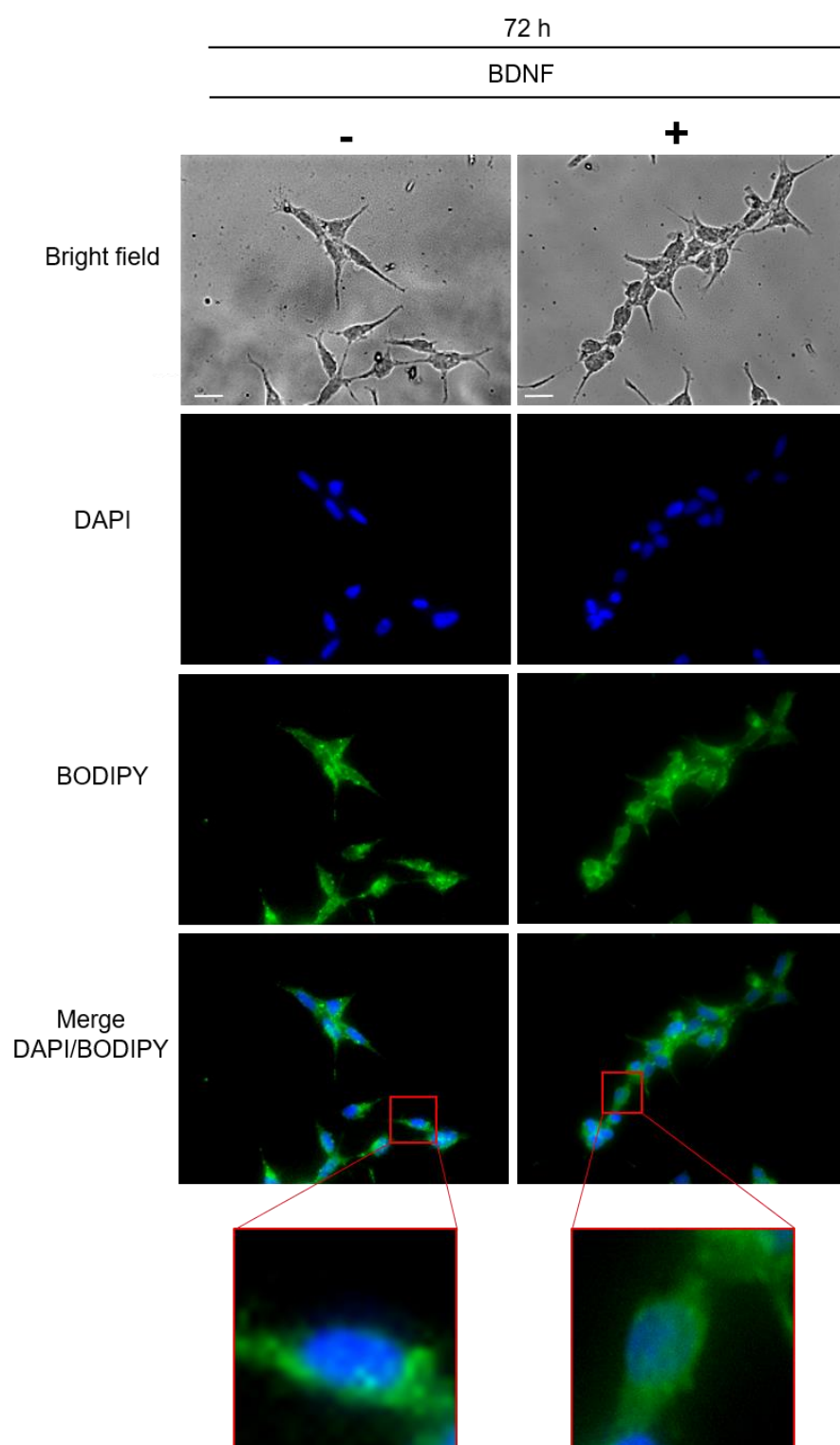


Fig. S6. Analysis of lipid content in HEK cells after activation of TrkB receptor. HEK were treated with, or without BDNF at 75 ng/ml, during 72 hours. Then cells were fixed using PFA, and stained with BODIPY 493/503 (green fluorescence) for lipid and DAPI (blue fluorescence) for nuclei. Scale bar, 10 μ m.

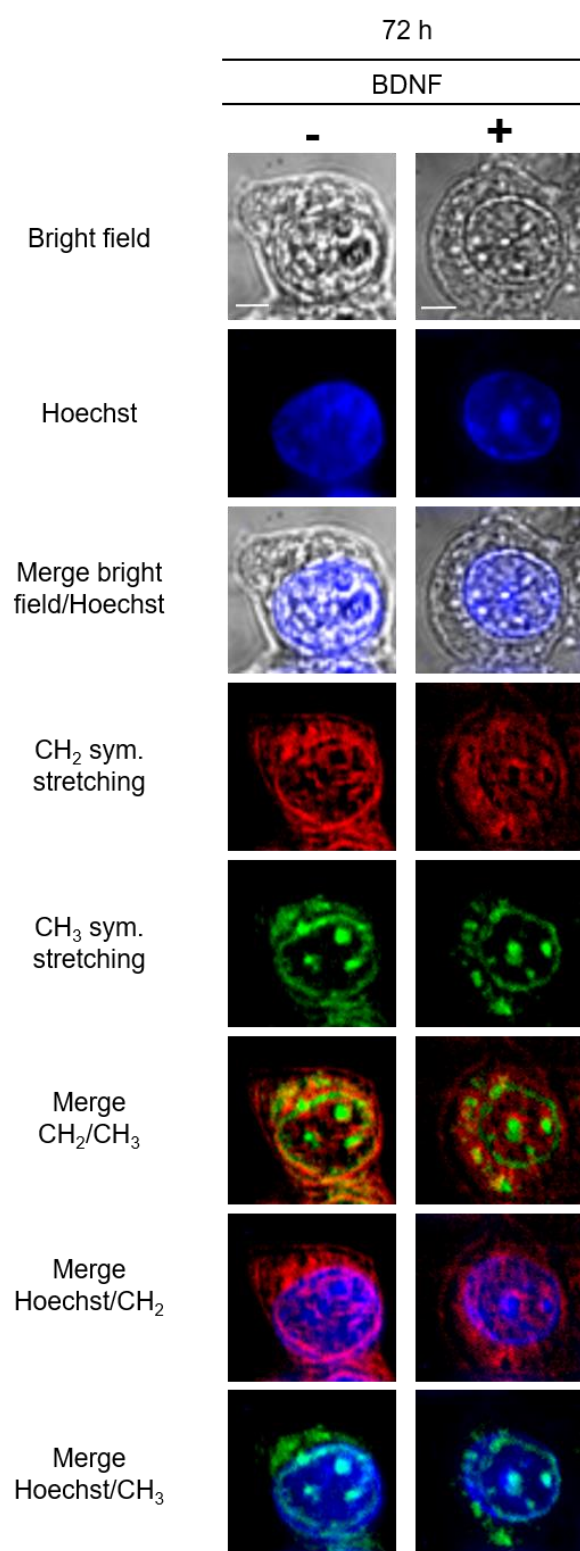


Fig. S7. Analysis of HEK cells by MCARS. Living HEK cells were treated with, or without BDNF at 75 ng/ml, during 72 hours, including bright-field, and fluorescence (Hoechst 33342) images. MCARS images were reconstructed from signal integration at 2850 cm^{-1} (CH₂ symmetric stretching) and 2930 cm^{-1} (CH₃ symmetric stretching) Scale bar, 5 μm .

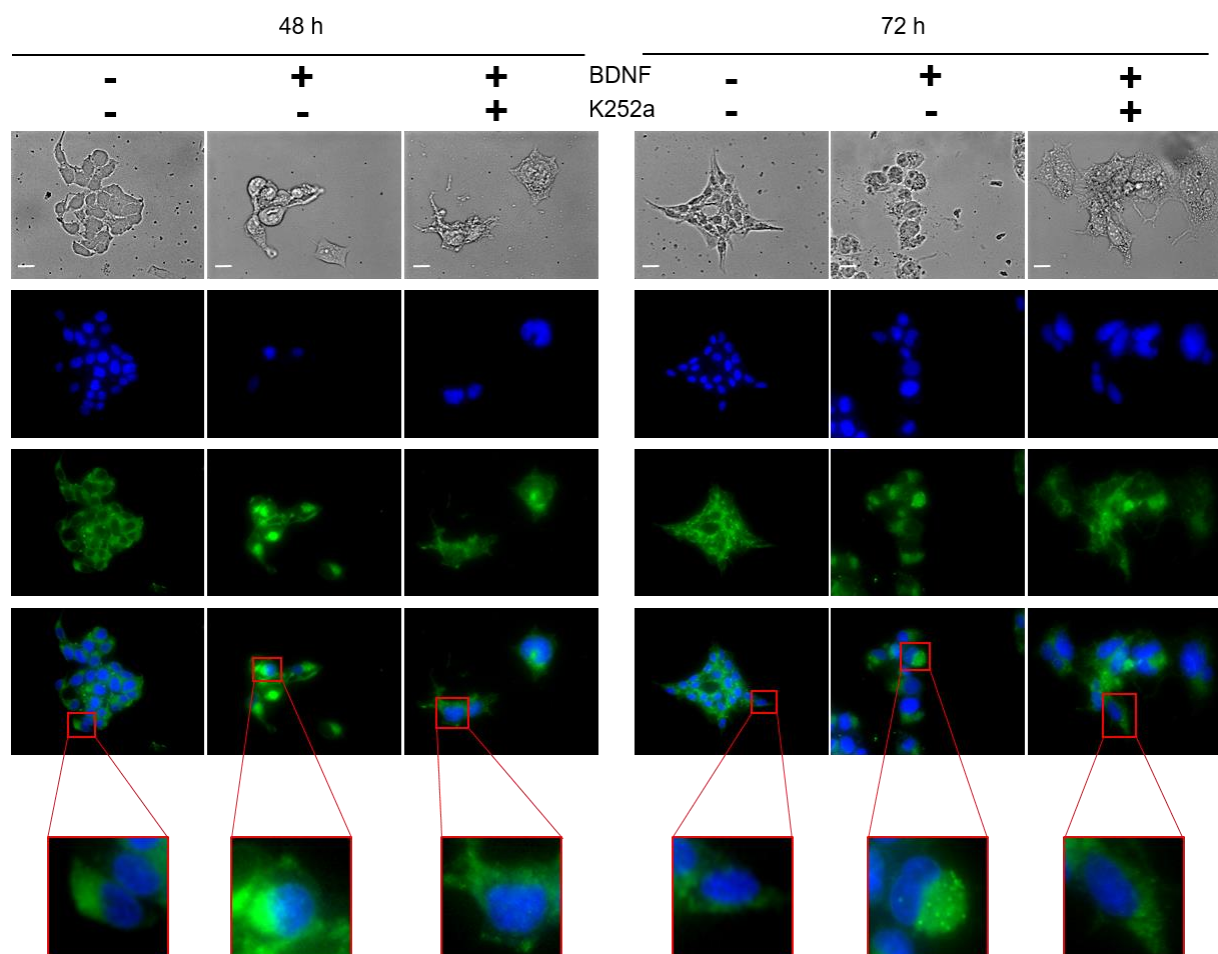


Fig. S8. Analysis of inhibition of TrkB activation by K252a. HEK-Clone2 were treated with or without BDNF at 75 ng/ml, and with or without K252a at 100 nM, during 48 and 72 hours. Then cells were fixed using PFA, and stained with BODIPY 493/503 (green fluorescence) for lipid and DAPI (blue fluorescence) for nuclei. Scale bar, 10 μ m.

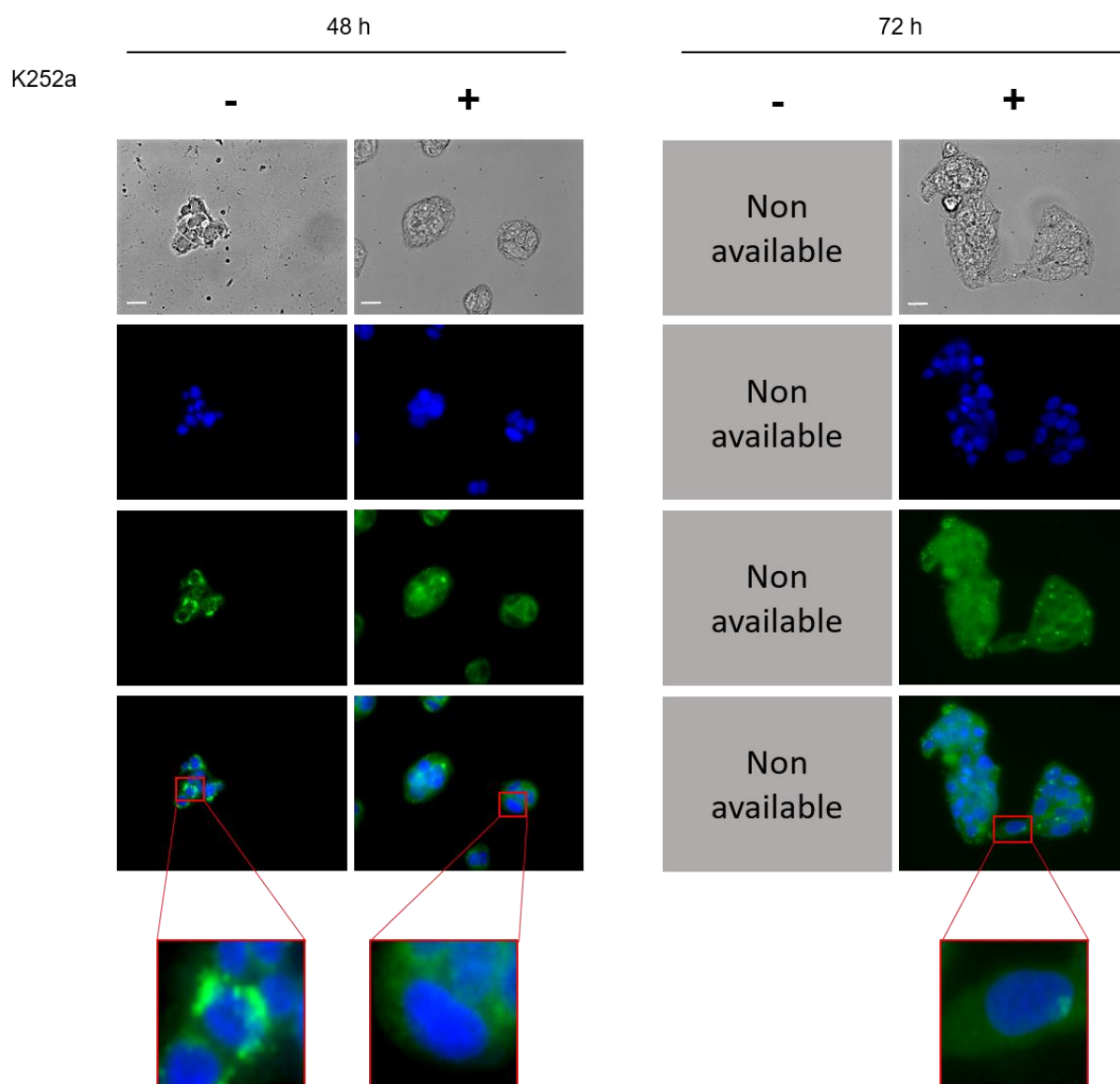


Fig. S9. Analysis of inhibition of TrkB activation by K252a in HT29 cell line. HT29 cells were treated with or without K252a at 100 nM, during 48 and 72 hours. Then cells were fixed using PFA, and stained with BODIPY 493/503 (green fluorescence) for lipid and DAPI (blue fluorescence) for nuclei. Scale bar, 10 μ m.

