



HAL
open science

Les plasmas froids, nouvelle stratégie thérapeutique en cancérologie

Marc Vandamme

► **To cite this version:**

Marc Vandamme. Les plasmas froids, nouvelle stratégie thérapeutique en cancérologie. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2012. Français. NNT : 2012ORLE2017 . tel-00752056

HAL Id: tel-00752056

<https://theses.hal.science/tel-00752056>

Submitted on 14 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre d'Imagerie du Petit Animal, TAAM-UPS44, CNRS, Orléans
GREMI, UMR 7344, CNRS - Polytech, Orléans
Germitec SAS, Clichy

THÈSE présentée par :
Marc VANDAMME

soutenue le : **14 juin 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

**Les plasmas froids, nouvelle stratégie
thérapeutique en cancérologie**

THÈSE dirigée par :

Jean Michel POUVESLE
Alain LE PAPE

Directeur de Recherche CNRS, GREMI - CNRS Orléans
Directeur de Recherche CNRS, CIPA - CNRS, Orléans

RAPPORTEURS :

David GRAVES
François VALLETTE

Professeur, Université de Californie, Berkeley
Directeur de recherche INSERM, CRCNA, Nantes

JURY (*y reporter tous les membres de jury présents à la soutenance*):

Jean Michel POUVESLE
Alain LE PAPE
David GRAVES
François VALLETTE
Philippe BOUGNOUX
Claudine KIEDA
Jean Pierre CAMBUS
Franck CLEMENT

DR CNRS, GREMI - CNRS, Orléans
DR CNRS, CIPA - CNRS, Orléans
Professeur, Université de Californie, Berkeley
DR INSERM, CRCNA, Nantes
PU-PH, Université François Rabelais, Tours
DR CNRS, CBM - CNRS, Orléans
MCU-PH, Hôpital de Rangueil, Toulouse
MCU, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau

Membres invités:

Laurent PRAX
Eric ROBERT

DG adjoint, Germitec, Clichy
CR CNRS, GREMI-CNRS, Orléans

REMERCIEMENTS

L'ensemble de cette thèse s'est déroulé dans un environnement Orléanais très riche en rencontres et en discussions avec de nombreuses équipes. A mon arrivé de Nancy, j'ai trouvé cette ville un peu 'froide' mais finalement ce n'est qu'une première mauvaise impression. J'ai beaucoup déambulé au sein des différents laboratoires Orléanais où j'ai toujours été très bien accueilli par des personnes toutes très sympathiques et qui me marqueront pour de nombreuses années. Je tiens à remercier chaleureusement et tout particulièrement l'ensemble du personnel de mes deux laboratoires d'accueil : le TAAM et le GREMI, ainsi que la société Germitec sans qui cette thèse n'aurait pu exister.

Au Dr Alain Le PAPE

Depuis mon arrivée au sein du CIPA en février 2009, vous me faites l'honneur de diriger mes travaux de recherche et de me faire partager votre passion pour la recherche préclinique et l'imagerie. Vous avez su m'encadrer tout en me laissant une grande liberté d'action et d'idées, me laissant m'investir dans de nombreux domaines de recherches. Sans compter, malgré un emploi du temps très chargé, vous avez mis à ma disposition vos compétences scientifiques et médicales et m'avez accordé votre confiance. Vous avez toujours été joignable à n'importe quelle heure du jour et de la nuit. Avec humour et sympathie, vous m'avez accompagné durant ces quelques années qui ne furent pour moi que du bonheur. Je garderai à l'esprit nos remontants que nous apprécions tant au retour de déjeuner allant du vin de noix à la mirabelle... Enfin, j'espère avoir été à la hauteur en tant que dernier doctorant de votre carrière de chercheur.

Que ce soit pour moi l'occasion de vous remercier vivement pour tout ce que vous m'avez appris et de vous exprimer ma reconnaissance et mon profond respect.

Au Dr Jean Michel POUVESLE

J'ai débarqué dans ton bureau un beau matin de février alors que je ne t'avais jamais rencontré, une situation bien particulière, Alain m'ayant embauché pour cette thèse qui allait se dérouler sous ta direction principale. En très peu de temps, tu as su me faire partager ta passion pour la physique des plasmas et cela en toute simplicité et avec beaucoup de pédagogie pour un non initié. J'ai beaucoup appris à tes côtés et nos échanges réguliers m'ont appris à parler de l'onco-biologie en toute simplicité, ce qui ma permis de progresser énormément dans la vulgarisation scientifique. En très peu de temps, tu m'as accordé ta confiance et m'a laissé une grande liberté d'action pour le développement du projet. Je ne te remercierai jamais assez pour le nombre incalculable de congrès auxquels j'ai pu participer et de ce fait, tu m'as apporté énormément en me formant et m'apportant la connaissance biologique via la participation à ces congrès. Cette thèse a été pour moi (nous) un long marathon (à la publication) mais je pense que nous avons franchi la ligne d'arrivée les premiers un certain nombre de fois.

Toutes ces années à tes côtés furent un honneur pour moi, cette thèse est pour moi une façon de t'exprimer ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance pour le lancement de ma carrière.

Au Dr Francois Vallette,

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites de participer à ce jury et d'être rapporteur de cette thèse pour juger ce travail. Nos échanges, même peu nombreux, ont été très constructifs pour l'avancée de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus vifs.

Au Pr. David Graves,

Vous avez accepté de juger cette thèse et d'en être le rapporteur. Que ce soit pour moi l'occasion de vous remercier vivement et de vous exprimer toute ma reconnaissance.

Au Pr. Philippe Bougnoux,

Vous avez accepté de juger cette thèse et ce en dépit de vos nombreuses obligations. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus vifs.

Au Dr Jean Pierre Cambus

Tout d'abord je tiens à te remercier d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. J'ai toujours admiré l'intérêt que tu portes pour cette nouvelle thématique malgré un emploi du temps de praticien hospitalier très chargé. Nos discussions sur la thématique plasma et les différentes expérimentations réalisées ensemble m'ont conduit à aborder d'autres domaines, en particulier le monde merveilleux de l'hémostase... Tu as également été présent sur un plan plus personnel et je t'en remercie très chaleureusement. Trouve ici l'expression de toute mon admiration pour un personnage aussi singulier que toi.

Au Dr Franck Clément

Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté d'être membre du jury de ma thèse. Nous avons eu l'occasion de nous croiser et d'échanger sur les plasmas à plusieurs reprises en congrès mais également pendant les différentes d'expérimentations. Ces nombreuses discussions ont toujours été enrichissante pour moi...

Au Dr Claudine Kieda

Nos discussions fort sympathiques sur l'hypoxie et l'angiogenèse ont rythmé ma thèse et ont toujours été très constructives. Vous avez une capacité à partager votre passion pour votre domaine de recherche qui m'impressionnera toujours. Trouvez dans ces quelques lignes toute ma sympathie à votre égard et toute ma reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail mais également pour la confiance que vous m'avez accordée en particulier pour Cracovie...

A Mr Laurent Prax

Vous m'avez accueilli au sein de votre société et m'avez financé pendant ces 3 années. Sans vous, l'ensemble de ce travail n'aurait pu être réalisé au sein de mes deux laboratoires d'accueil. Malgré votre emploi du temps très chargé, vous avez toujours été à l'écoute de mes demandes. Les réunions organisées au sein de l'entreprise m'ont permis de progresser dans ma capacité de vulgarisation du domaine et vous avez toujours fait preuve d'intérêt pour mon travail. Que ce soit pour moi l'occasion de vous remercier vivement pour tout ce que vous m'avez apporté et de vous exprimer toute ma reconnaissance.

J'en profite également pour remercier l'ensemble du personnel de Germitec.

Au Dr Stéphanie Lerondel

Depuis mon arrivée au CIPA, tu as suivi avec beaucoup d'attention mon parcours et nous avons toujours eu des discussions constructives autour de mes travaux. Avec beaucoup d'humanité et de gentillesse, tu as su me faire partager tes connaissances en imagerie et m'a accompagné dans les décisions d'orientation du projet tout en veillant avec bienveillance sur la trésorerie. Après t'avoir décoiffée par mon vent de folie, je ne peux que remarquer ton ingéniosité pour faire face à ce phénomène, et je me rappellerai longtemps de mes chaussures cachées dans ton coffre de voiture... Parfois, cela était indépendant de ma volonté comme durant notre voyage en Pologne qui marquera pour quelques années mon esprit.

Par ailleurs, ta capacité d'écoute et de conseils, malgré un emploi du temps bien chargé, m'a permis de me poser les bonnes questions et de me rassurer durant ce long marathon. Trouve ici l'expression de mes sincères remerciements et de toute ma reconnaissance pour un encadrement qui de manière pas toujours visible était bien présent.

