

EXPERIMENTAL DOSIMETRY USING THE FLUORESCENCE VARIATION OF TEMPERATURE-DEPENDENT DYE UNDER RADIOFREQUENCY EXPOSURE

NEFZI AMANI**, LYNN CARR, LEVEQUE PHILIPPE, ARNAUD-CORMOS DELIA

Univ. Limoges, CNRS, XLIM, UMR 7252, F-87000 Limoges, France

Abstract: One of the new techniques that permit the access to temperature rise at microscopic level is based on the exploitation of the biological dye Rhodamine B (Rhod-B). A TEM cell is used to apply a 1800 MHz RF signal to a 3 ml Rhod-B labeled culture medium. Experimental dosimetry shows that the concentration of Rhod-B can affect its fluorescence intensity. It is preferable to use concentrations of at least 10 μmol for better calibration of temperature measurements.

key-words: dosimetry, fluorescence, RF exposure system, Fluoro-Dish.

1. INTRODUCTION

La variation en température d'un échantillon biologique est un paramètre important à caractériser suite à l'exposition aux champs radiofréquences (RF). La mesure de la température est faite classiquement avec des sondes en fibre optique qui mesurent la température locale du milieu biologique sur un volume d'environ 1 mm^3 . Ce type de sonde n'est pas adapté pour des mesures au niveau de la cellule biologique (μm^3). D'autres techniques de mesure sont utilisées qui permettent d'accéder à la température à l'échelle microscopique. La Rhodamine B (Rhod-B) est un marqueur biologique sensible à la température, la variation de sa fluorescence est inversement proportionnelle à celle de la température [1]. Ce marqueur nous a permis de mettre une place une technique avec comme objectif la mesure de la température au niveau microscopique des cellules biologiques dans les systèmes microfluidiques [2] suite à l'exposition aux signaux RF [3], [4] ou même aux nsPEF (nanoseconde champ électrique Pulsé) [5], [6]. Dans ce papier, une dosimétrie qui sert à caractériser la réponse de la Rhod-B et déterminer ses limites est réalisée. La fluorescence de la Rhod-B est étudiée sur un échantillon biologique placé dans un système d'exposition de type cellule transverse électromagnétique (TEM) en réponse à un signal RF.

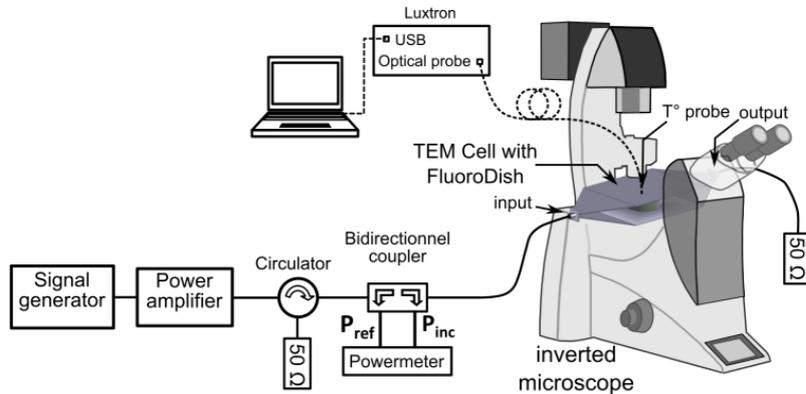
2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Système d'exposition

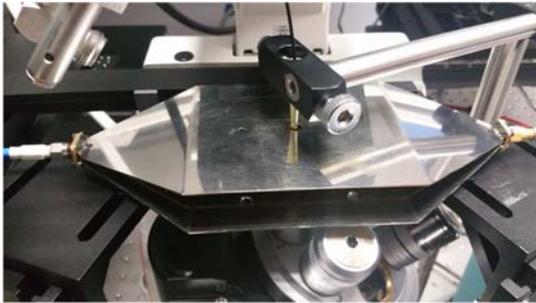
Le système d'exposition de la figure 1a sert à générer un signal, le transformer en champ électrique et l'appliquer aux échantillons biologiques. Ce système comporte un générateur RF (HP8648B, Hewlett-Packard, USA) suivi par un amplificateur de puissance de 44 dB (M.19.40.50, Nuclétudes, France). Un coupleur est placé par la suite et il est connecté à un multimètre permettant d'afficher les valeurs de la puissance incidente et celle réfléchie à l'entrée du système d'exposition. La figure 1b présente la cellule TEM [7]–[9] qui représente le dispositif