Supplementary references

1. Bao, W., Qiu, H., Yang, T., Luo, X., Zhang, H., and Wan, X. Upregulation of TrkB Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Anoikis Resistance in Endometrial Carcinoma. *PLoS ONE* 8, e70616 (2013).
2. Mazouffre, C., Geyl, S., Perraud, A., Blondy, S., Jauberteau, M.-O., Mathonnet, M., and Verdier, M. Dual inhibition of BDNF/TrkB and autophagy: a promising therapeutic approach for colorectal cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21, 2610–2622 (2017).
3. Listenberger, L.L., Studer, A.M., Brown, D.A., and Wolins, N.E. Fluorescent Detection of Lipid Droplets and Associated Proteins: Detection of Lipid Droplets by Fluorescent Microscopy. In *Current Protocols in Cell Biology*, J.S. Bonifacino, M. Dasso, J.B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, and K.M. Yamada, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 4.31.1-4.31.14 (2016).
4. Guerenne-Del Ben, T., Rajaofara, Z., Couderc, V., Sol, V., Kano, H., Leproux, P., and Petit, J.-M.. Multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering highlights state of chromatin condensation in CH region. *Scientific Reports* 9 (2019).
5. Vartiainen, E.M., Rinia, H.A., Müller, M., and Bonn, M. Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Optics Express* 14, 3622. (2006).

Chapitre VI. Discussion générale

Mon travail, portant sur l'analyse de cellules saines et cancéreuses, par la microspectroscopie CARS, a été effectué dans une seule zone du spectre Raman : la zone CH ($2500-3200\text{ cm}^{-1}$). En comparaison avec la zone d'empreinte biologique ($800-1800\text{ cm}^{-1}$), elle correspond uniquement aux élongations de la liaison entre les atomes de carbone et d'hydrogène (CH, CH₂, CH₃, ...). Cette spécificité évite de noyer les informations vibrationnelles. Les deux décalages Raman les plus étudiés dans cette zone correspondent à la vibration d'élongation de la liaison entre le carbone et l'hydrogène des groupements CH₂ et CH₃. Ils sont référencés comme composants majoritaires des lipides et des protéines, respectivement. Ce sont deux biomolécules importantes, et elles représentent environ 16 % de la masse totale d'une cellule. Le second avantage de concentrer les analyses dans cette zone spectrale est d'obtenir des intensités de décalages Raman plus importantes, générant un rapport signal-sur-bruit bien meilleur que dans la zone biologique. Ainsi, se recentrer sur une petite zone spectrale, riche en informations et fortement contrastée a permis des acquisitions CARS de courtes durées, en comparaison avec une acquisition d'un spectre total (de 800 cm^{-1} à 3200 cm^{-1} ; Huang *et al.*, 2015).

- **Comparaison des analyses entre les modes spectroscopies et microspectroscopie CARS sur la lignée cellulaire HEK**

En utilisant la technologie CARS dans sa configuration spectroscopie, les nombreux spectres obtenus dans différentes zones du noyau de cellules HEK avaient une grande variation d'intensité, en fonction des zones ciblées. Le traitement des données par l'ACP, ne nous a pas permis d'identifier des similitudes entre ces spectres. Ainsi, c'était primordial d'utiliser la configuration de microspectroscopie CARS. Le couplage de la spectroscopie et de la microscopie vibrationnelle permet de localiser différents composés biochimiques précis (correspondant aux décalages Raman), au sein de la cellule étudiée. L'analyse concerne alors la globalité de la cellule.

Les premiers résultats obtenus par microspectroscopie CARS ont validé cette hypothèse, montrant que pour un décalage Raman donné, il y avait des différences d'intensité au sein d'un même organite, par exemple des intensités plus importantes dans des zones du noyau. De plus, les cartographies, issues de plusieurs cellules venant d'une même lignée, ne donnent pas les mêmes informations. Par exemple, une cellule peut avoir une forte signature CH₃ dans des zones restreintes du noyau alors que d'autres présentent un noyau uniformément marqué. En tenant compte de ces résultats discordants pour un même type cellulaire analysé, il m'a fallu en comprendre les raisons avant de pouvoir réaliser des analyses comparatives.

Toutes les cellules provenant d'une même lignée cellulaire sont considérées comme des clones. Elles proviennent d'une cellule d'un tissu humain, qui est immortalisée (transfection par le virus SV40 ou le gène *E6E7* du papilloma virus 16) pour permettre leurs cultures *in vitro* à l'infini (Ulrich and Pour, 2001). Si ces cellules sont cultivées dans les mêmes conditions (milieu de culture, pourcentage en SVF, apport nutritionnel, ...) les quantités de chaque constituant devraient être très similaires, voire identiques. Il est donc très surprenant d'observer, dans notre cas, autant de différences spectrales et de localisation des protéines et lipides.

L'hypothèse d'implication de processus cellulaires pouvant générer ces variations de signaux au sein d'une même population cellulaire m'a orientée vers le cycle cellulaire qui se scinde en deux phases : l'interphase et la mitose, comportant chacune différentes sous phases. L'interphase est composée des sous phases G1, S et G2, qui ont pour but majoritaire la duplication de l'ADN (phase S) et de préparer la cellule à la mitose (phase G2). Bien que peu discriminante du point de vue des modifications de morphologie cellulaire et de conformation des organites, l'interphase est essentielle au bon devenir des cellules filles. Il s'en suit la mitose, composé de 5 sous phases (prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase).

Elle permet la condensation de l'ADN sous forme de chromosomes, puis ensuite la séparation et la migration des chromatides sœurs dans les deux cellules filles résultantes. Ainsi, les deux cellules filles auront la même quantité d'ADN (Harper and Brooks, 2004). Durant la mitose les modifications de morphologie de certains organites apparaissent durant les sous phases (Jongsma *et al.*, 2015), on peut en suivre l'évolution grâce à la variation de l'état de condensation des chromosomes.

- **Analyse par la microspectroscopie CARS de cellules bloquées en transition G1/S et de cellules dans les sous-phases de la mitose**

J'ai ainsi pu analyser les signaux CARS dans la zone CH du spectre Raman pour des cellules en interphase et en mitose en me focalisant sur deux décalage Raman spécifiques : les liaisons CH₂ et CH₃, associées majoritairement aux lipides et aux protéines. Les résultats sont comparables entre cellules dans une même phase du cycle cellulaire. Dans la littérature, peu de résultats, ou des résultats contradictoires font état de l'analyse de constituants cellulaires dans la zone CH, principalement pour les décalages Raman associés aux liaisons CH₂ et CH₃. Par exemple, l'analyse de cellules en fonction de leur position dans le cycle cellulaire révèle que la signature associée aux protéines met en évidence les protéines cytosoliques (Lu *et al.*, 2015; Pliss *et al.*, 2010) mais nullement les protéines participant à la condensation de l'ADN. J'ai pu observer aussi bien les nucléoles pour les cellules interphasiques que les chromosomes condensés pour les cellules mitotiques. Ainsi, les différences spectrales associées aux liaisons CH₃ au sein du noyau lors des premières études résulteraient de la zone analysée : hétérochromatine ou nucléoles possédant plus de protéines, ou euchromatine moins riche en protéines.

De nombreuses études se sont intéressées à visualiser les protéines dans une cellule, que ce soit par la microspectroscopie Raman ou CARS. Dans ce cas, la zone d'empreinte biologique est toujours privilégiée. Un marquage dans le cytoplasme et le noyau de la cellule est décrit sans réelle distinction entre ces deux compartiments cellulaires (Dessai *et al.*, 2018; Ichimura *et al.*, 2014, 2015).

En revanche, une étude s'est concentrée sur le cycle cellulaire et a permis de mieux appréhender la localisation des protéines dans la cellule en mitose (principalement en métaphase) (Matthäus *et al.*, 2006) : étape de condensation de l'ADN. Cependant, cette étude a été effectuée via des mesures dans la zone d'empreinte biologique. Ce n'est qu'en 2010 que le cycle cellulaire est analysé dans la zone CH grâce à la microspectroscopie cohérente, en utilisant le décalage Raman associé aux protéines à 2930 cm^{-1} . La signature protéique, dans les cellules mitotiques, couvre la cellule dans son intégralité, avec une intensité légèrement plus importante pour les régions d'hétérochromatine, lieu de condensation de la chromatine ; pour les cellules en interphase, la signature protéique met en évidence uniquement les nucléoles (Pliss *et al.*, 2010). En 2015, une équipe a réussi, grâce à des algorithmes puissants et complexes, à identifier un décalage Raman associé à un constituant de l'ADN dans la zone CH, le désoxyribose, qui permet de visualiser l'ADN. La signature à 2930 cm^{-1} a aussi été évaluée et, à l'inverse de l'étude de 2010, aucun lien n'a été établi entre la compaction de l'ADN et les protéines (Lu *et al.*, 2015). Ainsi, les études évaluant le cycle cellulaire dans la zone CH restent que peu approfondies et contradictoires.

Pourtant, il est démontré que durant le cycle cellulaire la compaction de l'ADN engendre une zone très riche en protéines (Torrente *et al.*, 2011). Il est donc surprenant de ne pas pouvoir distinguer le noyau en utilisant le décalage Raman approprié. Mon étude a mis en évidence, de manière précise et reproductible que la signature associée aux protéines met en évidence majoritairement l'état de compaction de l'ADN durant la mitose. En effet, durant ce phénomène, l'hétérochromatine possède en masse deux fois plus de protéines que d'ADN et se retrouve concentrée dans de petites zones avec de ce fait une forte signature vibrationnelle. En parallèle, pour les cellules en interphase, il s'avère possible de distinguer dans le noyau les nucléoles qui présentent une grande intensité de signal. Le nucléole, bien que n'étant pas une zone spécifique de condensation de l'ADN contient de nombreuses protéines impliquées dans la synthèse des sous-unités des ribosomes.

En ce qui concerne l'observation de la signature associée aux lipides, elle met en évidence la présence, plus ou moins importante, de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme sans qu'un organite soit mis en avant. Durant mon étude, en utilisant le même décalage Raman, j'ai visualisé la réorganisation du plus grand organite cellulaire : le réticulum endoplasmique (RE), une structure réticulée accolée au noyau. Le RE est le lieu de synthèse des lipides, il présente donc une forte densité en liaisons CH_2 . Il s'avère possible d'observer la modification de structuration de cet organite durant la mitose, passant de forme de feuilletts et de tubules à uniquement des tubules (Jongsma *et al.*, 2015). Jusqu'à présent, cette observation n'a jamais été mise en évidence par les technologies vibrationnelles.

Ainsi, il est particulièrement intéressant de pouvoir visualiser les contenus protéiques et lipidiques dans la zone CH car elle permet d'obtenir rapidement grâce à une petite zone spectrale analysée des résultats avec un très fort contraste, et sans traitement algorithmique complexe. De plus, la répétabilité des résultats constitue une bonne base pour réaliser des analyses comparatives.

Cependant, il s'avère que ces signaux fluctuent selon l'état des cellules : vivantes ou fixées. Ceci n'avait jamais été décrit jusqu'à maintenant dans la littérature par microspectroscopie vibrationnelle (Raman et CARS). Seule l'influence de différentes méthodes de fixation sur les signaux vibrationnels (Raman et CARS) comme les solvants organiques (méthanol, acétone, ...) ou les aldéhydes (PFA, ...). Les aldéhydes, de manière générale, induisent moins de dommage cellulaire. Il a tout de même été observé une légère lésion membranaire impliquant une légère perte des composants cytoplasmiques. En parallèle, une diminution de l'intensité du pic associé aux Amide III (protéines) est constatée. Quant aux solvants organiques, ils induisent une diminution drastique de l'intensité des signaux dus aux protéines, lipides et acides nucléiques, et une déstructuration de la membrane plasmique

Ces études ont été effectuées autant sur des organismes procaryotes qu'eucaryotes. Il en résulte que la meilleure méthode pour fixer des cellules sans induire de grands bouleversements structuraux et vibrationnels est le PFA (Chan *et al.*, 2009; Hobro and Smith, 2017; Levchenko *et al.*, 2019; Read and Whiteley, 2015).

Il s'avère que les cellules vivantes contrairement aux cellules fixées avec du PFA présentent un marquage supplémentaire qui permet d'identifier le pourtour nucléaire. Ce marquage correspond, en réalité, à la partie de l'hétérochromatine fixée à la lamina nucléaire, par l'intermédiaire de protéines spécifiques (Lochs *et al.*, 2019). Lorsque les cellules sont fixées, ce marquage disparaît, laissant supposer que la fixation provoque des dommages au niveau de l'enveloppe nucléaire. Ainsi, l'hétérochromatine fixée à la lamina nucléaire est libérée dans le nucléoplasme et n'est donc plus visualisable par la microspectroscopie CARS. De ce fait, nous montrons que suite à la fixation au PFA, il y a une désorganisation des composants cellulaires et principalement l'hétérochromatine fixée à la lamina nucléaire. Cette constatation, jamais référencée dans la littérature, est une avancée importante dans le monde de la microspectroscopie vibrationnelle.