Au Dr Eric Robert

Tu as su avec beaucoup de pédagogie m'enseigner les fondements des plasmas froids. Nos discussions souvent intenses et passionnées ont toujours conduit à une réflexion pertinente sur les données que nous avons et les orientations du projet. Dans la course contre la montre pour les publications, tu as toujours été bienveillant à mon égard pour rédiger les parties physiques de nos documents. Les quelques congrès que nous avons faits ensemble resteront longtemps en ma mémoire comme l'ISPC à Philadelphie avec des sorties au restau sympathiques ou encore un dîner mémorable en Allemagne où les couverts étaient interdits... C'est pour moi l'occasion de te remercier pour ta patience, ton implication dans les travaux et ton encadrement.

A 'la team' du CIPA

Merci pour votre bonne humeur quotidienne et j'espère avoir relevé un dernier défi en plaçant les mots « serpillères » et « blaireau » dans ce manuscrit...

Stéphanie et Maryline, 'les perruches indissociables', pendant ces quelques années passées en votre compagnie, j'ai souvent compté sur vous et vos compétences. Je ne peux que vous remercier pour votre disponibilité et votre efficacité. Un grand merci pour votre aide et surtout de m'avoir supporté.

Guillaume, finalement nous n'aurons jamais tellement travaillé ensemble, nous n'avons pas non plus beaucoup joué au tennis... mais j'espère te recroiser régulièrement en tant que Mr Perkin Elmer...

Laura, on a commencé notre thèse en même temps et on la finit en même temps... un beau parcours finalement bien que nos sujets de recherche soient différents, tu as réussi avec brio à t'intéresser au plasma et à réaliser une étude sur le pancréas qui montre bien l'intérêt du plasma dans ces conditions. Toujours prête à rendre service et à discuter pour refaire le monde, j'espère que l'on aura l'occasion de se croiser au détour d'un labo ou d'un congrès.

Julien, notre 'puppy' préféré, toujours très serviable, tu es d'une gentillesse à toute épreuve... et pourtant tu en as enduré des choses avec nous... Ton aide m'a été précieuse dans bien des domaines allant du changement de roue de voiture à la culture cellulaire. Je profite de ces quelques lignes pour te remercier et même si je t'ai charrié à ce sujet, je sais très bien au fond que tu feras un bon manager d'équipe et que tu as réussi à être un des piliers du CIPA.

Sabrina, la plus stricte et la plus embêtante... je pense que l'on a fait ensemble les 400 coups, tu as toujours été partante pour tout un tas d'idées farfelues, mais ce que j'apprécie le plus en toi, c'est finalement ton côté décalé avec une rigueur et une connaissance scientifique à toute épreuve. Nos nombreuses discussions scientifiques sur de larges domaines de la biologie ont rythmé nos journées et il ne fait nul doute que cela me manquera. Trouve en ces lignes toute mon admiration pour ta réussite et ta gentillesse.

A Anais Rameau

Ma première stagiaire, tu as contribué de manière importante à cette thèse et tu as été plus qu'à la hauteur de mes espérances. Ton travail a toujours été impeccable et je te souhaite une longue route sur le sentier de la Recherche...

A 'la team' du GREMI

Vanessa, tu es arrivée peu de temps après moi pour étudier la physique des plasmas... Les premières années de ma thèse où j'ai passé plus de temps au GREMI à partager notre bureau a été rythmé de phrases cultes. Je pense que tu te rappelleras longtemps du célèbre : « Allume la clim et ouvre la fenêtre, il faut lutter contre le réchauffement climatique ! ». Un grand merci pour tes nombreux 'éclairages' sur la physique mais également pour la veille scientifique à toute épreuve que tu fais...

Delphine, tu es la petite dernière dans l'équipe PlasMed, mais cela ne t'as pas empêché de t'affirmer avec vigueur. Finalement, nous n'avons jamais eu l'occasion de travailler réellement ensemble... mais ton aide a été précieuse dans la réalisation d'un certain nombre de ces travaux.

Sébastien, tu es un électronicien hors pair, sans toi, ce travail n'aurait jamais pu avoir lieu, tu as su développer avec rigueur un boîtier à la hauteur de nos espérances et tout un tas de possibilités « high tech »... Un grand merci pour la prise en compte de tous ces caprices...

Alexis, tes conseils avisés et le partage de tes connaissances sur la pollution automobile ont été pour moi une ouverture d'esprit sur d'autres domaines de la recherche scientifique. Un grand merci pour ces nombreux échanges...

A tous les membres du TAAM et de l'INEM

Tout d'abord Yann Hérault, directeur de notre unité dans laquelle j'ai réalisé une grande partie des travaux de cette thèse. La gestion du TAAM pour mes ordres de mission et l'administratif : Raphaëlle, Monique, Agnès... ainsi que Olivier pour les livraisons et Sam, Laurent,... pour les cages des souris, un travail discret et pourtant indispensable à nos études... Sans oublier tous les gens de l'INEM qui m'ont aidé... Nicolas, Stéphanie, Mathilde... et tous ceux que j'oublie...

A tous les membres du GREMI

Durant ces quelques années, vous m'avez facilité la vie, je tiens à tous chaleureusement vous remercier pour votre aide et votre disponibilité, en particulier Ahmed qui a participé à la réalisation de nombreuses pièces, également Hervé, Guy, Jacky, Sylvie et Christophe pour leurs bonne humeur et le nombre important d'ordre de mission... , et tous les autres...

A David Gosset

Tu as mis à ma disposition tes compétences et ta plateforme pour les expérimentations en cytométrie en flux qui ont été très importantes dans la compréhension des mécanismes d'action du plasma. Je te remercie chaleureusement pour tous les marquages que l'on a pu tenter, les cafés engloutis et ta disponibilité.

Aux Dr Valérie Quesniaux et Dr Bernhard Ryffel

Depuis le début de mes travaux de recherche au sein du CIPA, vous m'avez toujours accueilli avec bienveillance au sein de l'IEM, me permettant ainsi de profiter de votre expérience et de vos précieux conseils ainsi que ceux de vos équipes. Une petite partie des travaux réalisés ensemble se trouvent dans ce manuscrit et j'espère que l'ensemble pourra faire l'objet d'une publication dans un futur proche. Les encouragements et la reconnaissance portés à mon égard ont toujours été un moteur pour moi dans la poursuite de ce projet sur l'inflammation. Veuillez trouver ici mes sincères remerciements et l'expression de toute mon admiration.

Aux Dr Céline Dubourg et Dr Olivier Richard

Notre rencontre fut complètement fortuite mais conditionna un grand nombre d'heures des années à venir... Je me rappellerai longtemps du jour où j'ai rencontré Céline qui cherchait désespérément un vacataire et moi qui cherchait des heures d'enseignement... Vous avez su me faire partager votre passion pour l'enseignement et m'avez accordé votre confiance pour la réalisation de vos différents cours. Olivier, dès la première année dans la réalisation d'un cours de statistiques et Céline les années suivantes pour un cours de cancérologie... Ce n'est pas sans émotion que je réalise les différents cours en cette dernière année de ma thèse. Nos discussions et vos différentes expériences dans des domaines scientifiques différents du mien me manqueront. Je ne peux que vous exprimer ma profonde gratitude et toute mon admiration pour votre capacité à faire de la recherche, à enseigner et à enseigner l'art de l'enseignement.

Au Dr Sylvain Bourgerie

Avec le recul, je me demande toujours comment tu as pu faire confiance à un « physiologiste » pour faire les TP de biochimie incluant purification et migration... Avec patience et pédagogie, tu m'as fait redécouvrir le monde de la biochimie, ce qui ma permis de redécouvrir à quel point je l'appréciais. Toujours de manière très présente, tu m'as guidé dans le déroulement des différentes séances de TP avec quelques bonne répliques comme le jour où je t'annonce qu'une étudiante a fait une crise d'épilepsie et toi de me répondre : « mais... elle a rendu son compte rendu ? », cette phrase me fait encore rire aujourd'hui... Tu as renouvelé ta confiance envers moi chaque année et c'est avec tristesse que j'ai réalisé les dernières séances de TP pour toi. Trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A Simone, Estelle, Jenny, Carine, Arnaud et Mélanie

Vous m'avez accompagné dans mes enseignements à différents niveaux... la préparation des salles, les emplois du temps, les trombinoscopes... Vous avez été disponibles pendant ces différentes années, et les cafés de 13h ont été pour moi des moments fortement appréciés. Trouvez ici, toute ma reconnaissance pour votre aide si précieuse.

A Louis

Petit Loulou ! Depuis que Bernhard nous a fait épiler des souris ensemble à la crème Veet, on ne s'est jamais séparé. Ton humour et ta joie de vivre ont toujours été pour moi une échappatoire. Sans parler du nombre de pause-café incalculable que l'on a pris ensemble, sans boire de café bien sûr, vu que ni toi ni moi n'avions de monnaie... Je ne parlerai pas de nos parties de pêche à la carpe mémorables qui finalement n'auront jamais eu lieu... et je ne pense pas que ce soit mieux pour nos chasses aux champignons ayant une capacité de 'trouveur' proche de la nullité... Je te souhaite de continuer à être le meilleur et espère que notre amitié perdurera malgré les changements potentiels dans nos vies.