* Corresponding author, courriel amani.nefzi@unilim.fr

a)



b)



c)



Fig.1. Système d'exposition. a) Système permettant l'application du champ électromagnétique, la mesure de température et la mesure de la fluorescence de la Rhod-B, b) photo de la cellule TEM placée au-dessus de l'objectif du microscope et une sonde insérée pour la mesure de température du milieu de culture, c) Fluoro-Dish remplie de 3 ml du milieu de culture biologique.

d'exposition. Elle est constituée de 3 plaques métalliques rectangulaires et elle est dimensionnée pour assurer une adaptation d'impédance à 50Ω . Pour ces expositions, une solution de HBSS contenant la Rhod-B est préparée comme le montre la figure 1c. Une quantité de 3ml de ce mélange est versée dans une Fluoro-Dish et cette dernière est placée à l'intérieur de la cellule TEM.

2.2. Dosimétrie expérimentale

La Rhod-B (excitation : 553 nm, émission : 627 nm) est un marqueur sensible à la température. Sa variation est inversement proportionnelle à celle de la température donc elle peut être une alternative fiable pour déterminer les variations de température à l'échelle microscopique. Un système de micro-dosimétrie a été mis en place à cet effet comportant un microscope (DMI6000, Leica) qui permet l'acquisition (15 images par secondes) de la fluorescence de la Rhod-B dans une partie de l'échantillon biologique. Afin de valider son efficacité nous avons eu recours à la sonde électro-optique (Luxtron One, Lumasense Technologies, CA, USA) pour mesurer directement la température de la solution biologique.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les mesures réalisées ont pour but de déterminer les limites en fluorescence de la Rhod-B en fonction de deux paramètres. Ces paramètres sont la puissance incidente du signal RF à l'entrée de la cellule TEM et la concentration de la Rhod-B dans l'échantillon biologique. Les résultats expérimentaux de la figure 2 montrent l'effet de la puissance incidente sur la fluorescence de la Rhod-B.