Ainsi, l'étude dans la zone CH par un traitement algorithmique simple (la méthode d'entropie maximum) fournit des informations vibrationnelles quel que soit l'état de la cellule, vivante ou fixée, sur l'état de la chromatine, le réticulum endoplasmique et les gouttelettes lipidiques associées. L'identification de certains organites de cellules saines ouvre le champ à des études comparatives (cellules cancéreuses *versus* cellules saines). Cette première étude permet d'identifier des caractéristiques vibrationnelles associées aux processus cancéreux, comme des modifications d'intensité, de localisation voire même de compositions biochimiques de ces organites. Par exemple, une étude récente révèle que l'hétérochromatine périphérique attachée à la lamina nucléaire constituerait un marqueur supplémentaire pour la détection de cellules cancéreuses. L'hétérochromatine périphérique permet de réprimer des gènes qui seront non transcrits.

Durant le processus de cancérisation, il y a des changements d'organisation et de localisation de la chromatine avec le plus souvent une décondensation de l'hétérochromatine, permettant le démasquage et l'expression de différents gènes. Cette diminution d'hétérochromatine périphérique est utilisée comme biomarqueur de certains sous type de cancer car elle est associée à la formation de métastases et à un mauvais pronostic. A l'heure actuelle, la détection de cette hétérochromatine est relativement difficile et requiert des techniques compliquées avec des marquages préalables (Carone and Lawrence, 2013). Grâce aux niveaux d'intensité, aux contrastes observés et à la bonne résolution de la microspectroscopie CARS utilisée, il semble intéressant d'utiliser cette technologie pour mettre au point une technique quantitative permettant de classer les cellules saines *versus* les cellules cancéreuses en fonction de leur état et de la localisation de la chromatine.

- **Analyse par la microspectroscopie CARS des changements du métabolisme lipidique du à l'activation du récepteur TrkB**

Bien entendu, les cellules cancéreuses ne se distinguent pas uniquement par le réarrangement de leur hétérochromatine, elles ont de nombreuses caractéristiques qui leur permettent une croissance accrue, une capacité d'invasion, de résistance à l'hypoxie, ... L'une d'elles a souvent été mise en avant par la microspectroscopie vibrationnelle (Raman et CARS), c'est une modification du métabolisme lipidique. Depuis presque 20 ans, il a été observé que les cellules cancéreuses avaient une augmentation de leur métabolisme lipidique, favorisant une prolifération accrue, associée à la stimulation de voies de signalisations impliquées dans la survie cellulaire, l'angiogenèse et des processus métastatiques. Cette augmentation du métabolisme lipidique conduit à la formation de gouttelettes lipidiques intracellulaires qui deviennent « un biomarqueur cancéreux » (Liu *et al.*, 2017; Tirinato *et al.*, 2017).

Cette augmentation du métabolisme lipidique est souvent associée à la présence de récepteur transmembranaire. Il a été démontré par spectroscopie Raman que le récepteur HER2 induit une augmentation du métabolisme lipidique dans les cellules cancéreuses de tumeurs mammaires (Bi *et al.*, 2014).

Plus récemment, des travaux montrent que l'activation du récepteur à l'EGF (EGFR), par son ligand, stimule la synthèse *de novo* d'acides gras qui contribuent à l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les cellules cancéreuses colorectales ; cette augmentation est en lien étroit avec l'activation de la voie de signalisation PI3K/mTOR (Penrose *et al.*, 2016). De nombreux autres types de cancer favorisent l'augmentation du métabolisme lipidique tels que le cancer de la prostate, des poumons, le glioblastome (Guo *et al.*, 2013; Petan *et al.*, 2018; Yue *et al.*, 2014)

Au cours de ce travail, je me suis intéressée à un récepteur fortement impliqué dans la carcinogenèse colorectale : le récepteur TrkB (Akil *et al.*, 2016). L'influence de ce récepteur sur le métabolisme lipidique n'a jamais été évaluée. Avec trois lignées cancéreuses colorectales représentant les trois premiers stades du cancer, un lien étroit entre l'expression du récepteur TrkB et la quantité de gouttelettes lipidiques est établi grâce à la microspectroscopie CARS. Dans le but d'étudier spécifiquement l'implication du récepteur TrkB, j'ai créé à partir d'une lignée cellulaire ne l'exprimant pas, des clones l'exprimant fortement.

Malgré la forte présence du récepteur TrkB à la surface des cellules, il n'apparaît pas de décalage Raman spécifique. Le récepteur étant une protéine transmembranaire, elle aura de ce fait les mêmes caractéristiques vibrationnelles que d'autres protéines membranaires. Afin d'évaluer le rôle de ce récepteur, il est primordial de l'activer par contact avec son ligand, le BDNF. Ceci active les trois voies de signalisation : Ras/MAPK, PI3Kinase (PI3K)/Akt et PLC- γ /PKC, voies de signalisation participant à la prolifération, la survie cellulaire, et la dissémination de cellules permettant la formation de métastases (Akil *et al.*, 2016).

Suite à son activation, l'analyse par la microspectroscopie CARS révèle une nette augmentation de la signature des liaisons CH₂ associée majoritairement aux lipides et à la présence de gouttelettes lipides dans le cytoplasme. J'ai ainsi pu corréler l'activation du récepteur TrkB à une augmentation drastique du métabolisme lipidique.

Par la microspectroscopie CARS j'ai pu mettre en évidence les différentes étapes de la biogenèse lipidique médiée par l'activation du récepteur TrkB : accumulation de lipides neutres entre les deux feuillettes du RE puis génération de gouttelettes lipidiques (Shyu *et al.*, 2018). L'implication de TrkB activé a été validée suite à un traitement simultané des cellules avec du BDNF et du K252a, un inhibiteur compétitif de TrkB. Les cartographies des cellules présentent un niveau basal d'intensité et de localisation des signaux CH₂ comparable à celui observé pour des cellules sans activation de TrkB. Ceci révèle l'implication de l'activation du récepteur TrkB dans le métabolisme lipidique.

Il a été démontré que de nombreuses cellules cancéreuses (cellules de tumeurs de la prostate, du sein, des ovaires, du colon, ... présentent une forte quantité de lipides due à une augmentation du métabolisme lipidique entraînant la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme (Koizume and Miyagi, 2016). Celles-ci jouent un rôle non négligeable dans le processus cancéreux comme la prolifération en favorisant le renouvellement rapide des membranes cellulaires (Shyu *et al.*, 2018). Mais, elles ont également un rôle plus dommageable pour l'organisme : la possibilité de conférer aux cellules tumorales une résistance aux chimiothérapies. Ce phénomène a déjà été observé lors de traitements au paclitaxel sur des cellules de tumeurs du sein, de la prostate et de l'ovaire, également avec l'erlotinib dans le cas du cancer colorectal (Koizume and Miyagi, 2016). Une résistance au 5-fluorouracile et à la doxorubicine corrélée à une augmentation de la quantité de gouttelettes lipidiques a également été décrite dans le cas de carcinomes hépatocellulaires et de CCR (Mehdizadeh *et al.*, 2017). Cette capacité de résistance aux chimiothérapies proviendrait de la composition même des gouttelettes : un cœur hydrophobe capable d'attirer et de séquestrer les drogues lipophiles (Zhang *et al.*, 2016).

Les cellules cancéreuses à fort métabolisme lipidique sont associées à un faible pronostic (Shyu *et al.*, 2018). Aussi, pouvoir identifier, sans marquage préalable, et de manière spécifique les différentes étapes de la biogenèse des gouttelettes lipidiques constitueraient une grande avancée dans le pronostic de cancers.

Chapitre VII. Perspectives

Bien entendu, le but, *in fine*, serait de pouvoir réaliser des études sur des biopsies. En effet, les études *in vitro* sont une première preuve de concept et permettent seulement de valider des hypothèses mais ne correspondent pas à une situation réelle, *in vivo* ou *ex vivo*.

Il faudrait pouvoir réaliser des cartographies CARS sur des tissus sains et cancéreux, en utilisant les deux mêmes décalage Raman. Ces derniers permettront d'obtenir des informations cruciales sur l'état du tissu. La signature associée aux liaisons CH_3 , nous permettra d'identifier le pourcentage de cellule présent en mitose. Dans le cas de tissus cancéreux, les cellules auront une capacité de prolifération accrue, visible par un nombre de cellule en mitose plus important que dans un tissu sain. A l'heure actuelle, cette estimation est réalisée par les histopathologistes grâce à l'index d'activité mitotique (IAM) sur des coupes de tissus colorés (hématoxyline et éosine, Giemsa, ...) par dénombrement des cellules en mitose (Al-Janabi *et al.*, 2013). L'avantage de pouvoir utiliser la microspectroscopie CARS est l'absence de marquage préalable, sa spécificité évitant les confusions avec des corps apoptotiques et des marquages non spécifiques dus aux colorants. La signature associée aux liaisons CH_2 , identifiera, de manière globale, le niveau du métabolisme lipidique, permettant d'identifier un « gonflement » du RE, jusqu'à la formation, non contrôlée, de gouttelettes lipidiques. Cette hypothèse de diagnostic cancéreux par la technologie CARS en utilisant uniquement deux décalages Raman devra être expérimentée et validée par l'utilisation de coupe de tissus mais aussi grâce à une collaboration avec des équipes d'Xlim pour la mise en place d'algorithme de traitement, de calcul et d'indexage visant à une utilisation de la microspectroscopie CARS par des non-physiciens-mathématiciens.

Il est possible d'envisager à plus long terme, la création d'endoscope/fibroscope CARS, permettant de limiter les biopsies et donc moins contraignante pour le patient et contribuant à son bien-être.

Références bibliographiques

Abramczyk, H., Surmacki, J., Kopeć, M., Olejnik, A.K., Lubecka-Pietruszewska, K., and Fabianowska-Majewska, K. (2015). The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *The Analyst* *140*, 2224–2235.

Akil, H., Perraud, A., Jauberteau, M.-O., and Mathonnet, M. (2016). Tropomyosin-related kinase B/brain derived-neurotrophic factor signaling pathway as a potential therapeutic target for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology* *22*, 490.

Al-Janabi, S., van Slooten, H.-J., Visser, M., van der Ploeg, T., van Diest, P.J., and Jiwa, M. (2013). Evaluation of Mitotic Activity Index in Breast Cancer Using Whole Slide Digital Images. *PLoS ONE* *8*, e82576.

Bi, X., Rexer, B., Arteaga, C.L., Guo, M., and Mahadevan-Jansen, A. (2014). Evaluating HER2 amplification status and acquired drug resistance in breast cancer cells using Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* *19*, 025001.

Bonifacio, A., Finaurini, S., Krafft, C., Parapini, S., Taramelli, D., and Sergo, V. (2008). Spatial distribution of heme species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* by use of resonance Raman imaging and multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* *392*, 1277–1282.

Bonnier, F., and Byrne, H.J. (2012). Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems. *The Analyst* *137*, 322–332.

Bower, J.J., Vance, L.D., Psioda, M., Smith-Roe, S.L., Simpson, D.A., Ibrahim, J.G., Hoadley, K.A., Perou, C.M., and Kaufmann, W.K. (2017). Patterns of cell cycle checkpoint deregulation associated with intrinsic molecular subtypes of human breast cancer cells. *Npj Breast Cancer* *3*.

Bruch, J.-F., Sizaret, D., Brault, A., Tabareau-Delalande, F., and Maître, F. (2015). Étude historique du microscope optique : Des premières lentilles du XVI^e siècle aux techniques de super-résolution et de lecture automatisée. *Revue Francophone des Laboratoires* *2015*, 67–79.

Bruch, J.-F., Sizaret, D., Brault, A., Tabareau-Delalande, F., and Maître, F. (2015). Étude historique du microscope optique : Des premières lentilles du XVI^e siècle aux techniques de super-résolution et de lecture automatisée. *Revue Francophone des Laboratoires* *2015*, 67–79.

Capitaine, E. (2017). Nouveaux procédés de microspectroscopie Raman cohérent à bande ultralarge. Université de Limoges.

Capitaine, E., Moussa, N.O., Louot, C., Bardet, S.M., Kano, H., Duponchel, L., Lévêque, P., Couderc, V., and Leproux, P. (2018). Fast epi-detected broadband multiplex CARS and SHG imaging of mouse skull cells. *Biomedical Optics Express* *9*, 245.

Carone, D.M., and Lawrence, J.B. (2013). Heterochromatin instability in cancer: From the Barr body to satellites and the nuclear periphery. *Seminars in Cancer Biology* *23*, 99–108.

Chan, J.W., Taylor, D.S., and Thompson, D.L. (2009). The effect of cell fixation on the discrimination of normal and leukemia cells with laser tweezers Raman spectroscopy. *Biopolymers* 91, 132–139.

Chan, J.W., Taylor, D.S., Zwerdling, T., Lane, S.M., Ihara, K., and Huser, T. (2006). Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells. *Biophysical Journal* 90, 648–656.

Chaturvedi, D., Balaji, S., Bn, V., Ariese, F., Umapathy, S., and Rangarajan, A. (2016). Different Phases of Breast Cancer Cells: Raman Study of Immortalized, Transformed, and Invasive Cells. *Biosensors* 6, 57.

Chen, P., Shen, A., Zhou, X., and Hu, J. (2011). Bio-Raman spectroscopy: a potential clinical analytical method assisting in disease diagnosis. *Analytical Methods* 3, 1257.

Cheng, J.-X., and Xie, X.S. (2004). Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications. *The Journal of Physical Chemistry B* 108, 827–840.

Chniti, M. (2016). Propriétés optiques non linéaires des composés porphyriniques à base de Cobalt et de Zinc de type push-pull. Université de Nantes.

De Los Santos, C., Chang, C.-W., Mycek, M.-A., and Cardullo, R.A. (2015). FRAP, FLIM, and FRET: Detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy: FRAP, FLIM, and FRET: detection and analysis. *Molecular Reproduction and Development* 82, 587–604.

Delhaye, M., and Dhamelincourt, P. (1975). Raman microprobe and microscope with laser excitation. *Journal of Raman Spectroscopy* 3, 33–43.

Dessai, C.V.P., Pliss, A., Kuzmin, A.N., Furlani, E.P., and Prasad, P.N. (2019). Coherent Raman spectroscopic imaging to characterize microglia activation pathway. *Journal of Biophotonics* 12, e201800133.