A la 'Dream Team' de Paris

Blandine, Marine, Catherine, vous m'avez toujours accueilli les bras ouverts au sein de votre laboratoire... Je suis heureux de pouvoir dire que je connais la miss POLA, la plus grande fan de Pierre Perret et la meilleure biologiste moléculaire de France... Par ailleurs, je conserve toujours mon ticket pour que Julien vienne pour creuser la piscine avec sa mini pelle...

A Marianne

Tu as été à mes côtés tout au long de cette thèse (et pas que d'ailleurs), tu m'as encouragé, conseillé, guidé, ton aide a été pour moi une ressource inestimable... Avec tout mon amour...

To Popi

I know how much you are proud of me but you don't know how much I'm impressed by your interest on my work. You have already read all my publications and that's fantastic... I'm sorry this thesis is written in French but you already know all this work, so that doesn't matter! Thank you for your kindness to receive us every year in Friend's Home. That represents a lot for us and you know how much we like to stay with you a few weeks every year. This trip is kindly every year authorized by my two PhD advisors... So, thank you again. I hope that we can continue to see you every year...

A Mamie

Mamie, il n'y a pas de médecin dans la famille, mais il y a un chercheur. Je sais que cela n'a pas été facile de suivre mon parcours mais je suis au bout du tunnel ! J'ai toujours été admiratif de ton dynamisme et je pense savoir d'où je tiens cela... Les moments passés ensemble sont plus que mémorables et je sais grâce à toi que le restaurant le plus mauvais de la terre se trouve à Orléans ! Un grand merci pour tous ces moments...

A mes parents

Vous vous êtes longtemps demandé ce que je voulais faire à la fac, pourtant vous le saviez, j'avais déjà décidé de faire une thèse de biologie en seconde... et bien j'y suis et c'est la fin d'un si long cursus... ce document en représente le point final... Vous m'avez toujours accompagné dans mes décisions et même un peu dans la rédaction de ce document ! Vous m'avez préparé à réaliser ce long chemin et m'avez toujours fait confiance. Pour tout cela, je ne pourrai jamais assez-vous remercier...

A John, Eric et Brigitte, mes frères et soeurs

Avec vos caractères si différents, vous avez toujours veillé sur moi, le petit dernier... J'ai énormément appris à vos côtés et c'est en partie grâce à vous que j'ai réussi à faire preuve d'une grande maturité pour l'ensemble de cette thèse. Je profite également de l'occasion pour rappeler que : Non, je ne suis pas éleveur de souris !!

SOMMAIRE



SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
CHAPITRE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE DU CANCER ET TRAITEMENTS	5
I. CARACTERISTIQUES DES CELLULES TUMORALES.....	5
A. Une auto-suffisance en facteurs de croissance	6
B. Insensibilité aux signaux antiprolifératifs.....	8
C. Invasion et métastases.....	11
D. Une répllication illimitée	12
E. Résistance à l'apoptose.....	13
F. Une induction de l'angiogenèse.....	16
G. Émergences de nouveaux marqueurs.....	19
II. STRATEGIES THERAPEUTIQUES	21
A. La chimiothérapie	21
1. Généralités.....	21
2. Les chimiothérapies dans le cancer du poumon.....	27
3. Les chimiothérapies dans le cancer colorectal.....	28
B. La thérapie photodynamique.....	29
1. Généralités.....	29
2. Mécanismes d'action.....	31
C. La radiothérapie	33
1. Contexte.....	33
2. Les types de radiothérapie	34
3. Mécanismes d'action.....	36
4. Les associations chimioradiothérapie	40
D. Place des ROS dans les stratégies thérapeutiques	41
1. Généralités.....	41
2. La place des ROS dans la carcinogénèse.....	42
3. La modulation des ROS comme stratégie thérapeutique	43
4. Le point sur les RNS.....	45
III. CONCLUSIONS	45
CHAPITRE 2 : RECHERCHE PRECLINIQUE ET UTILISATION DE L'IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE	46
I. LA RECHERCHE PRECLINIQUE EN ONCOLOGIE.....	46
A. Généralités.....	47
B. Les variables importantes en expérimentation préclinique.....	47
1. L'espèce animale	47
2. Le type de tumeur	49
3. Le site d'implantation.....	50
4. Le début du traitement.....	51
5. La dose utilisée	52
6. Le Schéma d'administration	52
C. Évaluation de l'activité anti-tumorale	53
II. L'IMAGERIE DE BIOLUMINESCENCE	57
A. Principes	57
B. Applications en inflammation.....	59

C. Applications en cancérologie.....	63
CHAPITRE 3 : LES PLASMAS FROIDS.....	67
I. LES SOURCES DE PLASMAS FROIDS	68
A. La décharge DBD	69
1. Généralités	69
2. Exemple de la décharge DBD du laboratoire	71
B. Les Plasma Jets	72
1. Généralités.....	72
2. Le plasma Gun	74
II. LES APPLICATIONS BIOMEDICALES DES PLASMAS FROIDS	76
A. Décontamination / Stérilisation et cicatrisation	77
1. Généralités	77
2. Mécanismes d'action.....	81
B. Coagulation/hémostase.....	84
1. Applications.....	84
2. Mécanismes d'action.....	86
III. EFFETS DU PLASMA SUR LA PEAU ET LES CELLULES	87
A. Tolérance du plasma au niveau cutané	87
B. Effets du plasma sur les cellules.....	90
C. Effets du plasma sur les cellules cancéreuses.....	93
IV. CONCLUSIONS	94
PARTIE EXPERIMENTALE	96
OBJECTIFS.....	97
CHAPITRE 4 : ÉTUDE DE TOLERANCE DES PLASMAS FROIDS.....	99
I. PUBLICATION SUR LA TOLERANCE	99
II. RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	111
A. Évaluation de l'inflammation induite au niveau cutané.....	111
B. Évaluation de l'activation de NF- κ B.....	114
C. Influence du débit de doses.....	117
D. Évaluation de la tolérance du plasma au niveau pulmonaire	119
CHAPITRE 5 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-TUMORALE DES PLASMAS FROIDS.....	126
I. ACTIVITE ANTITUMORALE DE LA DBD	127
A. Étude d'efficacité du plasma froid sur la lignée U87-MG	127
B. Mécanismes d'action de l'activité antitumorale des plasmas froids.....	146
1. Publication « Implication des ROS dans l'effet antitumoral du plasma »	146
2. Résultats complémentaires	164
C. Influence du débit de dose sur l'activité antitumorale.....	166
D. Sensibilité cellulaire	168
E. Activité antitumorale sur un modèle de tumeur colique HCT-116 en orthotopique	170
II. EFFET ANTITUMORAL DU PLASMA GUN	174
A. Activité antitumorale in vitro.....	174
B. Effets du plasma sur les paramètres cellulaires	178
1. Invasion/migration	178
2. Cycle cellulaire et prolifération.....	180
3. Apoptose	182
C. Activité antitumorale in vivo.....	183
1. Tumeur pancréatique	183
2. Carcinome colorectal.....	186

CHAPITRE 6 : DISCUSSION	190
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	217
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	220
ANNEXES	243



LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les altérations dans le processus de cancérisation cellulaire, d'après [2].	5
Figure 2 : Voie de signalisation schématisée de l'EGF-R. Adapté d'après [3].	7
Figure 3 : Les phases du cycle cellulaire. Adapté de [18].	9
Figure 4 : Schéma simplifié des effets de cassures double brins de l'ADN sur le cycle cellulaire. Adapté de [21].	10
Figure 5 : Les étapes de la métastase [23]	11
Figure 6 : Signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose [35]	16
Figure 7 : Le <i>switch</i> angiogénique, déséquilibre des facteurs pro et anti angiogénique [38]	17
Figure 8 : Normalisation des vaisseaux sous traitement anti-angiogénique [46]	19
Figure 9 : Structure des différents adduits de platines sur l'ADN [52]	22
Figure 10 : Effets du cisplatine au niveau cellulaire [54].	23
Figure 11 : Effets du gefinitib sur la voie de l'EGF-R, adapté de [3].	25
Figure 12 : Mécanismes d'actions de la PDT.	29
Figure 13 : A gauche, un diffuseur cylindrique connecté à une fibre optique ; à droite, traitement PDT par endoscopie de cancer de l'œsophage [85].	31
Figure 14 : Mécanismes d'action de la PDT sur les cellules tumorales. Adapté de [91].	32
Figure 15 : Pénétration de différents rayonnements. Adapté de [95].	34
Figure 16 : Dommages à l'ADN induits par la radiothérapie [111].	38
Figure 17 : Sensibilité des cellules à la RT en fonction des phases du cycle cellulaire [111].	39
Figure 18 : Réoxygénation tumorale post RT [111].	40
Figure 19 : Les possibilités d'associations pour augmenter l'efficacité de la RT [118].	41
Figure 20 : Influence des ROS sur la voie de l'EGF-R (à gauche) et sur l'activation du facteur de transcription HIF-1 (à droite) [123].	43
Figure 21 : Effets de l'exposition des cellules aux ROS [123].	44
Figure 22 Organisation de la recherche translationnelle pour l'évaluation de nouvelles stratégies anti-tumorales, des modèles expérimentaux à l'homme	46
Figure 23 : Maintien de la structure histologique entre la tumeur du patient (à gauche) et sa xénotransgreffe après huit passages (au centre), en comparaison avec une xénotransgreffe de lignée de cellules tumorales coliques (à droite). Adapté de [157]	49
Figure 24 : Représentation du calcul de retard de croissance tumorale. Adapté de [165]	54
Figure 25 : Principe de la réaction de BLI dans une cellule.	57
Figure 26 : Dispositif d'acquisition de bioluminescence IVIS Lumina® (Caliper).	59
Figure 27 : Principe de la réaction de BLI faisant suite à l'activation de NF- κ B	61
Figure 28 : Cinétique de l'activation de NF- κ B par BLI après administration de LPS ou TNF α [197].	62
Figure 29 : Imagerie de BLI d'une souris NF- κ B luc. A gauche la souris est intacte, à droite les organes de la souris sont extériorisés. [198]	63
Figure 30 : Principe de l'imagerie de l'apoptose par bioluminescence.	65
Figure 31 : Schéma d'une décharge DBD.	69
Figure 32 : Photo d'une décharge à barrière diélectrique (FE-DBD) dans l'air	69
Figure 33 : Allure typique des impulsions électriques appliquées aux bornes des électrodes pour générer le plasma.	71