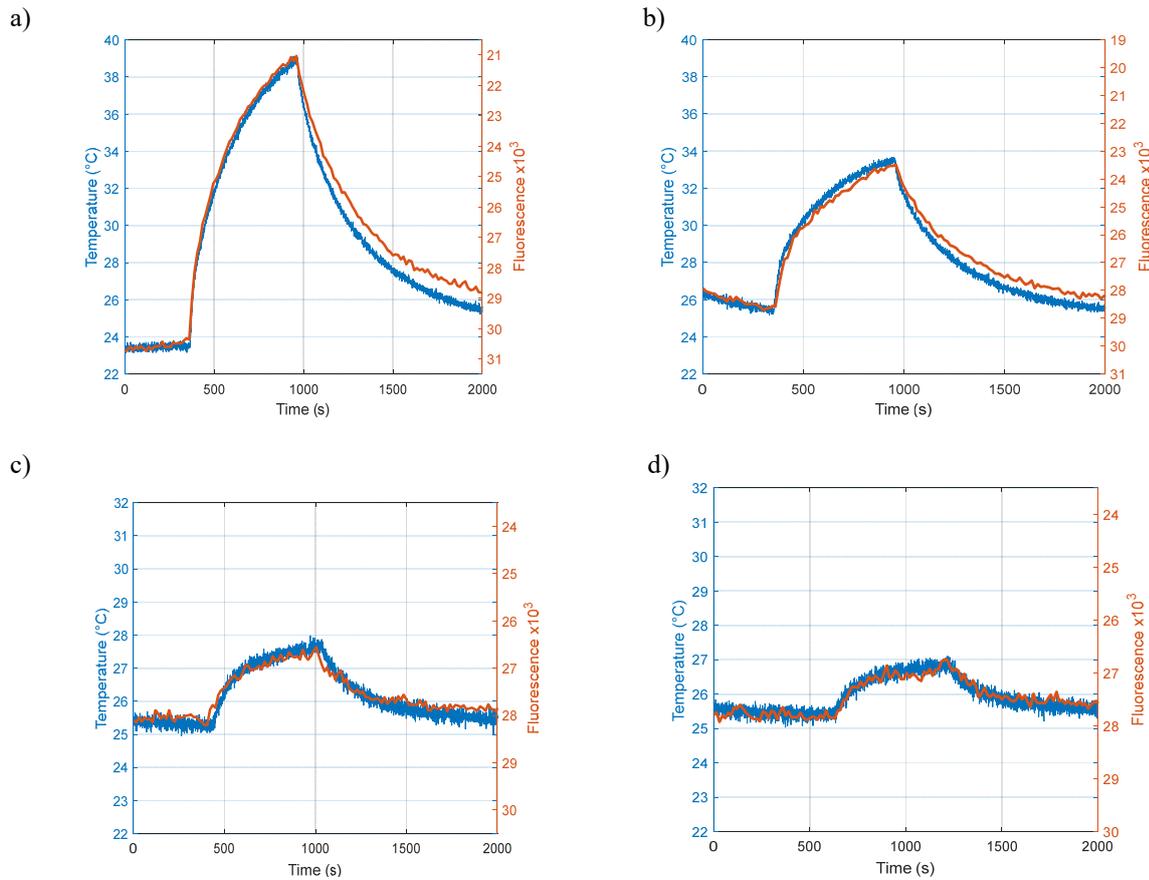


Fig. 2. Variation de la fluorescence en fonction de la température de l'échantillon biologique marqué avec de la Rhod-B pour différents niveaux puissances, a) 10 W, b) 5 W, c) 1 W, d) 0.5 W.

Différents niveaux de puissances RF (10 W, 5 W, 1 W, 0.5 W) ont été appliqués à l'entrée de la cellule TEM contenant la solution biologique. Les mesures aux différentes puissances ont été réalisées avec une période d'exposition de 10 minutes (RFon) précédée et suivie de périodes de 20 minutes sans exposition aux RF (RFoff). La solution biologique exposée était du Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) marquée avec 50 μmol de Rhod-B. On observe que les courbes de la fluorescence mesurées avec le microscope se superposent bien avec les résultats de température mesurés avec la sonde. Ceci reste valable même pour des puissances faibles tel que 0.5 W. Une augmentation maximale de 16 $^{\circ}\text{C}$, 8 $^{\circ}\text{C}$, 3 $^{\circ}\text{C}$ et 1.5 $^{\circ}\text{C}$ a été mesurée pour, respectivement, 10 W, 5 W, 1 W et 0.5 W. La variation en fluorescence de la Rhod-B est d'environ 0.6 par $^{\circ}\text{C}$. Cette technique de mesure ainsi calibrée et validée peut donc nous informer sur la variation de température d'un échantillon à l'échelle microscopique.

Pour étudier l'effet de la concentration sur les résultats de la fluorescence, l'échantillon de HBSS a été marqué avec de la Rhod-B de différentes concentrations (50 μmol , 10 μmol , 1 μmol , 0.1 μmol et 0.01 μmol). Ce milieu a été exposé pendant une période de 10 minutes (RFon) à une puissance de 10 W. Les résultats de la figure 3 montrent la variation de la fluorescence de l'échantillon biologique marqué avec de la Rhod-B et de la température pour deux concentrations de Rhod-B (10 μmol et 1 μmol). Avec une concentration de 10 μmol on peut remarquer une meilleure correspondance entre la courbe de variation en fluorescence et celle de la température comparée à une concentration de 1 μmol . Pour les différentes concentrations de Rhod-B (50, 10, 1, 0.1 et 0.01 μmol), l'élévation de température maximale enregistrée est de 12, 12, 13, 13, 12 $^{\circ}\text{C}$, respectivement. La concentration de Rhod-B a ainsi peu d'impact sur l'élévation totale de température. Cependant, pour une bonne calibration avec les mesures de température des concentrations supérieures à 10 μmol doivent être utilisées. Cette dosimétrie expérimentale a donné des résultats reproductibles.