Diem, M. (2009). Raman Spectral Imaging for the Determination of Structure and Dynamics of Human Cells. 21.

Draux, F., Gobinet, C., Sulé-Suso, J., Manfait, M., Jeannesson, P., and Sockalingum, G.D. (2011). Raman imaging of single living cells: probing effects of non-cytotoxic doses of an anti-cancer drug. *The Analyst* 136, 2718.

Duee, P.-H., Gerber, M., Latino-Martel, P., Latruffe, N., and Pecollo, N. (2011). Nutrition et cancer : Légitimité de recommandations nutritionnelles dans le cadre de la prévention des cancers (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.).

Duncan, M.D., Reintjes, J., and Manuccia, T.J. (1982). Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Optics Letters* 7, 350.

El-Mashtoly, S.F., Petersen, D., Yosef, H.K., Mosig, A., Reinacher-Schick, A., Kötting, C., and Gerwert, K. (2014). Label-free imaging of drug distribution and metabolism in colon cancer cells by Raman microscopy. *The Analyst* 139, 1155.

Evans, C.L., and Xie, X.S. (2008). Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine. *Annual Review of Analytical Chemistry* 1, 883–909.

Fujita, K. (2016). Fast Raman imaging of living cells for biomedical applications. SPIE Newsroom.

Furuta, R., Kurake, N., Takeda, K., Ishikawa, K., Ohta, T., Ito, M., Hashizume, H., Tanaka, H., Kondo, H., Sekine, M., et al. (2017). Lipid droplets exhaustion with caspases activation in HeLa cells cultured in plasma-activated medium observed by multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Biointerphases* 12, 031006.

Ghita, A., Pascut, F.C., Sottile, V., Denning, C., and Notingher, I. (2015). Applications of Raman micro-spectroscopy to stem cell technology: label-free molecular discrimination and monitoring cell differentiation. *EPJ Techniques and Instrumentation* 2, 6.

Giocondi, M.-C., Emmanuel Milhiet, P., Lesniewska, E., and Le Grimmellec, C. (2003). Microscopie à force atomique : de l'imagerie cellulaire à la manipulation moléculaire. *médecine/sciences* 19, 92–99.

Giroud, M. (2015). Implication des microARNs dans la Conversion des Adipocytes Blancs en Adipocytes Thermogéniques. Université Nice Sophia-Antipolis UFR SCIENCE.

Gomes da Costa, S., Richter, A., Schmidt, U., Breuninger, S., and Hollricher, O. (2019). Confocal Raman microscopy in life sciences. *Morphologie* 103, 11–16.

Guo, D., Bell, E.H., and Chakravarti, A. (2013). Lipid metabolism emerges as a promising target for malignant glioma therapy. *CNS Oncology* 2, 289–299.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Harper, J.V., and Brooks, G. (2004). The Mammalian Cell Cycle: An Overview. In *Cell Cycle Control*, (New Jersey: Humana Press), 113–154.

Hedegaard, M., Matthäus, C., Hassing, S., Krafft, C., Diem, M., and Popp, J. (2011). Spectral unmixing and clustering algorithms for assessment of single cells by Raman microscopic imaging. *Theoretical Chemistry Accounts* 130, 1249–1260.

Hilderink, J., Otto, C., Slump, C., Lenferink, A., Engelse, M., van Blitterswijk, C., de Koning, E., Karperien, M., and van Apeldoorn, A. (2013). Label-Free Detection of Insulin and Glucagon within Human Islets of Langerhans Using Raman Spectroscopy. *PLoS ONE* 8, e78148.

Hobro, A.J., and Smith, N.I. (2017). An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy* 91, 31–45.

Holtom, G.R., Thrall, B.D., Chin, B.-Y., Wiley, H.S., and Colson, S.D. (2001). Achieving Molecular Selectivity in Imaging Using Multiphoton Raman Spectroscopy Techniques: Microscopy with Molecular Selectivity. *Traffic* 2, 781–788.

Horton, M.A., Lehenkari, P.P., Charras, G.T., and Nesbitt, S.A. (2000). New technologies in scanning probe microscopy for studying molecular interactions in cells. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2, 1–19.

Huang, X., Irmak, S., Lu, Y.F., Pipinos, I., Casale, G., and Subbiah, J. (2015). Spontaneous and coherent anti-Stokes Raman spectroscopy of human gastrocnemius muscle biopsies in CH-stretching region for discrimination of peripheral artery disease. *Biomedical Optics Express* 6, 2766.

Ichimura, T., Chiu, L., Fujita, K., Kawata, S., Watanabe, T.M., Yanagida, T., and Fujita, H. (2014). Visualizing Cell State Transition Using Raman Spectroscopy. *PLoS ONE* 9, e84478.

Ichimura, T., Chiu, L., Fujita, K., Machiyama, H., Kawata, S., Watanabe, T.M., and Fujita, H. (2015). Visualizing the appearance and disappearance of the attractor of differentiation using Raman spectral imaging. *Scientific Reports* 5.

Jackman, J., and O'Connor, P.M. (1998). Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology* 00, 8.3.1-8.3.20.

Jackson, J.R., Patrick, D.R., Dar, M.M., and Huang, P.S. (2007). Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents? *Nature Reviews Cancer* 7, 107–117.

Jongsma, M.L.M., Berlin, I., and Neefjes, J. (2015). On the move: organelle dynamics during mitosis. *Trends in Cell Biology* 25, 112–124.

Kasas, S. (1992). La microscopie à force atomique dans la recherche en biologie. *médecine/sciences* 8, 140.

Kim, Y., Jeong, S., Jun, B.-H., Lee, Y.-S., Lee, Y.-S., Jeong, D.H., and Lee, D.S. (2017). Endoscopic imaging using surface-enhanced Raman scattering. *European Journal of Nanomedicine* 9, 91–104.

Koizume, S., and Miyagi, Y. (2016). Lipid Droplets: A Key Cellular Organelle Associated with Cancer Cell Survival under Normoxia and Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1430.

Krafft, C. (2012). Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications. *Journal of Biomedical Optics* 17, 040801.

Krafft, C., Dietzek, B., and Popp, J. (2009). Raman and CARS microspectroscopy of cells and tissues. *The Analyst* 134, 1046.

Krafft, C., Knetschke, T., Funk, R.H.W., and Salzer, R. (2006). Studies on Stress-Induced Changes at the Subcellular Level by Raman Microspectroscopic Mapping. *Analytical Chemistry* 78, 4424–4429.

Lam, Y.W. (2005). The nucleolus. *Journal of Cell Science* 118, 1335–1337.

Le, T.T., Huff, T.B., and Cheng, J.-X. (2009). Coherent anti-Stokes Raman scattering imaging of lipids in cancer metastasis. *BMC Cancer* 9.

Le, T.T., Yue, S., and Cheng, J.-X. (2010). Shedding new light on lipid biology with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Lipid Research* 51, 3091–3102.

Lee, Y.J., Vega, S.L., Patel, P.J., Aamer, K.A., Moghe, P.V., and Cicerone, M.T. (2014). Quantitative, Label-Free Characterization of Stem Cell Differentiation at the Single-Cell Level by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Tissue Engineering Part C: Methods* 20, 562–569.

Levchenko, S.M., Peng, X., Liu, L., and Qu, J. (2019). The impact of cell fixation on coherent anti-stokes Raman scattering signal intensity in neuronal and glial cell lines. *Journal of Biophotonics* 12, e201800203.

Liu, Q., Luo, Q., Halim, A., and Song, G. (2017). Targeting lipid metabolism of cancer cells: A promising therapeutic strategy for cancer. *Cancer Letters* 401, 39–45.

Lochs, S.J.A., Kefalopoulou, S., and Kind, J. (2019). Lamina Associated Domains and Gene Regulation in Development and Cancer. *Cells* 8, 271.

Lu, F.-K., Basu, S., Igras, V., Hoang, M.P., Ji, M., Fu, D., Holtom, G.R., Neel, V.A., Freudiger, C.W., Fisher, D.E., et al. (2015). Label-free DNA imaging in vivo with stimulated Raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11624–11629.

Lu, F.-K., Basu, S., Igras, V., Hoang, M.P., Ji, M., Fu, D., Holtom, G.R., Neel, V.A., Freudiger, C.W., Fisher, D.E., et al. (2015). Label-free DNA imaging in vivo with stimulated Raman scattering microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 11624–11629.

Mariani, M.M., Lampen, P., Popp, J., Wood, B.R., and Deckert, V. (2009). Impact of fixation on in vitro cell culture lines monitored with Raman spectroscopy. *The Analyst* 134, 1154.

Matthäus, C., Boydston-White, S., Miljković, M., Romeo, M., and Diem, M. (2006). Raman and Infrared Microspectral Imaging of Mitotic Cells. *Applied Spectroscopy* 60, 1–8.

Matthäus, C., Chernenko, T., Newmark, J.A., Warner, C.M., and Diem, M. (2007). Label-Free Detection of Mitochondrial Distribution in Cells by Nonresonant Raman Microspectroscopy. *Biophysical Journal* 93, 668–673.

Mehdizadeh, A., Bonyadi, M., Darabi, M., Rahbarghazi, R., Montazersaheb, S., Velaei, K., Shaaker, M., and Somi, M.-H. (2017). Common chemotherapeutic agents modulate fatty acid distribution in human hepatocellular carcinoma and colorectal cancer cells. *BioImpacts* 7, 31–39.

Mignolet, A., Wood, B.R., and Goormaghtigh, E. (2018). Intracellular investigation on the differential effects of 4 polyphenols on MCF-7 breast cancer cells by Raman imaging. *The Analyst* 143, 258–269.

Mitra, R., Chao, O., Urasaki, Y., Goodman, O.B., and Le, T.T. (2012). Detection of Lipid-Rich Prostate Circulating Tumour Cells with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *BMC Cancer* 12.

Mohamed, H.T., Untereiner, V., Proult, I., Ibrahim, S.A., Götte, M., El-Shinawi, M., Mohamed, M.M., Sockalingum, G.D., and Brézillon, S. (2018). Characterization of inflammatory breast cancer: a vibrational microspectroscopy and imaging approach at the cellular and tissue level. *The Analyst* 143, 6103–6112.

Nafa, M. (2017). Spectroscopie DRASC en régime hybride fs/ps à haute cadence (kHz) appliquée à la thermométrie des gaz. Hybrid fs/ps CARS spectroscopy at high repetition rate (kHz) for gas thermometry. Thèse. Université Bourgogne Franche-Compté.

Nan, X., Cheng, J.-X., and Xie, X.S. (2003). Vibrational imaging of lipid droplets in live fibroblast cells with coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Lipid Research* 44, 2202–2208.

Nye, S.H., Squinto, S.P., Glass, D.J., Stitt, T.N., Hantzopoulos, P., Macchi, M.J., Lindsay, N.S., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1992). K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. *Molecular Biology of the Cell* 3, 677–686.

Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., Shinohara, Y., Fujita, A., and Fujimoto, T. (2009). Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: From the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 399–407.

Oki, T., Nishimura, K., Kitaura, J., Togami, K., Maehara, A., Izawa, K., Sakaue-Sawano, A., Niida, A., Miyano, S., Aburatani, H., et al. (2015). A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0–G1 transition. *Scientific Reports* 4, 4012

on increased lipid droplet density regulated via a negative regulatory loop with FOXO3/Sirtuin6. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 469, 370–376.

Ou, H.D., Phan, S., Deerinck, T.J., Thor, A., Ellisman, M.H., and O'Shea, C.C. (2017). ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357, eaag0025.

Ouazzani, H.E. (2012). Propriétés optiques non linéaires du deuxième et troisième ordre de nouveaux systèmes organiques conjugués de type push-pull. Université d'Angers.

Paoletti, C., and Hayes, D.F. (2016). Circulating Tumor Cells. In *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer*, V. Stearns, ed. (Cham: Springer International Publishing), 235–258.

Parekh, S.H., Lee, Y.J., Aamer, K.A., and Cicerone, M.T. (2010). Label-Free Cellular Imaging by Broadband Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Biophysical Journal* 99, 2695–2704.

Penrose, H., Heller, S., Cable, C., Makboul, R., Chadlawada, G., Chen, Y., Crawford, S.E., and Savkovic, S.D. (2016). Epidermal growth factor receptor mediated proliferation depends

Perez-Pinera, P., Hernandez, T., García-Suárez, O., de Carlos, F., Germana, A., del Valle, M., Astudillo, A., and Vega, J.A. (2007). The Trk tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarcinomas. *Molecular and Cellular Biochemistry* 295, 19–26.

Petan, T., Jarc, E., and Jusović, M. (2018). Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules* 23, 1941.

Pliss, A., Kuzmin, A.N., Kachynski, A.V., and Prasad, P.N. (2010). Nonlinear Optical Imaging and Raman Microspectrometry of the Cell Nucleus throughout the Cell Cycle. *Biophysical Journal* 99, 3483–3491.

Polli, D., Kumar, V., Valensise, C.M., Marangoni, M., and Cerullo, G. (2018). Broadband Coherent Raman Scattering Microscopy. *Laser & Photonics Reviews* 12, 1800020.

Poon, K.W., Brideau, C., Teo, W., Schenk, G.J., Klaver, R., Klauser, A.M., Kawasoe, J.H., Geurts, J.J.G., and Stys, P.K. (2013). Investigation of human multiple sclerosis lesions using high resolution spectrally unmixed CARS microscopy. *SPIE BiOS*, 85654V.

Ramos, I.R.M., Malkin, A., and Lyng, F.M. (2015). Current Advances in the Application of Raman Spectroscopy for Molecular Diagnosis of Cervical Cancer. *BioMed Research International* 2015, 1–9.

Read, D.S., and Whiteley, A.S. (2015). Chemical fixation methods for Raman spectroscopy-based analysis of bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 109, 79–83.

Roussel, P. (2006). Einstein et la mécanique quantique - Quelques repères, quelques surprises. p. physics/0602044.

Salzman, N.P., Moore, D.E., and Mendelsohn, J. (1966). Isolation and characterization of human metaphase chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 56, 1449–1456.

Scalfi-Happ, C., Udart, M., Hauser, C., and Rück, A. (2011). Investigation of lipid bodies in a colon carcinoma cell line by confocal Raman microscopy. *Medical Laser Application* 26, 152–157.