Figure 34 : Différents types de plasma indirect	73
Figure 35 : Schéma de fonctionnement d'un plasma Jet	73
Figure 36 : Photo du Plasma Gun en fonctionnement	75
Figure 37 : Schéma du réacteur du plasma Gun	75
Figure 38 : Schéma d'application in situ du plasma gun.....	76
Figure 39 : Prototype développé pour la décontamination rapide des mains par plasma [247] .	78
Figure 40 : MRSA traité pendant 2 min par plasma froid, une zone d'inhibition de 5 cm de diamètre est observée [219].	79
Figure 41 : Photos de la source de plasma MicroPlaSter®	80
Figure 42 : Ulcère infecté de la jambe avant traitement (à gauche) et après 20 séances (5 semaines) de traitement au plasma froid généré avec le MicroPlaSter (à droite) [217].....	80
Figure 43 : Les différents composants du plasma froid. Adapté d'après [255]	81
Figure 44 : L'APC en fonctionnement sur un tissu	85
Figure 45 : Coagulation d'une goutte de sang totale. A gauche, une goutte de sang non traité, et à droite une goutte de sang traité pendant 15s au plasma.	85
Figure 46 : Coagulation après traitement plasma chez la souris. A gauche avant le traitement et à droite après 15s de traitement avec la DBD.	86
Figure 47 : Temps de saignements chez le rat. A gauche, une photo de l'incision standardisée sur la queue de rat. A droite, temps de saignement moyen pour les rats CTRL et traités au plasma. (n=12, moyenne +/- SEM)	86
Figure 48 : Effets du plasma (DBD) sur la peau au niveau macroscopique et histologique. Adapté d'après [272]	88
Figure 49 : Coupes histologiques de peau de souris traitées avec différentes doses de plasma [216].	89
Figure 50 : Marge de manœuvre du traitement au plasma. Adapté d'après [265]	90
Figure 51 : Morphologie des cellules avant (photo de gauche) et après 5s d'exposition au plasma (photo de droite). Adapté d'après [275].....	91
Figure 52 : Récapitulatif des effets de différente dose du plasma sur les cellules de mammifères. [265].....	92
Figure 53 : Variation de pH du milieu de culture pendant le traitement plasma. Adapté d'après [222].....	94
Figure 54 : Étude de l'effet de doses croissantes de plasma sur l'intégrité tissulaire de la peau par histologie H&E. 24h après le traitement, grossissement x10 et x40.	112
Figure 55 : Évaluation du recrutement des neutrophiles au site de traitement par dosage MPO. n=6, Moyenne +/- SEM, * < 0.05.	113
Figure 56 : Niveau de sécrétion de la chimiokine KC dans la peau en fonction de différentes doses de plasma. n=6, Moyenne +/- SEM.	114
Figure 57 : Déroulement de l'étude sur l'activation de NF-κB induite par le plasma	115
Figure 58 : Traitement par DBD d'une souris NF-κB-luc.....	116
Figure 59 : Images de BLI représentatives de l'inflammation chez la souris avant, 2h et 6h après traitement par plasma.	116
Figure 60 : Évolution de l'activation de NF-κB après traitement plasma déterminé par BLI. N=8, moyenne +/- SEM, ** p < 0.01.	117
Figure 61 : Brûlure causée par le plasma au débit de dose 2kHz 36sec, 1 semaine post traitement.	118

Figure 62 : Suivi de l'activation de NF- κ B par BLI après un traitement au plasma avec deux débits de dose différent (n=8, moyenne +/-SEM, $p^* < 0.05$).	119
Figure 63 : Imagerie radiologique de positionnement du cathéter et imagerie <i>ex vivo</i> des poumons par BLI et FLI.....	121
Figure 64 : Imagerie radiologique du positionnement du cathéter (à gauche) et imagerie de BLI des poumons <i>ex vivo</i> (à droite).	122
Figure 65 : Induction de NF- κ B au niveau pulmonaire 6h après traitement au LPS ou exposé à un flux de néon de 80 sccm. (Moyenne+/- SEM, n=5, $p^{**} < 0.01$)	122
Figure 66 : Traitement s'une souris au niveau pulmonaire avec le plasma Gun.....	123
Figure 67 : Imagerie radiologique du positionnement du cathéter (à gauche) et imagerie de BLI des poumons <i>ex vivo</i> après traitement plasma de 12 minutes (à droite).	124
Figure 68 : Induction de NF- κ B au niveau pulmonaire 6h après traitement au LPS ou exposé au plasma pendant 6 ou 12 min. (Moyenne+/- SEM, n=5, $p^{**} < 0.01$).	124
Figure 69 : Surface de nécrose (en%) dans les tumeurs CTRL et traités par plasma. (n=8, moyenne+/- SEM).....	164
Figure 70 : Nombre de cellules Ki67 positives après traitements plasma. (n=8, moyenne+/- SEM)	165
Figure 71 : Effets d'une fraction de plasma <i>in vivo</i> sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire. (n=8, moyenne+/-SEM, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$)	165
Figure 72 : Viabilité cellulaire 24h après traitement à 3 débits de dose différents. A, image de BLI (H460) représentative des résultats obtenus avec les 3 lignées, tous les puits ont reçu la même dose mais en un temps différent. B, viabilité déterminée par BLI de la lignée U87MG. C, viabilité déterminée par BLI de la lignée HCT116. D, viabilité déterminée par BLI de la lignée H460. (n=6, moyenne+/-SEM, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$)	167
Figure 73 : Induction d'apoptose sur la lignée H460 avec différents débit de dose. (n=8, moyenne+/-SEM, $*p < 0.05$)	168
Figure 74 : DL_{50} des 3 lignées cellulaires 24h après traitement par DBD. (n=8, moyenne+/-SEM)	169
Figure 75 : Viabilité cellulaire déterminé par BLI après un traitement de 10J/cm ² de plasma. (n=8, moyenne+/-SEM).....	170
Figure 76 : Photo du traitement d'un foyer tumoral par DBD.....	171
Figure 77 : Suivi de la croissance tumorale par BLI avec ou sans traitement au plasma : le traitement a été effectué après une opération chirurgicale, sur la tumeur, à 200Hz pendant 8 min (n=5)	172
Figure 78 : Suivi de l'activité tumorale par imagerie de BLI avec ou sans traitement plasma. (n=5, moyenne+/-SEM, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$).....	173
Figure 79 : Masse tumorale des tumeurs CTRL et Plasma, après sacrifice.....	173
Figure 80 : Effets de dose croissante de plasma sur la viabilité cellulaire. (n=7, moyenne+/- SEM)	175
Figure 81 : Suivi par vidéo microscopie de l'effet de différentes doses de plasma sur la lignée HCT-116.	176
Figure 82 : Suivi de la prolifération des cellules tumorales par vidéo microscopie. (n=4, moyenne+/- SEM).....	177
Figure 83 : Photos représentatives des blessures réalisées lors des expérimentations en scratch test.....	179

Figure 84 : Vitesse de cicatrisation déterminée à partir de l'aire des blessures. (n=4, moyenne +/- SEM, * $p < 0.05$)	180
Figure 85 : Distribution des cellules dans le cycle cellulaire en fonction des doses de plasma. (n=8, moyenne +/-SEM, ** $p < 0.01$)	181
Figure 86 : Prolifération cellulaire 24h après traitement déterminée par incorporation de BrdU. (n=8, moyenne +/-SEM, ** $p < 0.01$)	181
Figure 87 : Induction d'apoptose par le plasma gun sur la lignée HCT-116. (n=8, moyenne +/-SEM, * $p < 0.05$)	182
Figure 88 : Photo du traitement d'une tumeur localisée du pancréas chez la souris avec le plasma gun	184
Figure 89 : Évolution de l'activité tumorale de tumeurs du pancréas déterminée par BLI. (n=8, moyenne +/- SEM, * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$)	185
Figure 90 : Masse des tumeurs des différents groupes de traitements à la fin de l'étude (J36). (n=8, moyenne +/-SEM, * $p < 0.05$)	186
Figure 91 : Traitement de carcinome colorectal avec le plasma gun.	187
Figure 92 : Suivre de la croissance tumorale par imagerie de BLI du groupe CTRL et du groupe PG. (n=6, moyenne +/-SEM, * $p < 0.05$)	188
Figure 93 : Imagerie de BLI d'une souris traitée au plasma (à gauche) et d'une souris CTRL (à droite) à J37.	189
Figure 94 : Sensibilité des cellules aux ROS. Adapté de [122].	208