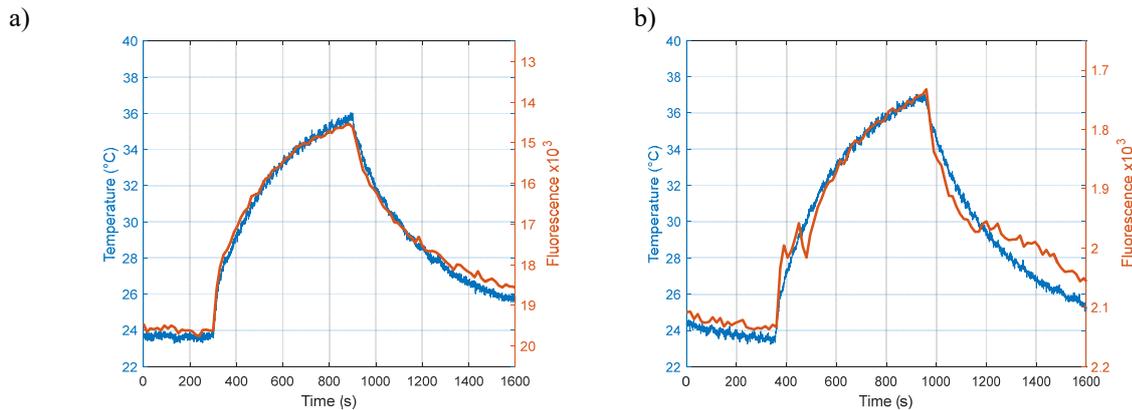


Fig. 3. Résultats de mesure de la fluorescence de l'échantillon biologique marqué avec de la Rhod-B et de la température pour différentes concentrations de Rhod-B, a) 10 μmol , b) 1 μmol .

4. CONCLUSION

Dans ce papier, une technique de mesure de la température au niveau microscopique a été étudiée. Cette technique exploite la variation de la fluorescence du marqueur Rhodamine B en fonction de la variation de température. Un échantillon biologique, 3 ml de milieu de culture HBSS, marqué par Rhod B est placé dans une cellule TEM pour application d'un signal RF. Cette étude montre l'impact de la puissance incidente du signal RF à l'entrée de la cellule TEM et de la concentration de la Rhod-B dans l'échantillon biologique. Cette technique de mesure a été validée pour toutes les puissances RF étudiées. Pour une bonne calibration avec les mesures de température des concentrations de Rhod-B supérieures à 10 μmol doivent être utilisées.

RÉFÉRENCES

- [1] J. Sakakibara et R. J. Adrian, « Whole field measurement of temperature in water using two-color laser induced fluorescence », *Exp. Fluids*, vol. 26, n° 1, p. 7-15, janv. 1999.
- [2] D. Ross, M. Gaitan, et L. E. Locascio, « Temperature measurement in microfluidic systems using a temperature-dependent fluorescent dye », *Anal. Chem.*, vol. 73, n° 17, p. 4117-4123, sept. 2001.
- [3] J. F. Bermingham, Y. Y. Chen, R. L. McIntosh, et A. W. Wood, « A measurement and modeling study of temperature in living and fixed tissue during and after radiofrequency exposure », *Bioelectromagnetics*, vol. 35, n° 3, p. 181-191, 2014.
- [4] Y. Y. Chen et A. W. Wood, « Application of a temperature-dependent fluorescent dye (Rhodamine B) to the measurement of radiofrequency radiation-induced temperature changes in biological samples », *Bioelectromagnetics*, vol. 30, n° 7, p. 583-590, oct. 2009.
- [5] S. Kohler, R. P. O'Connor, T. D. T. Vu, P. Leveque, et D. Arnaud-Cormos, « Experimental Microdosimetry Techniques for Biological Cells Exposed to Nanosecond Pulsed Electric Fields Using Microfluorimetry », *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 61, n° 5, p. 2015-2022, mai 2013.
- [6] D. Moreau, C. Lefort, R. Burke, P. Leveque, et R. P. O'Connor, « Rhodamine B as an optical thermometer in cells focally exposed to infrared laser light or nanosecond pulsed electric fields », *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, n° 10, p. 4105-4117, sept. 2015.
- [7] R. P. O'Connor, S. D. Madison, P. Leveque, H. L. Roderick, et M. D. Bootman, « Exposure to GSM RF Fields Does Not Affect Calcium Homeostasis in Human Endothelial Cells, Rat Pheocromocytoma Cells or Rat Hippocampal Neurons », *PLOS ONE*, vol. 5, n° 7, p. e11828, juill. 2010.
- [8] C. Merla, N. Ticaud, D. Arnaud-Cormos, B. Veyret, et P. Leveque, « Real-Time RF Exposure Setup Based on a Multiple Electrode Array (MEA) for Electrophysiological Recording of Neuronal Networks », *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 59, p. 755-762, 2011.

- [9] M. Soueid *et al.*, « Electromagnetic Analysis of an Aperture Modified TEM Cell Including an Ito Layer for Real-Time Observation of Biological Cells Exposed to Microwaves », *Prog. Electromagn. Res.*, vol. 149, p. 193-204, 2014.