Schie, I.W., and Huser, T. (2013). Methods and Applications of Raman Microspectroscopy to Single-Cell Analysis. *Applied Spectroscopy* 67, 813–828.

Servant, L., Le Bourdon, G., and Buffeteau, T. (2011). Comprendre la spectroscopie infrarouge : principes et mise en oeuvre. *Photoniques* 68–73.

Shyu, P., Wong, X.F.A., Crasta, K., and Thibault, G. (2018). Dropping in on lipid droplets: insights into cellular stress and cancer. *Bioscience Reports* 38, BSR20180764.

Thiam, A.R., and Beller, M. (2017). The why, when and how of lipid droplet diversity. *Journal of Cell Science* 130, 315–324.

Tirinato, L., Pagliari, F., Limongi, T., Marini, M., Falqui, A., Seco, J., Candeloro, P., Liberale, C., and Di Fabrizio, E. (2017). An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. *Stem Cells International* 2017, 1–17.

Torrente, M.P., Zee, B.M., Young, N.L., Baliban, R.C., LeRoy, G., Floudas, C.A., Hake, S.B., and Garcia, B.A. (2011). Proteomic Interrogation of Human Chromatin. *PLoS ONE* 6, e24747.

Tsikritsis, D., Richmond, S., Stewart, P., Elfick, A., and Downes, A. (2015). Label-free identification and characterization of living human primary and secondary tumour cells. *The Analyst* 140, 5162–5168.

Ulrich, A.B., and Pour, P.M. (2001). Cell Lines. In *Encyclopedia of Genetics*, (Elsevier), 310–311.

Vartiainen, E.M., Rinia, H.A., Müller, M., and Bonn, M. (2006). Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra. *Optics Express* 14, 3622.

Wang, W., McGregor, H., Short, M., and Zeng, H. (2016). Clinical utility of Raman spectroscopy: current applications and ongoing developments. *Advanced Health Care Technologies* 13.

Williams, G.H., and Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology* 226, 352–364.

Wilson, J., and Hunt, T. (2008). *Molecular biology of the cell: the problems book* (New York, NY: Garland Science).

Wu, T., Cheng, B., and Fu, L. (2017). Clinical Applications of Circulating Tumor Cells in Pharmacotherapy: Challenges and Perspectives. *Molecular Pharmacology* 92, 232–239.

Yang, V.W. (2012). The Cell Cycle. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, (Elsevier), 451–471.

Yoneyama, H., Sudo, K., Leproux, P., Couderc, V., Inoko, A., and Kano, H. (2018). Invited Article: CARS molecular fingerprinting using sub-100-ps microchip laser source with fiber amplifier. *APL Photonics* 3, 092408.

Yosef, H.K., Mavarani, L., Maghnouj, A., Hahn, S., El-Mashtoly, S.F., and Gerwert, K. (2015). In vitro prediction of the efficacy of molecularly targeted cancer therapy by Raman spectral imaging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, 8321–8331.

Yu, Y., Ramachandran, P.V., and Wang, M.C. (2014). Shedding new light on lipid functions with CARS and SRS microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841, 1120–1129.

Yue, S., Li, J., Lee, S.-Y., Lee, H.J., Shao, T., Song, B., Cheng, L., Masterson, T.A., Liu, X., Ratliff, T.L., et al. (2014). Cholesteryl Ester Accumulation Induced by PTEN Loss and PI3K/AKT Activation Underlies Human Prostate Cancer Aggressiveness. *Cell Metabolism* 19, 393–406.

Zhang, C., Li, X., Gao, D., Ruan, H., Lin, Z., Li, X., Liu, G., Ma, Z., and Li, X. (2017). The prognostic value of over-expressed TrkB in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8, 99394–99401.

Zhang, I., Cui, Y., Amiri, A., Ding, Y., Campbell, R.E., and Maysinger, D. (2016). Pharmacological inhibition of lipid droplet formation enhances the effectiveness of curcumin in glioblastoma. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 100, 66–76.

Zumbusch, A., Langbein, W., and Borri, P. (2013). Nonlinear vibrational microscopy applied to lipid biology. *Progress in Lipid Research* 52, 615–632.

Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging with 1-millisecond pixel dwell time

HIDEAKI KANO,^{1,2,3,*} TAKUMI MARUYAMA,¹ JUNKO KANO,⁴ YUKI OKA,⁵ DAIKI KANETA,⁵ TIFFANY GUERENNE,⁶ PHILIPPE LEPROUX,^{4,7} VINCENT COUDERC,⁷ AND MASAYUKI NOGUCHI⁸

¹Department of Applied Physics, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

²Institute of Applied Physics, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

³Tsukuba Research Center for Energy Materials Science (TREMS), University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

⁴LEUKOS, 37 Rue Henri Giffard, 87280 Limoges, France

⁵College of Engineering Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan

⁶PEIRENE, EA 7500, University of Limoges, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

⁷Institut de Recherche XLIM, UMR CNRS No. 7252, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges CEDEX, France

⁸Department of Diagnostic Pathology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

*hkano@bk.tsukuba.ac.jp

Abstract: We performed ultra-multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) spectroscopic imaging by using a CCD camera with a fast readout time (<1 ms). The ultra-multiplex CARS signal of a polystyrene bead was detected in the range $600\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ with resolution $<10\text{ cm}^{-1}$. The pixel dwell time was approximately 1 ms, which was limited by the readout time of the CCD camera rather than the exposure time. CARS images of 161×161 pixels were obtained of the polymer beads with a total data-acquisition time of approximately 28 s even with the use of a cost-effective microchip laser source. Label-free and ultra-multiplex (18 colors) imaging of living cells was also performed with an effective exposure time of 1.8 ms based on the molecular fingerprint as well as the C-H and O-H stretching vibrational modes using a master oscillator fiber amplifier laser source.

© 2019 Optical Society of America under the terms of the OSA Open Access Publishing Agreement

1. Introduction

Lately, *spectroscopic imaging* has attracted much attention, in particular in the field of coherent Raman imaging [1–4]. In comparison with spectral imaging, by which multiple wavelength-dependent images are obtained, spectroscopic imaging aims to achieve the vibrational-mode-dependent deconvolution of images with spectral data sets. The use of spectroscopic imaging has become prominent for coherent or nonlinear Raman imaging methods [1–9], among which coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and stimulated Raman scattering (SRS) are two methods that are often used. Based on the CARS and SRS imaging techniques, several kinds of spectroscopic imaging have been reported, such as the multiplex method [10–16], laser-wavelength-scanning method [17–19], spectral focusing method [20], FT-CARS [21–23], and dual-comb method [24]. The multiplex method [10–14] utilizes a multi-channel detector such as a CCD or C-MOS camera with a spectrometer to cover the broad spectral range of the coherent Raman signal. The use of a broadband laser source such as a supercontinuum (SC) light source [16,25] or a femtosecond laser source [26] enables the typical spectral coverage of the multiplex CARS signal to reach approximately 3000 cm^{-1} , which is sufficiently broad to

#359178

Journal © 2019

<https://doi.org/10.1364/OSAC.2.001693>

Received 1 Feb 2019; revised 11 Apr 2019; accepted 14 Apr 2019; published 26 Apr 2019

detect all the vibrational fundamental modes including the fingerprint region as well as the C-H and O-H stretching regions (ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging). In particular, SC generation [12,13] has been achieved by using tapered fibers [12] and photonic crystal fibers (PCFs) [13].

Owing to the high peak power of the laser source, we are not only able to obtain the CARS signal but also other signals resulting from different nonlinear optical processes such as second harmonic generation (SHG), third harmonic generation (THG), and two-photon excitation fluorescence (TPEF), thereby enabling multi-modal nonlinear optical (or multi-photon) imaging [27–29]. We previously used multi-modal nonlinear optical imaging to successfully elucidate that the Rootletin filaments [30] of the rootlets in the retina are SHG-active [31].

Improving the detection speed of multiplex CARS imaging would require the specification of the laser source and multi-channel detector to be optimized. In the present study, living-cell imaging was performed using a SC source pumped by a master oscillator fiber amplifier (MOFA) [32] combined with a new CCD camera with high sensitivity and high-speed read-out. In the course of the study, we found that the new CCD camera allowed us to perform high-speed ultra-multiplex CARS imaging using a low-cost SC source pumped by a microchip laser.

2. Methods

2.1. Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging system

As shown in Fig. 1, two laser sources were incorporated in the experimental setup. The first source is based on a master oscillator fiber amplifier (MOFA) configuration, involving a microchip oscillator and a Yb-doped fiber amplifier (SM-1000, Leukos, France, custom-made). The microchip oscillator is a passively Q-switched laser comprising a Nd:YVO₄ crystal bonded with a saturable absorber mirror and pumped at 808 nm. The fiber amplifier is based on a two-stage configuration including a pre-amplifier and a booster using a polarization-maintaining, large-mode-area, double-clad Yb-doped fiber. The wavelength, temporal duration, repetition rate, and output average power of the MOFA laser source were 1064 nm, 85 ps, and 0.82 MHz, and ~2 W, respectively. The second laser source is a passively Q-switched microchip Nd:YAG laser (Leukos, Limoges, France). The wavelength, temporal duration, repetition rate, and output average power of the source were 1064 nm, 800 ps, 33 kHz, and ~300 mW, respectively; the specification are similar that used in [33]. The two laser sources can be switched based on the sample used in the experiments.

The laser pulses are divided in two with one part being used as the pump radiation (ω_1) for the CARS process and the other being seeded into a PCF to generate an SC, which is used as the Stokes radiation (ω_2) for the CARS process. The SC radiation is collimated by an off-axis parabolic mirror (RC04APC-P01, Thorlabs) to suppress the chromatic aberration. After removing the spectral components shorter than 1064 nm from the SC by combining a color filter (IR80, Kenko Optics) with a sharp long-pass filter (3RD1050LP, Omega Optical), the ω_1 and ω_2 laser pulses were superimposed by a notch filter (NF03-532/1064E-25, Semrock), and then introduced into a modified inverted microscope (ECLIPSE Ti-U, Nikon). Incident laser pulses were tightly focused onto a sample by the water-immersion objective lens (CFI Plan Apo 60×NA 1.27, Nikon). The sample was placed on a piezoelectric stage (Nano-LP200, Mad City Lab) for microscopic imaging, and the CARS signal was collected by the dry objective lens (Plan S Fluor 40×NA 0.6, Nikon), and was dispersed by the spectrometer (LS-785, Princeton Instruments). Finally, the CARS signal was detected by the CCD camera (Blaze 400-HR, Princeton Instruments).

2.2. Sample preparation

To confirm the performance of the developed system, polystyrene beads with a diameter of 10 μm (Polysciences Inc.) were used as test samples for CARS imaging. The original aqueous

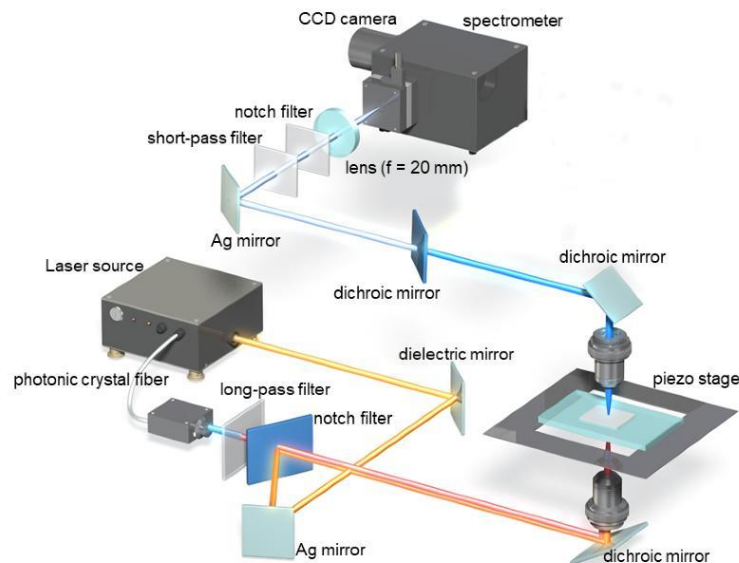


Fig. 1. Experimental setup of ultra-multiplex spectroscopic CARS system.

suspension of the beads was first diluted more than 10 times, and approximately 50 μL of the suspension was sandwiched between a coverslip and a slide glass.

A549 cells derived from a human lung adenocarcinoma were used as living cell samples. The cell line was demonstrated to synthesize lecithin and to contain a high concentration of unsaturated fatty acids [34]. Cells were plated on type collagen-coated chamber slides in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and cultured for two days at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified incubator containing 5% CO_2 in air. Immediately before the measurements, the glass slide was removed from the chamber. The cells on the glass slide were covered with a coverslip, and then sealed with nail varnish. The input laser power at the sample position was set at $\sim 80\text{ mW}$ and $\sim 50\text{ mW}$ for ω_1 and ω_2 , respectively. The total power (130 mW) of the laser source was less than that used in our previous study (200 mW) [32], partly because of the higher sensitivity of the CCD camera used in this study (PIXIS 100-BR-DD/PIXIS 100-BR-DD (Princeton Instruments) was used in the previous living-cell imaging [32]). The pulse energies of the ω_1 and ω_2 pulses at the sample were approximately 100 and 65 nJ, respectively, corresponding to peak power of approximately 1.2 and 0.8 kW. We confirmed, through optical imaging, that the intensity of laser irradiation produced did not lead to substantial morphological changes in the cells.

3. Results and discussion

3.1. Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging of polystyrene beads

We evaluated the system by measuring the CARS signal of a polystyrene bead with a diameter of 10 μm . Figures 2(a) and (b) show the CARS spectra that were recorded by using the software

to specify different exposure times, and the CARS signal at 1003 cm^{-1} , which corresponds to the vibrational mode associated with phenyl ring breathing, and its dependence on the exposure time that was set using the software. The laser source was MOFA, and the laser power for ω_1 and ω_2 was 10 mW and 50 mW, respectively. As we reported previously [32], the CARS signal was detected even when the exposure time was set to “0 ms” using the software. This is due to charge accumulation within the readout time. By extrapolating the results in Fig. 2(b), the effective exposure time by specifying an exposure time of “0 ms” using the software was evaluated to be approximately 0.8 ms. This value agrees well with the readout time of the CCD camera ($\sim 0.7\text{ ms}$), which was output by the software. In addition to the CARS spectrum and image (“0-ms” exposure time) obtained using the MOFA laser source [32], in the present study, detailed evaluation of the effective exposure time is also presented.