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques des différentes morts cellulaires. Adapté de [31]	14
Tableau II : Les thérapies ciblées approuvées par la FDA avec leurs indications et le taux de réponses, adapté de [67].....	26
Tableau III : Principaux PS possédant une AMM. Adapté de [84]	30
Tableau IV : Les différentes sources de plasma froid. Adapté d'après [217].....	68
Tableau V : Concentrations relatives des espèces chargées et neutres dans la phase gazeuse d'une DBD. Adapté d'après [218, 220].....	70
Tableau VI : Comparaison des intensités de radiation UV pour une exposition de 5 min entre le soleil et le plasma froid [217].....	82
Tableau VII: Équivalence d'une dose selon la fréquence et le temps.....	166
Tableau VIII : Principales mutations présentes dans les lignées utilisées	168
Tableau IX : Principales mutations présentes dans les lignées utilisées.	175
Tableau X : Mutations des différentes lignées.....	196

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANG 1	<i>Angiopoietin 1</i>
APC	Argon Plasma Coagulateur
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BLI	Bioluminescence
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
c-FLIP	<i>Like Interleukin 1β converting enzyme Inhibitory Protein</i>
cIAPs	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
COX	Cyclo Oxygénase
CREB	<i>Cyclic AMP Response Element Binding Protein</i>
DBD	Décharge à Barrière Diélectrique
DMT	Dose Maximale Tolérée
DNase	DésoxyriboNucléase
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGF-R	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>

ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
FIH	Facteur Inhibant HIF-1
GSH	Glutathion
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
Gy	Gray
HE	Hematoxylin Eosine
HIF-1	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
i.p.	Intra-péritonéal
i.v.	Intraveineux
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
IGF2	<i>Insulin Growth Factor 2</i>
IKK	<i>I-Kappa B Kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IR	Radiations ionisantes
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
I κ B	<i>Inhibitor of Kappa B</i>
LET	Énergie de transfert linéaire
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>

MEK	<i>MAPK ERK Kinase</i>
MMP	<i>Matrix MetalloProteinase</i>
MPO	Myéloperoxydase
MRSA	Méthicilline Résistant Staphylococcus Auréus
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NAC	N- Acétyl Cystéine
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NEMO	<i>NF-κB Essential MOdulator</i>
NF-κB	Nuclear Factor κB
ODDD	<i>Oxygen Dependent Degradation Domain</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDK	<i>Phosphoinositide Dependent protein Kinase</i>
PDT	Thérapie PhotoDynamique
PHD	<i>Prolyl HyDroxylase</i>
PI3K/Akt	<i>Phosphatidyl Inositol 3-Kinase/Akt</i>
PIP3	<i>Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PS	Photosensibilisant
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
pVHL	Protéine de Von Hippel-Lindau

Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RS	<i>Reactive Species</i>
RT	Radiothérapie
SCID	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
SEM	Erreur Standard à la Moyenne
Ser	Sérine
SOD	Superoxide Dismutase
TA	Température ambiante
TEP	Tomographie d'Émission de Positons
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
VEGF	<i>Vascular Epidermal Growth Factor</i>

AVANT-PROPOS



Avant-propos

Au cours des dernières décennies, les découvertes et les innovations thérapeutiques se sont enrichies dans le domaine biomédical, en mettant à profit la recherche translationnelle qui se définit comme le chaînon manquant entre recherche fondamentale et recherche clinique. Elle doit assurer le lien entre une recherche fondamentale, essentielle à tout progrès, et une recherche clinique, se préoccupant du patient dans sa réalité complexe d'être humain, en développant les applications médicales à partir des connaissances les plus récentes. Cette recherche translationnelle, pour être efficace, doit nécessairement se développer en prenant en compte dès le départ les défis cliniques, afin de permettre un transfert rapide de la recherche vers le patient. Cet échange continu est d'ailleurs bidirectionnel entre les cliniciens et les chercheurs, de la recherche vers le patient et du patient vers la recherche (recherche translationnelle inverse) et qui est résumé en anglais par « *From bench to bedside and back* »).

En oncologie, la recherche translationnelle a pour objectif de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la pertinence d'hypothèses biologiques, le développement de nouvelles méthodes pour le diagnostic, ou la prévention du risque de cancer, ou encore de déterminer les bases biologiques d'une observation faite en clinique.

Ceci a pour conséquences une amélioration du dialogue entre cliniciens et fundamentalistes, afin d'une part d'orienter la recherche fondamentale vers des problèmes pertinents au regard de la clinique, et d'autre part, de permettre aux cliniciens un accès efficace aux avancées les plus récemment acquises dans les laboratoires.

C'est dans ce contexte de recherche translationnelle qu'ont été effectués les travaux rapportés dans ce mémoire. Les expérimentations ont été réalisées dans le cadre du projet PlasMed (Plasma pour la Médecine) financé par la Région Centre et regroupant un consortium de deux laboratoires de recherche, deux partenaires industriels (INEL et GERMITEC) et un comité de cliniciens de deux CHR regroupés au sein d'un conseil médical.

Les travaux de ce projet ont donc été réalisés principalement au sein de deux laboratoires de recherche complémentaires.

- Le laboratoire GREMI « Groupe de Recherches sur l'Énergétique des Milieux Ionisés » est un laboratoire du CNRS et de l'université d'Orléans spécialisé dans le développement et la caractérisation des plasmas. Il a permis le développement des sources et la caractérisation des plasmas froids mises en œuvre dans le cadre de l'évaluation du plasma.

- Le CIPA (Centre d'Imagerie du Petit Animal) de l'unité TAAM (UPS44 du CNRS) est une structure de service du CNRS dont la mission est de répondre aux besoins d'imagerie pour la communauté scientifique et de favoriser l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lesquelles l'imagerie peut constituer une ressource stratégique pour la recherche préclinique translationnelle. C'est au CIPA que les expérimentations portant sur l'évaluation de l'activité antitumorale du plasma froid ont été menées.

- Toutes nos études ont été réalisées dans le cadre d'une recherche translationnelle encadrée par un dialogue avec les praticiens des CHR d'Orléans et de Tours pour conserver autant que faire se peut une pertinence clinique par rapport aux choix des cibles potentielles d'une stratégie thérapeutique par plasma froid et aux contraintes associées.

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'intérêt du plasma froid, qui est un gaz ionisé possédant des propriétés extrêmement réactives, comme nouvel agent antitumoral, avec comme objectif à plus long terme d'évaluer l'intérêt de l'utilisation des plasmas froids dans le cadre du traitement de tumeurs accessibles par voie endoscopique comme les tumeurs coliques ou pulmonaires chez l'homme.

Pour ce faire, nous avons évalué l'impact du plasma froid sur les cellules tumorales *in vitro* en termes de survie globale, mais également en terme d'interaction du plasma avec les différentes caractéristiques des cellules tumorales comme l'apoptose ou encore la prolifération. Après avoir réalisé des études préliminaires de tolérance indispensables dans le cadre de cette recherche préclinique, nous avons évalué l'efficacité antitumorale du plasma *in vivo* sur différents types tumoraux de la manière la plus prédictive possible vis-à-vis de l'homme.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Physiopathologie du cancer et traitements

I. Caractéristiques des cellules tumorales

La cancérisation des cellules est un processus multiétape progressif. La cellule va acquérir les capacités qui vont lui permettre de franchir les étapes la faisant passer de la cellule saine à cancéreuse. Cette transformation cellulaire est en partie la résultante d'altérations génétiques de la cellule qui, au cours des modifications cellulaires puis tissulaires, conduit à une large variété de types tumoraux. Il existe plus d'une centaine de cancers différents recensés et il est désormais acquis qu'un défaut de régulation de la prolifération et de l'homéostasie ne peut expliquer à lui seul cette large variété. Ce large catalogue de génotypes et phénotypes tumoraux peut être expliqué par six altérations physiologiques essentielles qui vont gouverner la transformation et le développement de la cellule tumorale [1]. Ces altérations, qui peuvent être distinctes ou complémentaires, sont les fondations solides de la compréhension de la biologie du cancer et sont aujourd'hui à la base du développement des nouvelles stratégies thérapeutiques [2]. Les différentes altérations sont présentées en figure 1 et seront détaillées par la suite.

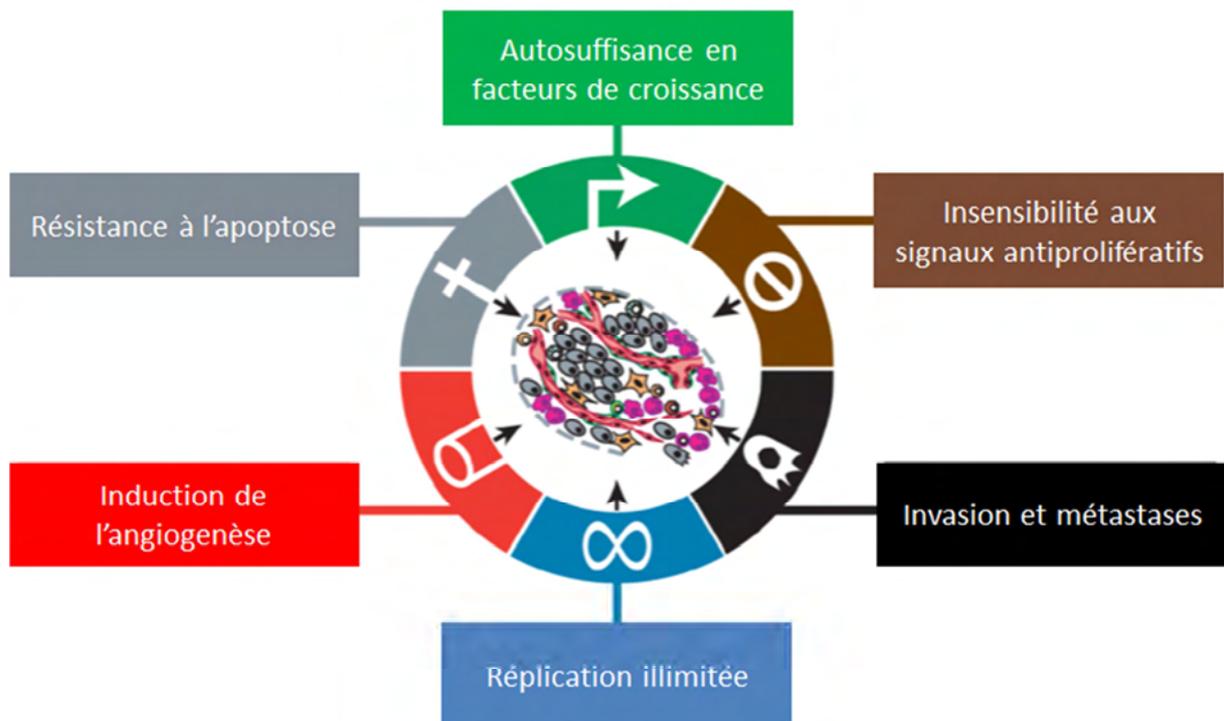


Figure 1 : Les altérations dans le processus de cancérisation cellulaire, d'après [2].

A. Une auto-suffisance en facteurs de croissance

Les cellules normales composant l'organisme sont pour la plupart à l'état de quiescence. La prolifération de ces cellules est strictement régulée selon les besoins pour garder une homéostasie du nombre de cellules. Cette régulation intervient via des facteurs de croissance diffusibles qui vont pouvoir déclencher dans la cellule réceptrice une activation de la prolifération, une progression dans le cycle cellulaire et au final une duplication de la cellule. En l'absence de ce type de signal, les cellules normales ne peuvent se multiplier [2].

Une des caractéristiques fondamentales des cellules tumorales est liée à une capacité de prolifération chronique qui peut être acquise de différentes manières. La cellule tumorale est capable de produire elle-même les facteurs de croissance dont elle a besoin et par ce système, elle devient le maître de sa propre destinée. En parallèle, une diminution de la dépendance des cellules tumorales vis-à-vis des facteurs environnementaux est observée. L'autonomie en facteurs de croissance est la première des 6 altérations à être clairement définie. Cela s'explique par la prévalence importante des oncogènes qui sont capables de moduler cette fonction. Cette autonomie est expliquée en partie par les dérégulations suivantes [2]:

- Une production de GF (*Growth Factors* – Facteurs de croissance) par la cellule elle-même
- Une surexpression du nombre de récepteurs aux GF à la surface membranaire
- Une altération des récepteurs aux GF (mutations, activation constitutive...)
- Une activation constitutive des voies de signalisation en lien avec les récepteurs

La famille des facteurs de croissance est composée de nombreuses molécules (*Insulin Growth Factor* 'IGF', *Transforming Growth Factor* 'TGF', *Fibroblast Growth Factor* 'FGF', ...), mais un des facteurs les plus étudiés est l'EGF (*Epidermal Growth Factor*). L'EGF est un facteur de croissance capable de stimuler la prolifération cellulaire de manière importante via une fixation à son récepteur (EGF-R ou HER-2) (figure 2) [3]. L'EGF-R est un récepteur à activité tyrosine kinase surexprimé dans de nombreux cancers, c'est le cas dans 40 % des glioblastomes et il participe de manière importante à la prolifération incontrôlée de ces tumeurs [3]. Ce récepteur transmembranaire comprend trois domaines : un domaine

extracellulaire possédant un domaine de fixation du ligand (EGF et TGF α), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire possédant un domaine à activité tyrosine kinase. Les ligands peuvent se fixer sur le domaine extracellulaire provoquant ainsi la dimérisation du récepteur. Cela conduit à une phosphorylation réciproque entre les différentes tyrosines kinase du récepteur, entraînant la transduction du signal *via* principalement la voie Ras/MAPK et la voie PI3K/Akt [3]. Une régulation par rétrocontrôle négatif des voies de signalisation permet d'assurer le fonctionnement optimal de la signalisation intracellulaire. Un défaut dans cette régulation peut conduire à une activation constitutive de la signalisation de prolifération. Par exemple la mutation de *ras* est rapportée dans plus de 25% des cancers [2]. La protéine PTEN qui est une protéine intervenant dans la déphosphorylation de PI-3K est également non fonctionnelle dans une grande majorité de cancer [4].

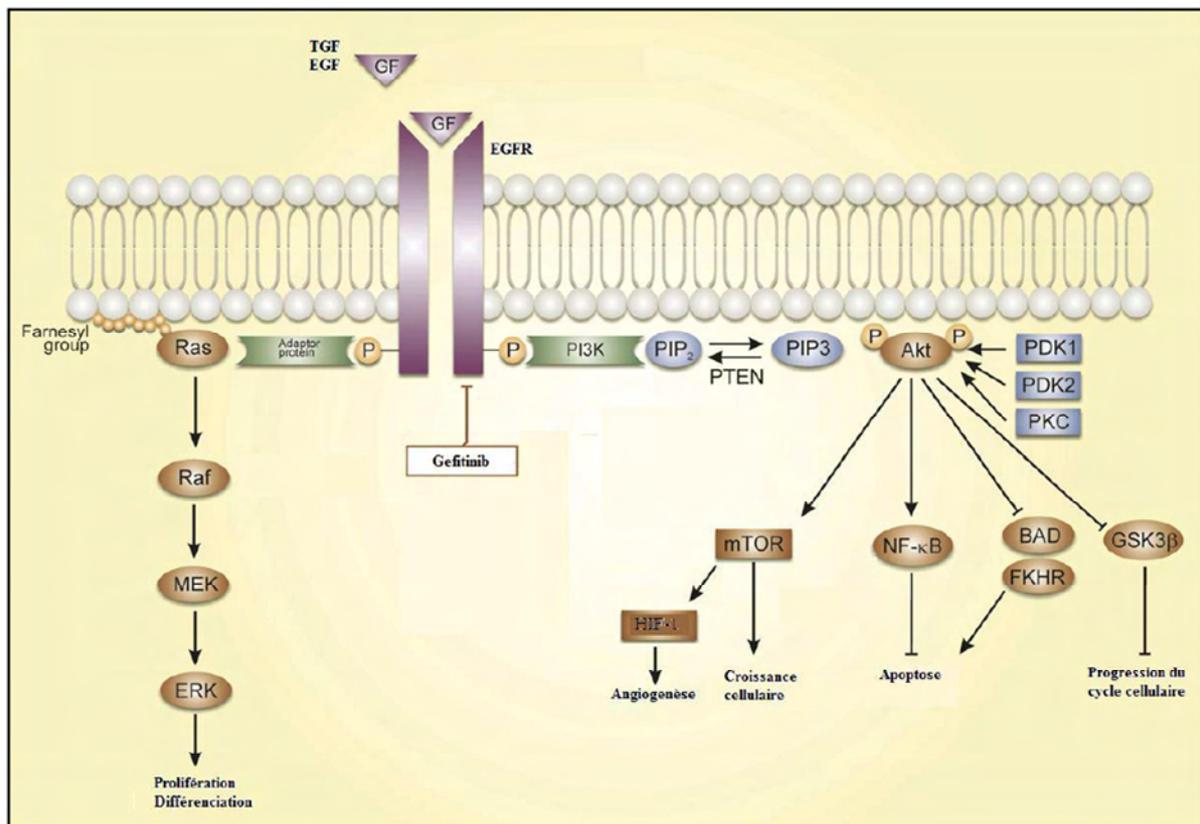


Figure 2 : Voie de signalisation schématisée de l'EGF-R. Adapté d'après [3].