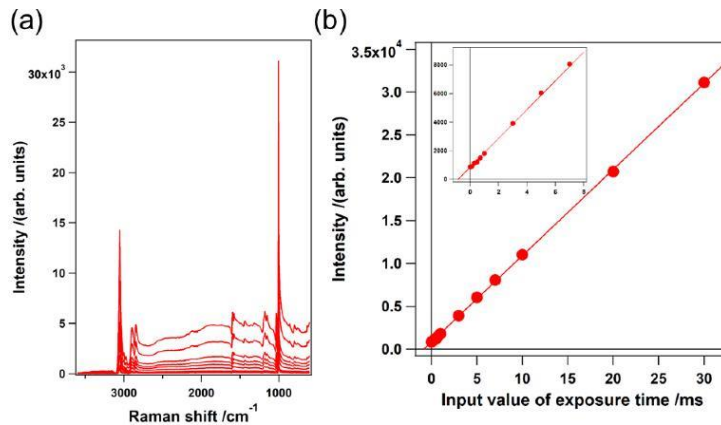


Fig. 2. CARS measurements using the MOFA laser source and the CCD camera with a fast readout time: (a) CARS spectra of a polystyrene bead (intensity uncorrected); (b) Dependence of the exposure time on the CARS signal (solid circles) at 1003 cm^{-1} , which corresponds to the vibrational mode associated with breathing of the phenyl ring and the fitted result (solid line).

Figure 3 shows the depth dependence of the CARS image at 1003 cm^{-1} obtained using the Q-switched microchip Nd:YAG laser source. The input laser power at the sample position was set to $\sim 20\text{ mW}$ and $\sim 8\text{ mW}$ for ω_1 and ω_2 , respectively; this corresponds to peak power of approximately 0.8 and 0.3 kW, respectively. The size of each image was 161×161 pixels, and the total data-acquisition time was approximately 28 s. It should be emphasized that the results in Fig. 3 were obtained using a low-cost microchip laser source, while the MOFA laser was used in [32]. Based on the results of the present study, we confirmed that the passively Q-switched microchip Nd:YAG laser with a 33-kHz repetition rate can also be used for such high-speed measurements. By setting the exposure time to “0 ms” using the software, ultra-multiplex CARS imaging of the polystyrene bead was performed in the spectral range of $600\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ with a pixel dwell time of approximately 1 ms, which was limited mainly by the readout time of the CCD camera.

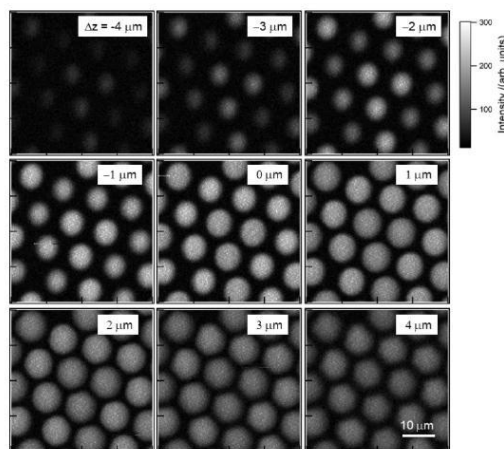


Fig. 3. CARS images in the phenyl-ring breathing vibrational mode (1003 cm^{-1}) at different depth positions; the images were obtained using the passively Q-switched microchip Nd:YAG laser and the CCD camera with a fast readout time. The exposure time was set to 0 ms using software. The resolution of image was 161×161 pixels, and the total data-acquisition time was approximately 28 s.

3.2. Ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging of living cells

Figures 4(a) and (b) show an optical image of a living cell (A549) and the corresponding CARS image of the same cell. CARS imaging was performed using the combination of the MOFA laser source and the CCD camera with a fast readout time. The CARS image was mapped out simply by using the intensity of the raw CARS signal at the apparent peak position at 2850 cm^{-1} . The exposure time at each pixel was 10 ms. The sharp peak observed at 2850 cm^{-1} on the red spectrum in Fig. 4(c) corresponds to one of the bright spots inside the cell. As is well known, the band at approximately 2850 cm^{-1} corresponds to the CH_2 stretching vibrational mode, which is observed mainly in intracellular lipid droplets. A raw CARS signal consists of both a vibrationally resonant signal and so-called nonresonant background (NRB), which interfere with each other and produce dispersive line shapes (See Fig. 4(c)). We extracted the pure vibrationally resonant signal to obtain *spontaneous-Raman-equivalent* spectral profiles by performing numerical analysis using the maximum entropy method (MEM) [35]. The spectral profile of the pure vibrationally resonant signal, which corresponds to the imaginary part of $\chi^{(3)}$ ($\text{Im}[\chi^{(3)}]$), is shown in Fig. 5. The main features of the spectral profiles in red and blue in Fig. 5 are in good agreement with those of intracellular lipids and proteins, respectively [36,37]. In particular, the characteristic Raman bands are indicated in Fig. 5; namely, the bands at 3427 , 3200 , 3066 , 3017 , 2930 , 2854 , 1744 , 1657 , 1451 , 1438 , 1303 , 1265 , and 1009 cm^{-1} correspond to the vibrational modes due to OH antisymmetric and symmetric stretching, aromatic CH stretching, $=\text{C-H}$ stretching, CH_3 symmetric stretching, CH_2 symmetric stretching, C=O stretching, Amide I and/or *cis* C=C stretching, CH_3 degenerate deformation, CH_2 scissoring, and phenyl-ring breathing vibrational modes, respectively. A list of these vibrational modes has been reported elsewhere in part [32].

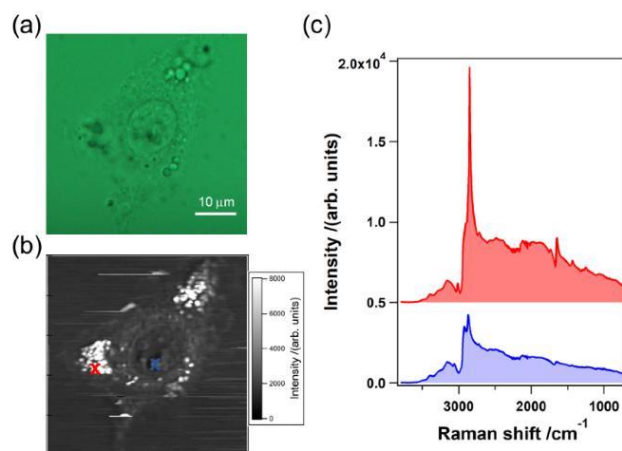


Fig. 4. (a) Optical image of an A549 cell; (b) CARS intensity mapping at 2850 cm^{-1} ; (c) Spectral profiles of the raw CARS signal indicated at the two positions in (b) using red and blue crosses. The images were obtained using the MOFA laser source and a CCD camera with a fast readout time.

We analyzed the spectral profile in more detail by decomposing the $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectra into the sum of the Gaussian bands at each cell position. Figure 6 shows the typical fitted result of the intra-cellular-averaged $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectrum in the CH stretching region. In this study, we performed a more detailed analysis of the CH-stretching vibrational band when the analysis in [32]. Overall, the spectral profile was well fitted by seven Gaussian functions at 3017 , 2953 , 2939 , 2921 , 2902 , 2872 , and 2854 cm^{-1} . Based on the fitting procedure as shown in Fig. 6, ultra-multiplex spectroscopic CARS images are obtained. Figure 7 summarizes the results, where Figs. 7(a–r) show the CARS images at 3427 , 3200 , 3066 , 3017 , 2953 , 2939 , 2921 , 2902 , 2872 , 2854 , 1744 , 1657 , 1451 , 1438 , 1303 , 1284 , 1265 , and 1009 cm^{-1} , respectively. The exposure time at each pixel was 10 ms. Because the CARS images at the vibrational bands at 2939 and 2921 cm^{-1} are similar to each other, and these bands are adjacent to each other, we considered the sum of the Gaussian bands at 2939 and 2921 cm^{-1} to be regarded as a single vibrational band (purple broken curve in Fig. 6). The vibrational bands in the present study were assigned by taking into account the CARS image contrast (see Fig. 7) and the literature values [38–46]. The results are summarized in Table 1. In the present study, we assume that the band at 2902 cm^{-1} is in the CH_2 anti-symmetric stretching mode.

The microscopic intracellular structures were visualized, as shown in Fig. 7. Particle-like structures with a diameter of a few micrometers were observed in the cytoplasm, as shown in Figs. 8(d), (j), (k), (n), (o), and (q). These bands are assigned as the C-H stretching vibrational mode of $=\text{C-H}$ bonds (d), CH_2 symmetric stretching vibrational mode (j), $\text{C}=\text{O}$ stretch mode of the ester (k), CH_2 scissoring mode (n), CH_2 twisting mode (o), and $=\text{C-H}$ bending mode (q), all of which are typically observed for lipids. These organelles are, therefore, safely assigned as lipid droplets. As clearly shown in the CARS image (d) and (q), the lipid droplets contain rich unsaturated lipids. These results are consistent with the characteristics of the A549 cell, which is well known to produce unsaturated fats. On the other hand, the CARS image at 2939

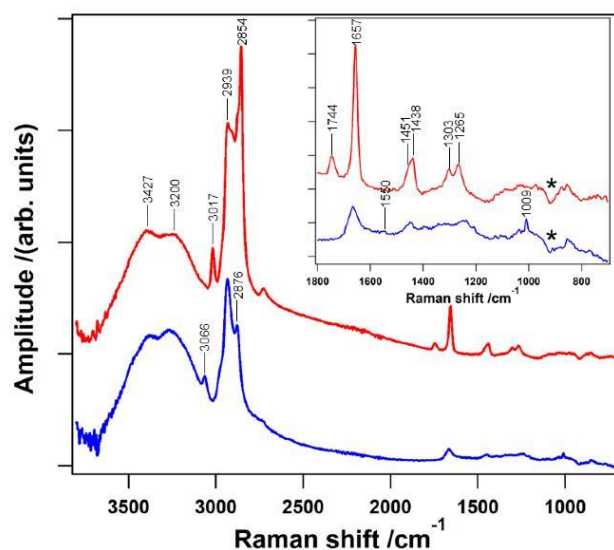


Fig. 5. Spontaneous-Raman-equivalent $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectra at the two intracellular positions indicated as red and blue crosses in Fig. 4(b). The inset shows enlarged spectral profiles in the fingerprint region. The dips indicated by “*” are artifacts due to the CARS spectral correction process, in which the CARS signal at each spatial point was divided by the nonresonant background of the coverslip underneath the suspension cell.

Table 1. Vibrational bands and their assignments for the intracellular $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectrum [38–46]

Typical Raman shift values(cm^{-1})	Assignment	Main molecular components
3427	O-H a-stretch.	Water
3200	O-H s-stretch.	Water
3066	C-H stretch.(aromatic)	Proteins
3017	=C-H stretch.	Lipids
2953	CH ₃ a-stretch.	DNA & RNAs
~2930	CH ₃ s-stretch.	Proteins/Lipids
2902	CH ₂ a-stretch.	Lipids/Proteins
2872	Overtone of CH ₃ deform. in Fermi resonance with CH ₃ s-stretch.	Proteins/Lipids
2854	CH ₂ s-stretch.	Lipids
1744	C=O stretch. (ester)	Lipids
1657	cis C=C stretch/Amide I	Lipids/Proteins
~1550	Purine ring (adenine and guanine)	DNA & RNAs
1451	CH ₃ deg. deform.	Proteins
1438	CH ₂ scis.	Lipids
1303	CH ₂ twist.	Lipids
~1284	Amide III/C-H bend	Proteins
1265	=C-H bend.	Lipids
1004	Phenyl ring breath.	Proteins

Abbreviations: stretch.: stretching; deform.: deformation; rock.: rocking; twist.: twisting; scis.: scissors; bend.: bending; sym. or s- symmetric; anti. or a- antisymmetric; deg.: degenerate; breath.: breathing; Phe: phenylalanine.

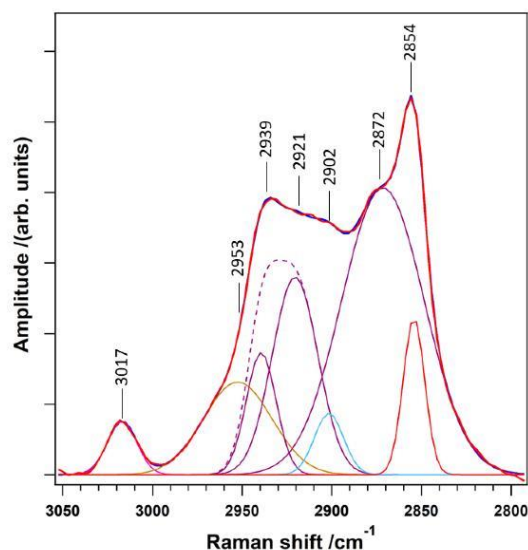


Fig. 6. Fitted results of the $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectrum in the CH stretching vibrational modes. Seven Gaussian functions centered at 2854, 2872, 2902, 2921, 2940, 2953, and 3017 cm^{-1} reproduced the experimentally obtained $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectrum well.

and 2921 cm^{-1} indicates a dark round structure in the cell. This corresponds to the cell nucleus. The intra-nuclear bright spots are assignable to the nucleolus, which introduces high vibrational contrast to the CARS images (c), (e), (f), (g), (i), (m), and (r). These vibrational modes correspond to the aromatic CH stretching (c), CH_3 asymmetric stretching (e), CH_3 symmetric stretching ((f) and (g)), overtone of CH_3 deformation in Fermi resonance with CH_3 symmetric stretching (i), CH_3 degenerate deformation (m), and phenyl ring breathing (r) vibrational modes, respectively. In our previous report on HeLa cells [32], the bands due to DNA and RNA were clearly observed, whereas the present results on A549 only exhibit weak signal intensity centered at 1550 cm^{-1} , probably due to cell-line dependence and the low signal-to-noise ratio in this study. In addition, the CARS image at 2902 cm^{-1} shows clear vibrational contrast at the nuclear membrane. We therefore assign the band at 2902 cm^{-1} as the CH_2 anti-symmetric vibrational mode due to phospholipids. On the other hand, the CARS images at 3427 and 3200 cm^{-1} , which correspond to OH stretching vibrational modes, have low contrast in the field of view.