La perte de fonction de ces protéines est principalement liée à la présence de mutations somatiques dans le génome. Au total, environ 1,6% des 22 000 gènes fonctionnels du génome humain présentent des mutations somatiques récurrentes dans le cancer [4].

B. Insensibilité aux signaux antiprolifératifs

En parallèle des facteurs de croissance maintenant une prolifération incontrôlée des cellules, l'ensemble des mécanismes qui régulent négativement la prolifération cellulaire va être contourné [2]. Une grande partie de ces mécanismes sont sous le contrôle de gènes suppresseurs de tumeurs. Il en existe plus d'une douzaine décrits dans la littérature parmi lesquels p53 et pRb [2]. L'inactivation de ces gènes conduit obligatoirement à une dérégulation cellulaire en particulier au niveau des mécanismes de survie ou de mort cellulaire. La protéine pRB (protéine du rétinoblastome) a été découverte comme gène suppresseur intervenant principalement dans la régulation du cycle cellulaire, notamment en provoquant un arrêt des cellules en phase G1 [5]. En son absence, la cellule a la capacité de progresser dans le cycle cellulaire sans contrôle conduisant à une prolifération incontrôlée. Cette protéine est particulièrement impliquée dans l'initiation des cancers. Par exemple dans le cadre du cancer du col de l'utérus, il a été découvert que l'infection de cellules par le papillomavirus (HPV) est impliquée dans l'apparition de ce cancer. Le HPV va induire la cancérisation de la cellule en inactivant par séquestration pRB avec les oncoprotéines E7 du virus [6]. Un mécanisme similaire est suggéré dans le cadre des tumeurs du foie induites par les virus (comme l'hépatite C) [7]. pRB est également retrouvé comme inactivé dans plus de 90% des carcinomes à petites cellules du poumon [8]. Il est maintenant établi que pRB ne possède pas uniquement un rôle dans la progression du cycle cellulaire mais également dans d'autres processus comme l'angiogenèse, la métastase, l'instabilité génomique et la mort cellulaire [5].

P53 est le gène suppresseur de tumeur le plus étudié en oncologie depuis sa découverte, il y a plus de 30 ans. Il est impliqué dans les processus de réponse aux stress en permettant un arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence. L'activation de p53 peut résulter de nombreux facteurs comme l'hypoxie, le stress oxydatif ou encore de dommages à l'ADN [9]. Il permet alors en induisant l'expression de gènes bien spécifiques d'adapter la réponse en fonction du stress et de protéger la cellule en empêchant la prolifération tout en maintenant l'intégrité du génome [10]. Par exemple, une induction de p53 a été décrite après radiothérapie [11]. Cette induction est liée aux dommages induits par les radiations avec la survenue de cassures simple et double brins. Les dommages induisent un recrutement de H2AX qui va activer les protéines ATM et ATR qui vont phosphoryler la protéine p53 et permettre son accumulation. P53 va alors transcrire les gènes cibles en réponse à ces

dommages et en particulier en induisant une apoptose radio-induite [12]. La perte de la fonctionnalité de p53 se traduit ainsi par une chimio et radiorésistance [13, 14]. La présence de la mutation de p53 est généralement associée à une diminution du taux de contrôle local de la tumeur [15], comme dans les cancers ORL, où une mutation de p53 est retrouvée dans 60% des cas [16]. De ce fait, la détection de mutations de p53 a été proposée comme facteur pronostique [17].

Les mutations de type p53 ou pRB conduisent à la prolifération cellulaire incontrôlée. Ce phénomène est caractérisé par une division cellulaire importante et, donc un cycle cellulaire aberrant [18]. Les cellules normales ne se divisent que très peu, elles sont pour la plupart en dehors du cycle cellulaire en phase de quiescence G0. La progression dans le cycle cellulaire dans les quatre phases qui le composent est régulée par des cyclines. Cela permet d'aboutir à la phase S, où a lieu la réplication de l'ADN puis à la phase M, qui correspond à la division cellulaire en deux cellules filles (figure 3).

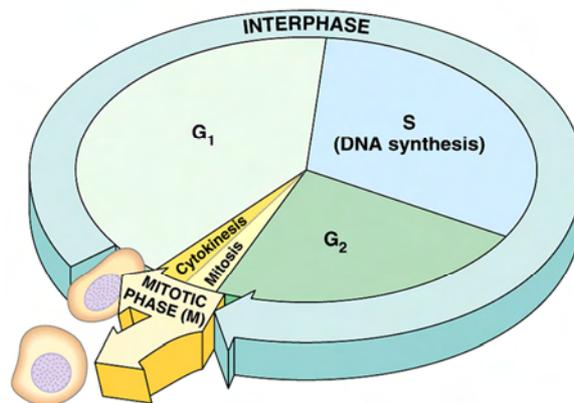


Figure 3 : Les phases du cycle cellulaire. Adapté de [18].

La progression dans le cycle cellulaire d'une phase à l'autre est, normalement, strictement régulée par des senseurs appelés « checkpoints » qui permettent de limiter la prolifération. Les checkpoints permettent de vérifier et de prévenir des aberrations dans le cycle [19]. La perte des points de contrôle est régulièrement rencontrée dans le cadre des cellules tumorales. Par exemple, la perte de pRB entraîne, *via* une dérégulation de la protéine E2F, un passage des cellules de la phase G₁ à S de manière indépendante de la présence de mitogènes [20]. Les signaux de prolifération conduisent également à cette activité accrue du cycle cellulaire (Ras-Raf-MAPK ou PI3K-Akt).

Dans une cellule normale, lorsque le senseur détecte des cassures dans l'ADN, le checkpoint induit un arrêt du cycle cellulaire jusqu'à la résolution du problème ou déclenche l'apoptose pour éliminer la cellule [21]. Lors de dommage à l'ADN, la protéine H2AX va être recrutée sur le site de la liaison et va induire une cascade de signalisation impliquant de nombreux facteurs dont p53, ce qui va conduire à des arrêts dans le cycle cellulaire (figure 4).

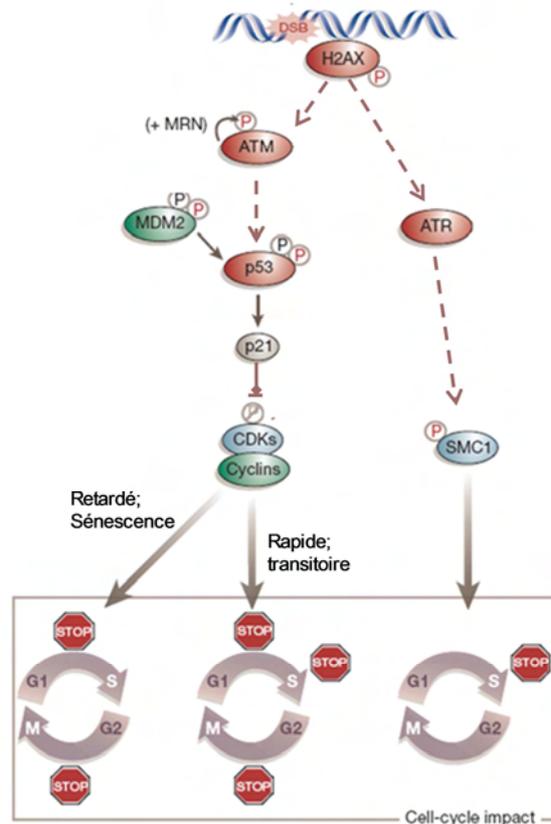


Figure 4 : Schéma simplifié des effets de cassures double brins de l'ADN sur le cycle cellulaire. Adapté de [21].

Le taux de prolifération des cellules tumorales est également un biomarqueur pouvant servir en clinique comme facteur pronostique. Par exemple, dans le cancer du sein en utilisant le marqueur de prolifération de référence Ki-67, il a été démontré que les phénotypes tumoraux possédant un taux élevé de prolifération entraînent un nombre plus important de rechute [22]. Compte tenu de l'importance du cycle dans la division cellulaire, de nombreuses thérapies utilisent les différentes phases comme cible. C'est le cas des inhibiteurs de topoisomérase comme l'irinotécan ou des agents alkylants comme le cisplatine qui affectent la phase de S de répllication de l'ADN [18].