In this study, we realized high-speed ultra-multiplex CARS imaging by performing live-cell imaging with an exposure time (on the software) of 1 ms using a combination of the MOFA laser source and a CCD camera with a fast readout time. Taking into account the finite readout time, the effective exposure time per pixel was estimated to be approximately 1.8 ms, which is a significant reduction compared to the previous study on living-cell imaging (exposure time per pixel: 50 ms) [32]. The improvement in the data-acquisition time was mainly due to the difference in the sensitivity and the readout speed of the CCD camera. The readout times in the present and the previous study [32] were 0.8 ms and ~ 3 ms, respectively. Figure 8 shows the result of the 200- μm^2 square (401 $\times$ 401 pixels) ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging.

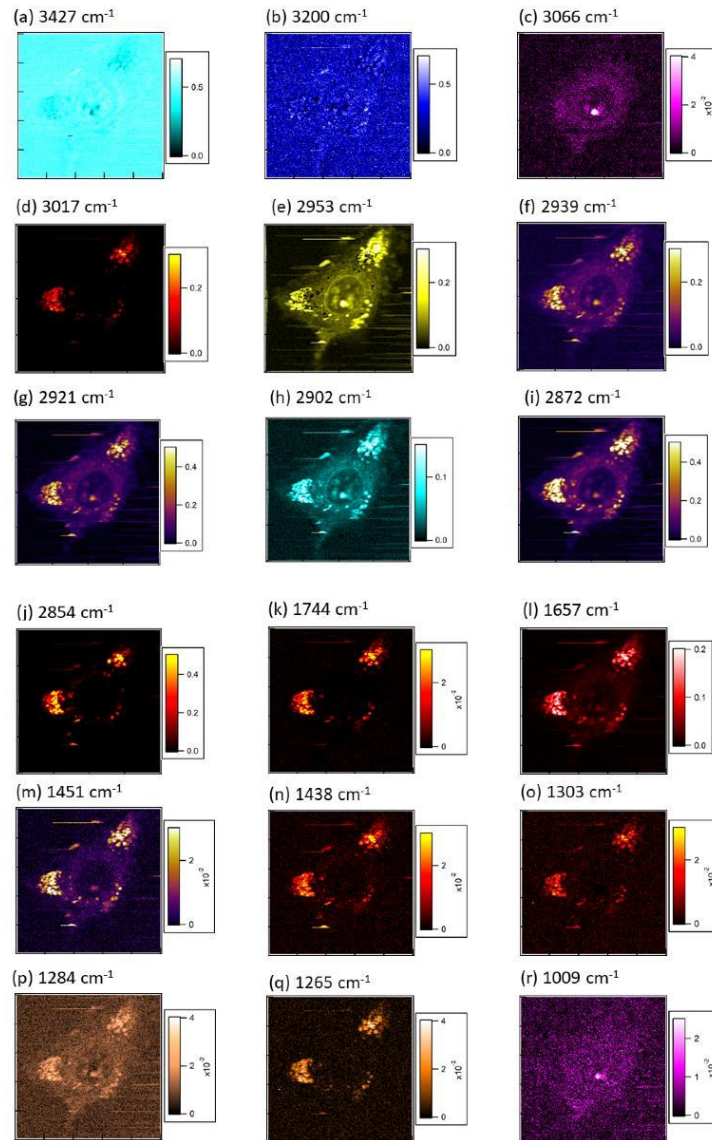


Fig. 7. CARS images of an A549 cell in G1 phase at (a) 3427, (b) 3200, (c) 3066, (d) 3017, (e) 2953, (f) 2939, (g) 2921, (h) 2902, (i) 2872, (j) 2854, (k) 1744, (l) 1657, (m) 1451, (n) 1438, (o) 1303, (p) 1284, (q) 1265, and (r) 1009 cm^{-1} , respectively. The exposure time per pixel was 10 ms. The images were obtained using the MOFA laser source and the CCD camera with a fast readout time.

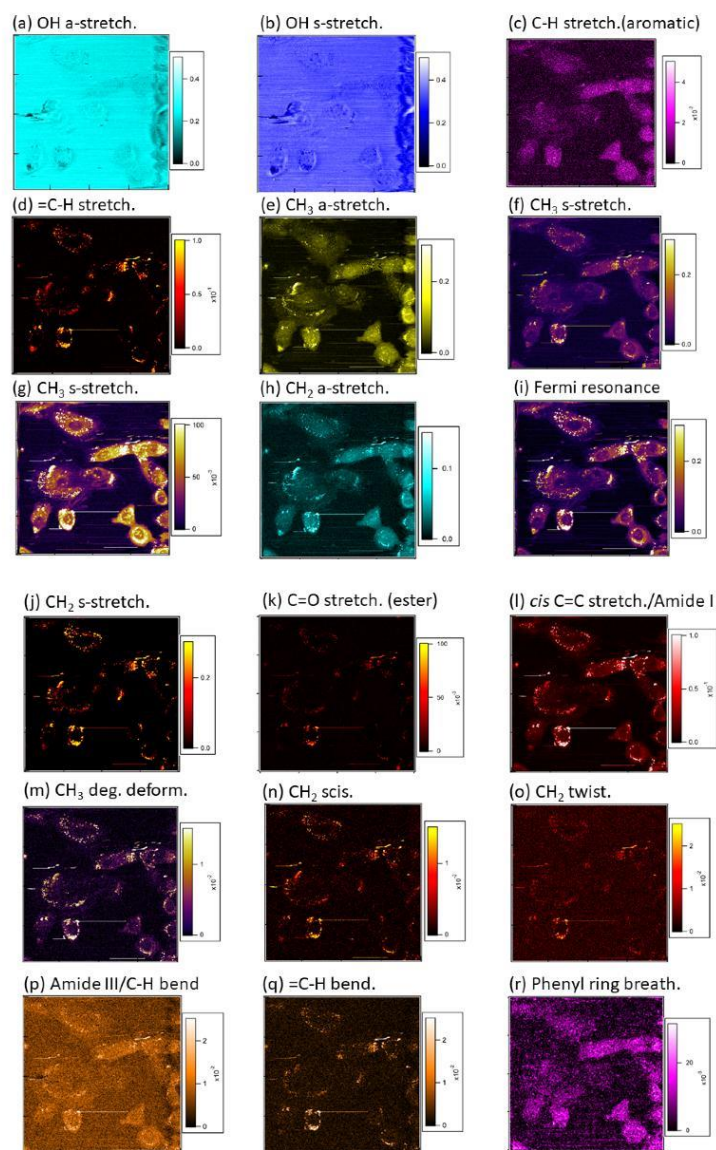


Fig. 8. CARS images of A549 cells at (a) 3427, (b) 3200, (c) 3066, (d) 3017, (e) 2953, (f) 2939, (g) 2921, (h) 2902, (i) 2872, (j) 2854, (k) 1744, (l) 1657, (m) 1451, (n) 1438, (o) 1303, (p) 1284, (q) 1265, and (r) 1009 cm^{-1} , respectively. The exposure time per pixel was ~ 1.8 ms. The images were obtained using the MOFA laser source and the CCD camera with a fast readout time.

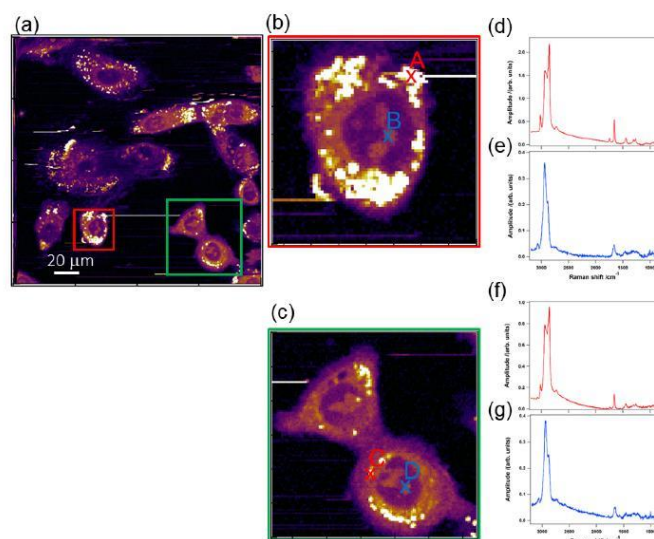


Fig. 9. (a) CARS image of A549 cells at 2939 cm^{-1} (the same as in Fig. 8(f)); Enlargements of the CARS images in the red (b) and green (c) boxes in (a); $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectra at position A (red cross in (b)) (d), B (blue cross in (b)) (e), C (red cross in (c)) (f), and D (blue cross in (c)) (g)

The spectral profiles of the $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectra are similar to those in Fig. 7. As clearly shown in Fig. 8, each cell is visualized using different vibrational contrast with an exposure time of approximately 1.8 ms per pixel. Figure 9 shows enlargements ((b) and (c)) and spectral profiles ((d-g)) of the images in Fig. 8. The red (Fig. 9(d) and (f)) and blue (Fig. 9(e) and (g)) spectral profiles in Fig. 9 show the $2\text{-}\mu\text{m}^2$ -spatially averaged $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ spectra, which are assignable to unsaturated lipids and proteins, respectively. The use of an effective exposure time of ~ 1.8 ms enabled us to perform ultra-multiplex CARS imaging of living cells.

4. Conclusion

In this study, we performed ultra-multiplex CARS spectroscopic imaging using a CCD camera with a high-speed readout time. The exposure time was reduced to 0.8 ms, limited by the readout time of the CCD camera. CARS images (with resolution of 161×161 pixels) of polymer beads were obtained with the total data-acquisition time of approximately 28 s, despite the use of a low-cost microchip laser source. Based on the clear molecular fingerprint, we successfully visualized intracellular molecular distribution with more than 15 vibrational bands with an effective exposure time of 1.8 ms using the MOFA laser source. The combination of this visualization technique with multivariate analysis methods, such as multivariate curve resolution-alternating least-square (MCR-ALS) [47], can help researchers gain meaningful insights into the dynamics of intracellular metabolic activity. Our label-free imaging presents considerable potential for miniaturized, non-invasive, real-time, and cellular-level molecular diagnostics for experimental and clinical applications.

Funding

Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (18H02000); Konica Minolta Imaging Science Foundation.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the assistance of J. Ukon of Ukon Craft Science, Ltd. with establishing this fruitful collaboration between Japanese and French laboratories. The authors thank Princeton Instruments for providing the Blaze, a new type of CCD camera that enabled us to perform ultra-multiplex ($600\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$) CARS spectroscopic imaging in the fastest recorded time.

Disclosures

The authors declare that there are no conflicts of interest related to the work in this article.

References

1. J. X. Cheng and X. S. Xie, "Vibrational spectroscopic imaging of living systems: An emerging platform for biology and medicine," *Science* **350**(6264), aaa8870 (2015).
2. H. Kano, "Molecular Spectroscopic Imaging Using a White-Light Laser Source," *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **83**(7), 735–743 (2010).
3. C. Zhang and J.-X. Cheng, "Perspective: Coherent Raman scattering microscopy, the future is bright," *APL Photonics* **3**(9), 090901 (2018).
4. L. Wei, Z. Chen, L. Shi, R. Long, A. V. Anzalone, L. Zhang, F. Hu, R. Yuste, V. W. Cornish, and W. Min, "Super-multiplex vibrational imaging," *Nature* **544**(7651), 465–470 (2017).
5. J. P. R. Day, K. F. Domke, G. Rago, H. Kano, H. Hamaguchi, E. M. Vartiainen, and M. Bonn, "Quantitative Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (CARS) Microscopy," *J. Phys. Chem. B* **115**(24), 7713–7725 (2011).
6. W. Min, C. W. Freudiger, S. J. Lu, and X. S. Xie, "Coherent Nonlinear Optical Imaging: Beyond Fluorescence Microscopy," *Annu. Rev. Phys. Chem.* **62**(1), 507–530 (2011).
7. C. Y. Chung, J. Boik, and E. O. Potma, "Biomolecular Imaging with Coherent Nonlinear Vibrational Microscopy," *Annu. Rev. Phys. Chem.* **64**(1), 77–99 (2013).
8. C. S. Liao and J. X. Cheng, "In Situ and In Vivo Molecular Analysis by Coherent Raman Scattering Microscopy," *Annu. Rev. Anal. Chem.* **9**(1), 69–93 (2016).
9. C. H. Camp Jr and M. T. Cicerone, "Chemically sensitive bioimaging with coherent Raman scattering," *Nat. Photonics* **9**(5), 295–305 (2015).
10. J. X. Cheng, A. Volkmer, L. D. Book, and X. S. Xie, "Multiplex coherent anti-stokes Raman scattering microscopy and study of lipid vesicles," *J. Phys. Chem. B* **106**(34), 8493–8498 (2002).
11. M. Muller and J. M. Schins, "Imaging the thermodynamic state of lipid membranes with multiplex CARS microscopy," *J. Phys. Chem. B* **106**(14), 3715–3723 (2002).
12. T. W. Kee and M. T. Cicerone, "Simple approach to one-laser, broadband coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *Opt. Lett.* **29**(23), 2701–2703 (2004).
13. H. Kano and H. Hamaguchi, "Ultrabroadband ($> 2500\text{ cm}^{-1}$) multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a supercontinuum generated from a photonic crystal fiber," *Appl. Phys. Lett.* **86**(12), 121113 (2005).
14. G. I. Petrov and V. V. Yakovlev, "Enhancing red-shifted white-light continuum generation in optical fibers for applications in nonlinear Raman microscopy," *Opt. Express* **13**(4), 1299–1306 (2005).
15. E. R. Andresen, H. N. Paulsen, V. Birkedal, J. Thogersen, and S. R. Keiding, "Broadband multiplex coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy employing photonic-crystal fibers," *J. Opt. Soc. Am. B* **22**(9), 1934–1938 (2005).
16. C. H. Camp Jr., Y. J. Lee, J. M. Heddeston, C. M. Hartshorn, A. R. Hight Walker, J. N. Rich, J. D. Lathia, and M. T. Cicerone, "High-Speed Coherent Raman Fingerprint Imaging of Biological Tissues," *Nat. Photonics* **8**(8), 627–634 (2014).
17. C. W. Freudiger, W. Min, G. R. Holtom, B. Xu, M. Dantus, and X. S. Xie, "Highly specific label-free molecular imaging with spectrally tailored excitation stimulated Raman scattering (STE-SRS) microscopy," *Nat. Photonics* **5**(2), 103–109 (2011).
18. Y. Ozeki, W. Umemura, Y. Otsuka, S. Satoh, H. Hashimoto, K. Sumimura, N. Nishizawa, K. Fukui, and K. Itoh, "High-speed molecular spectral imaging of tissue with stimulated Raman scattering," *Nat. Photonics* **6**(12), 845–851 (2012).
19. C.-S. Liao, K.-C. Huang, W. Hong, A. J. Chen, C. Karanja, P. Wang, G. Eakins, and J.-X. Cheng, "Stimulated Raman spectroscopic imaging by microsecond delay-line tuning," *Optica* **3**(12), 1377 (2016).

20. T. Hellerer, A. M. K. Enejder, and A. Zumbusch, "Spectral focusing: High spectral resolution spectroscopy with broad-bandwidth laser pulses," *Appl. Phys. Lett.* **85**(1), 25–27 (2004).
21. J. P. Ogilvie, E. Beaupaire, A. Alexandrou, and M. Joffe, "Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy," *Opt. Lett.* **31**(4), 480–482 (2006).
22. K. Hashimoto, M. Takahashi, T. Ideguchi, and K. Goda, "Broadband coherent Raman spectroscopy running at 24,000 spectra per second," *Sci. Rep.* **6**(1), 21036 (2016).
23. K. Hashimoto, J. Omachi, and T. Ideguchi, "Ultra-broadband rapid-scan Fourier-transform CARS spectroscopy with sub-10-fs optical pulses," *Opt. Express* **26**(11), 14307–14314 (2018).
24. T. Ideguchi, S. Holzner, B. Bernhardt, G. Guelachvili, N. Picque, and T. W. Hansch, "Coherent Raman spectro-imaging with laser frequency combs," *Nature* **502**(7471), 355–358 (2013).
25. M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, J. P. R. Day, M. Bonn, and H. Hamaguchi, "Quantitative CARS Molecular Fingerprinting of Single Living Cells with the Use of the Maximum Entropy Method," *Angew. Chem. Int. Edit.* **49**(38), 6773–6777 (2010).
26. K. Isobe, A. Suda, M. Tanaka, H. Hashimoto, F. Kannari, H. Kawano, H. Mizuno, A. Miyawaki, and K. Midorikawa, "Single-pulse coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy employing an octave spanning pulse," *Opt. Express* **17**(14), 11259–11266 (2009).
27. H. Segawa, M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, "Label-free tetra-modal molecular imaging of living cells with CARS, SHG, THG and TSFG (coherent anti-Stokes Raman scattering, second harmonic generation, third harmonic generation and third-order sum frequency generation)," *Opt. Express* **20**(9), 9551–9557 (2012).
28. H. Segawa, Y. Kaji, P. Leproux, V. Couderc, T. Ozawa, T. Oshika, and H. Kano, "Multimodal and multiplex spectral imaging of rat cornea ex vivo using a white-light laser source," *J. Biophotonics* **8**(9), 705–713 (2015).
29. C. Lefort, R. P. O'Connor, V. Blanquet, L. Magnol, H. Kano, V. Tombelaïne, P. Leveque, V. Couderc, and P. Leproux, "Multicolor multiphoton microscopy based on a nanosecond supercontinuum laser source," *J. Biophotonics* **9**(7), 709–714 (2016).
30. R. Vlijm, X. Li, M. Panic, D. Ruthnick, S. Hata, F. Herrmannsdorfer, T. Kuner, M. Heilemann, J. Engelhardt, S. W. Hell, and E. Schiebel, "STED nanoscopy of the centrosome linker reveals a CEP68-organized, periodic rootletin network anchored to a C-Nap1 ring at centrioles," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**(10), E2246–E2253 (2018).
31. T. Akiyama, A. Inoko, Y. Kaji, S. Yonemura, K. Kakiguchi, H. Segawa, K. Ishitsuka, M. Yoshida, O. Numata, P. Leproux, V. Couderc, T. Oshika, and H. Kano, "SHG-specificity of cellular Rootletin filaments enables naive imaging with universal conservation," *Sci. Rep.* **7**(1), 39967 (2017).
32. H. Yoneyama, K. Sudo, P. Leproux, V. Couderc, A. Inoko, and H. Kano, "CARS molecular fingerprinting using sub-100-ps microchip laser source with fiber amplifier," *APL Photonics* **3**(9), 092408 (2018).
33. M. Okuno, H. Kano, P. Leproux, V. Couderc, and H. Hamaguchi, "Quantitative coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy using a nanosecond supercontinuum light source," *Opt. Fiber Technol.* **18**(5), 388–393 (2012).
34. M. Lieber, G. Todaro, B. Smith, A. Szakal, and W. Nelson-Rees, "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells," *Int. J. Cancer* **17**(1), 62–70 (1976).
35. E. M. Vartiainen, H. A. Rinia, M. Müller, and M. Bonn, "Direct extraction of Raman line-shapes from congested CARS spectra," *Opt. Express* **14**(8), 3622–3630 (2006).
36. H. W. Wu, J. V. Volponi, A. E. Oliver, A. N. Parikh, B. A. Simmons, and S. Singh, "In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**(9), 3809–3814 (2011).
37. D. Fu, F. K. Lu, X. Zhang, C. Freudiger, D. R. Pernik, G. Holtom, and X. S. Xie, "Quantitative Chemical Imaging with Multiplex Stimulated Raman Scattering Microscopy," *J. Am. Chem. Soc.* **134**(8), 3623–3626 (2012).
38. T. Shimanouchi, "Tables of molecular vibrational frequencies. Consolidated volume II," *J. Phys. Chem. Ref. Data* **6**(3), 993–1102 (1977).
39. Q. Matthews, A. Brolo, J. Lum, X. Duan, and A. Jirasek, "Raman spectroscopy of single human tumour cells exposed to ionizing radiation in vitro," *Phys. Med. Biol.* **56**(1), 19–38 (2011).
40. M. T. Cicerone and C. H. Camp, "Histological coherent Raman imaging: a prognostic review," *Analyst* **143**(1), 33–59 (2018).
41. C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, and R. Salzer, "Near infrared Raman spectra of human brain lipids," *Spectrochim. Acta, Part A* **61**(7), 1529–1535 (2005).
42. B. W. Barry, H. G. M. Edwards, and A. C. Williams, "Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: Assignment of spectral bands," *J. Raman Spectrosc.* **23**(11), 641–645 (1992).
43. H. Deng, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides, and G. J. Thomas, "Dependence of the Raman signature of genomic B-DNA on nucleotide base sequence," *Biopolymers* **50**(6), 656–666 (1999).
44. R. G. Snyder, H. L. Strauss, and C. A. Elliger, "Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. I. Long, disordered chains," *J. Phys. Chem.* **86**(26), 5145–5150 (1982).
45. R. G. Snyder and J. R. Scherer, "Band structure in the C–H stretching region of the Raman spectrum of the extended polymethylene chain: Influence of Fermi resonance," *J. Chem. Phys.* **71**(8), 3221–3228 (1979).
46. K. G. Brown, E. Bicknell-Brown, and M. Ladjaj, "Raman-active bands sensitive to motion and conformation at the chain termini and backbones of alkanes and lipids," *J. Phys. Chem.* **91**(12), 3436–3442 (1987).
47. M. Ando and H. Hamaguchi, "Molecular component distribution imaging of living cells by multivariate curve resolution analysis of space-resolved Raman spectra," *J. Biomed. Opt.* **19**(1), 011016 (2014).

Manuscript received 12 March 2019; revised manuscript received 15 May 2019; accepted manuscript received 15 May 2019.



Résumé

Parmi les technologies d'analyses d'échantillons biologiques sans marquage préalable, la microspectroscopie vibrationnelle est en plein essor. Grâce à la vibration des liaisons entre atomes, elle permet de localiser dans la cellule des biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides) associées à des organites. Mon étude a consisté à utiliser la microspectroscopie CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) pour l'analyse de cellules dans la zone CH du spectre Raman, zone fortement résolue ($< 1 \text{ cm}^{-1}$) et restreinte ($2500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$). Les vibrations correspondant aux liaisons CH_2 et CH_3 sont majoritairement associées respectivement aux lipides et aux protéines. À partir de cultures synchrones, j'ai pu mettre en évidence des différences permettant de distinguer des cellules en interphase de cellules en mitose, et pour cette dernière phase ses cinq sous-phases grâce à l'évolution de l'hétérochromatine voire celle du réticulum endoplasmique. J'ai également suivi dans des cellules en interphase les changements du métabolisme lipidique dûs à l'activation du récepteur TrkB, souvent présent dans les cellules tumorales. Après avoir créé des clones de cellules HEK exprimant TrkB, j'ai observé l'apparition de gouttelettes lipidiques dans les cellules suite à son activation. Ce même type de gouttelettes est présent dans trois lignées cellulaires de trois stades du cancer colorectal, et j'ai établi un lien direct entre l'activation de TrkB et la présence de gouttelettes lipidiques. Ainsi, la microspectroscopie CARS permet par analyse dans la zone CH de suivre la biogenèse des gouttelettes lipidiques. Cette méthode d'analyse pourrait être exploitée pour la recherche sans marquage préalable de cellules cancéreuses dans un tissu, faisant de la microspectroscopie CARS un outil de diagnostic.

Mots clés : Microspectroscopie CARS, interphase, mitose hétérochromatine, récepteur TrkB, gouttelettes lipidiques, cancer

Abstract

Vibrational microspectroscopy is a rapidly emerging label-free technique that allows the probing of live cell. Thanks to the vibration of the chemical bonds, it makes it possible to locate in the cell biomolecules (proteins, nucleic acids, lipids) associated with organelles. My study consisted in using Coherent Anti-Storage Raman Spectroscopy (CARS) microspectroscopy in the CH zone of the Raman spectrum, a highly resolved ($<1 \text{ cm}^{-1}$) and restricted interval ($2500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$). Vibrations corresponding to the CH_2 and CH_3 chemical groups are mainly associated with lipids and proteins, respectively. Using synchronous cultures, I have been able to highlight differences between cells in interphase and cells in mitosis and, more interestingly, the five sub-phases of mitosis, thanks to the evolutions of heterochromatin and endoplasmic reticulum as wel. I also tracked, in cells in interphase, the changes in lipid metabolism following activation of the TrkB receptor, often expressed in tumor cells. Specific lipid droplets showed up in HEK cell expressing TrkB activated. This same type of droplets has been observed in three cell lines derived from three stages of colorectal cancer. I have established a direct link between TrkB activation and the presence of these lipid droplets. Thus, CARS microspectroscopy makes it possible to follow the biogenesis of lipid droplets by analysis in the CH zone. This method could be exploited to find out, without prior labeling, cancer cells in a tissue, making CARS microspectroscopy a useful diagnostic tool. .

Keyword : CARS microspectroscopy, interphase, mitosis, heterochromatin, TrkB receptor, lipid droplets, cancer





Résumé

Parmi les technologies d'analyses d'échantillons biologiques sans marquage préalable, la microspectroscopie vibrationnelle est en plein essor. Grâce à la vibration des liaisons entre atomes, elle permet de localiser dans la cellule des biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides) associées à des organites. Mon étude a consisté à utiliser la microspectroscopie CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) pour l'analyse de cellules dans la zone CH du spectre Raman, zone fortement résolue ($< 1 \text{ cm}^{-1}$) et restreinte ($2500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$). Les vibrations correspondant aux liaisons CH_2 et CH_3 sont majoritairement associées respectivement aux lipides et aux protéines. À partir de cultures synchrones, j'ai pu mettre en évidence des différences permettant de distinguer des cellules en interphase de cellules en mitose, et pour cette dernière phase ses cinq sous-phases grâce à l'évolution de l'hétérochromatine voire celle du réticulum endoplasmique. J'ai également suivi dans des cellules en interphase les changements du métabolisme lipidique dûs à l'activation du récepteur TrkB, souvent présent dans les cellules tumorales. Après avoir créé des clones de cellules HEK exprimant TrkB, j'ai observé l'apparition de gouttelettes lipidiques dans les cellules suite à son activation. Ce même type de gouttelettes est présent dans trois lignées cellulaires de trois stades du cancer colorectal, et j'ai établi un lien direct entre l'activation de TrkB et la présence de gouttelettes lipidiques. Ainsi, la microspectroscopie CARS permet par analyse dans la zone CH de suivre la biogenèse des gouttelettes lipidiques. Cette méthode d'analyse pourrait être exploitée pour la recherche sans marquage préalable de cellules cancéreuses dans un tissu, faisant de la microspectroscopie CARS un outil de diagnostic.

Mots clés : Microspectroscopie CARS, interphase, mitose hétérochromatine, récepteur TrkB, gouttelettes lipidiques, cancer

Abstract

Vibrational microspectroscopy is a rapidly emerging label-free technique that allows the probing of live cell. Thanks to the vibration of the chemical bonds, it makes it possible to locate in the cell biomolecules (proteins, nucleic acids, lipids) associated with organelles. My study consisted in using Coherent Anti-Storage Raman Spectroscopy (CARS) microspectroscopy in the CH zone of the Raman spectrum, a highly resolved ($<1 \text{ cm}^{-1}$) and restricted interval ($2500\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$). Vibrations corresponding to the CH_2 and CH_3 chemical groups are mainly associated with lipids and proteins, respectively. Using synchronous cultures, I have been able to highlight differences between cells in interphase and cells in mitosis and, more interestingly, the five sub-phases of mitosis, thanks to the evolutions of heterochromatin and endoplasmic reticulum as wel. I also tracked, in cells in interphase, the changes in lipid metabolism following activation of the TrkB receptor, often expressed in tumor cells. Specific lipid droplets showed up in HEK cell expressing TrkB activated. This same type of droplets has been observed in three cell lines derived from three stages of colorectal cancer. I have established a direct link between TrkB activation and the presence of these lipid droplets. Thus, CARS microspectroscopy makes it possible to follow the biogenesis of lipid droplets by analysis in the CH zone. This method could be exploited to find out, without prior labeling, cancer cells in a tissue, making CARS microspectroscopy a useful diagnostic tool.

Keyword : CARS microspectroscopy, interphase, mitosis, heterochromatin, TrkB receptor, lipid droplets, cancer