C. Invasion et métastases

Les métastases sont responsables de la plupart des décès liés au cancer [23]. La métastase est un processus multiétape impliquant (figure 5):

- Une invasion locale du stroma
- Un détachement et une embolisation de cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques adjacents.
- La circulation de ces cellules dans les vaisseaux
- La survie et un arrêt des cellules tumorales dans un capillaire
- Une extravasation des cellules avec des mécanismes similaires à l'invasion locale
- La prolifération des cellules tumorales dans le parenchyme de l'organe
- La mise en place d'une vascularisation

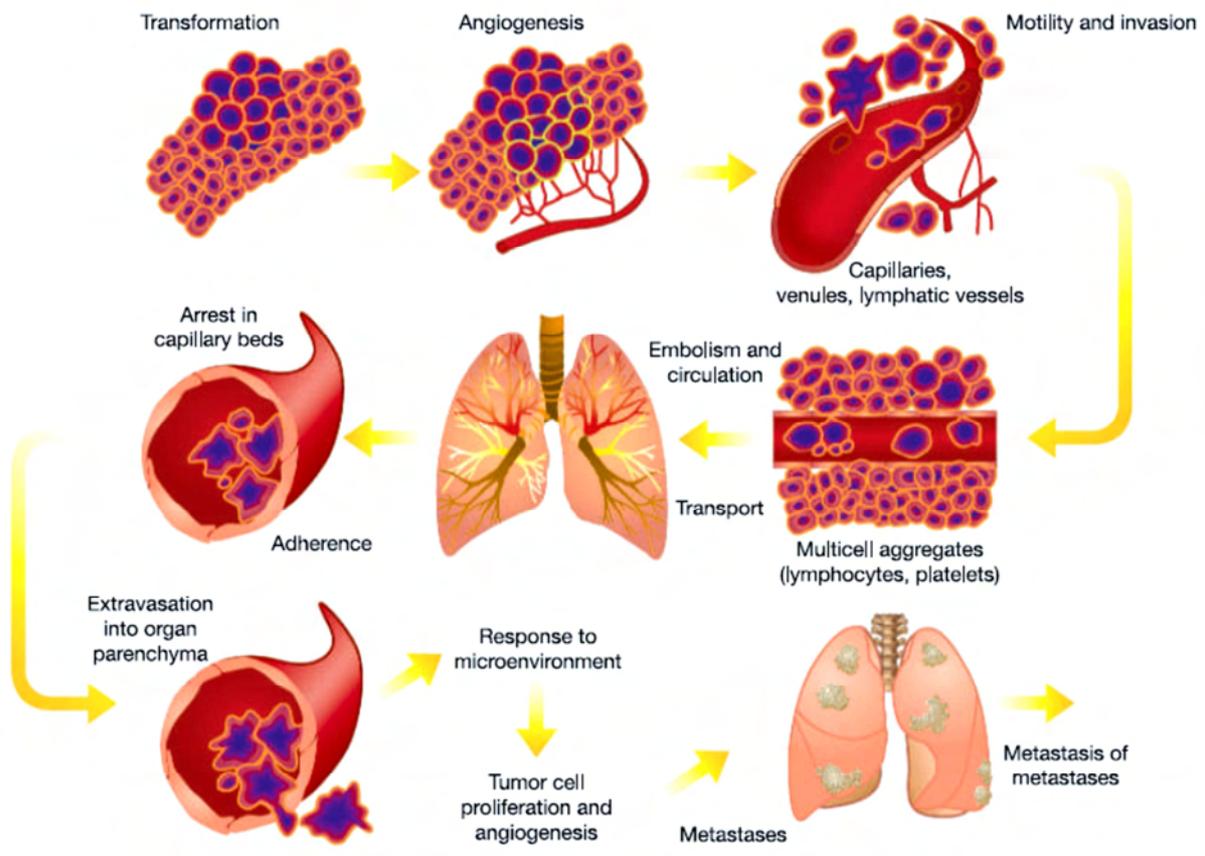


Figure 5 : Les étapes de la métastase [23]

La première étape repose sur la capacité d'invasion des cellules dans le stroma et leur capacité à se retrouver dans la lumière des vaisseaux. La cellule tumorale met en place un programme appelé la transition épithélio mésenchymateuse [24]. Cela implique un remodelage du cytosquelette, une modification des interactions intercellulaires, des interactions avec la matrice extra-cellulaire (MEC) sous-jacente et une dégradation de cette MEC par des protéases. Les cellules, via une modification de l'expression génique, sont capables de rompre leurs interactions cellule – cellules et cellule - matrice extracellulaire. Par exemple, la diminution de l'expression de la cadhérine E, qui est une molécule d'adhésion, est souvent associée à ce type d'altération [25]. Le changement d'expression des intégrines est également associé aux capacités d'invasion des cellules. Pour finir, les cellules tumorales doivent franchir la lame basale. Cette étape nécessite une dégradation de la lame basale par des enzymes protéolytique en particulier les métalloprotéinases (MMP) [23]. Une augmentation de la production de MMP par les cellules tumorales est en général associée au pouvoir métastatique des cellules tumorales [25].

Les cellules vont ensuite devoir survivre dans la circulation sanguine ou lymphatique et vont alors s'arrêter dans un organe distant suivant le tropisme qu'elles possèdent. En effet, les cellules tumorales circulantes vont coloniser et former des métastases dans un organe spécifique en fonction des caractéristiques tumorales initiales. Les cellules tumorales vont former des sites appelés micro métastases qui sont capables de rester en dormance puis de proliférer et former une nouvelle tumeur. Cette dormance est liée en grande partie à l'incompatibilité des cellules tumorales avec leur nouvel environnement, et à leur incapacité à exprimer les molécules d'adhésion comme les FAK (focal adhésion kinase) ou les intégrines [25].

D. Une réplication illimitée

Pour former une masse tumorale importante à partir de quelques cellules possédant les mutations lui donnant des capacités tumorales, il faut que ces cellules possèdent un potentiel de réplication important et illimité. Cette capacité est à opposer à la plupart des cellules humaine qui possèdent un nombre de réplication défini, c'est-à-dire un nombre limité de divisions et de croissance. Ce phénomène est particulièrement visible si l'on s'intéresse aux cellules *in vitro*. Les cellules vont se diviser pendant un certain nombre de passages, puis vont entrer en sénescence et finalement la population va mourir. La protection de l'extrémité des

chromosomes par les télomères est principalement impliquée dans ce phénomène. À chaque division cellulaire, la longueur des télomères diminue. Cette longueur permet de déterminer combien de générations successives la cellule sera capable de donner avant que les télomères, devenant trop courts, ne remplissent plus leurs fonctions de protection et provoquent une entrée de la cellule en sénescence [26].

Dans le cas des cellules tumorales, la télomérase, une enzyme capable d'ajouter des fragments de télomère est présente dans plus de 90% des cas, alors qu'elle est absente dans les cellules normales [2]. C'est la présence de la télomérase qui permet ainsi la réplication illimitée des cellules tumorales. Il apparaît d'autre part que la télomérase possède d'autres fonctions comme la stimulation de la prolifération cellulaire ou encore la résistance à l'apoptose [27].

E. Résistance à l'apoptose

L'échappement à l'apoptose est une des caractéristiques importantes des cellules tumorales. L'apoptose est un processus de maintien de l'homéostasie cellulaire qui permet de réguler le nombre de cellules et d'orienter celles présentant des dysfonctionnements vers la mort cellulaire. L'apoptose peut ainsi être qualifiée de « barrière » au développement du cancer [28, 29]. Cette résistance à l'apoptose est également impliquée dans la résistance aux thérapies anti-tumorales [30]. La compréhension de ces mécanismes de résistance est donc particulièrement importante pour le développement de nouvelles stratégies visant à induire la mort des cellules tumorales.

L'apoptose n'est pas le seul type de mort cellulaire existant, il existe d'autres types comme la sénescence, la nécrose, ou encore l'autophagie (TABLEAU I) [31].

Tableau I : Caractéristiques des différentes morts cellulaires. Adapté de [31]

Type de mort cellulaire	Changements morphologiques			Biochimie
	Noyau	Membrane	Cytoplasme	
Apoptose	Condensation de la chromatine ; fragmentation régulière de l'ADN	Bourgeonnement	Fragmentation - formation de corps apoptotique	Caspase dépendant
Autophagie	Chromatine partiellement condensé	Bourgeonnement	Formation de vésicules d'autophagie	Caspase indépendant / activité lysosomale
Catastrophe mitotique	Fragmentation nucléaire; multinuclée	-	-	Caspase indépendant (au départ) Activité CDK1/cycline anormale
Nécrose	Agglutination et dégradation aléatoire de l'ADN	Rupture	Vacuolation ; dégénérescence des organelles	-
Sénescence	Modification de la structure de l'hétérochromatine	-	Applanissement et augmentation de la granulosité	Activité β -galactosidase

Au cours de la **nécrose**, il y a un relargage du contenu intracellulaire dans le milieu environnant conduisant à une réponse inflammatoire avec activation des phagocytes et leucocytes. Ce type de mort a souvent été considéré comme un processus accidentel et non contrôlé, contrairement à l'apoptose. Néanmoins, il apparaît que dans certaines circonstances, le processus nécrotique est contrôlé de manière précise. Il pourrait être mis en place comme une mort alternative lorsque les processus apoptotiques sont inhibés et ainsi jouer un rôle important dans la réponse aux thérapies [32].

L'**autophagie** représente une alternative à l'apoptose qui est une réponse mise en place en cas de stress cellulaire et surtout en cas de déficience en nutriments. Il s'agit d'un recyclage des composants cellulaires qui utilise des lysozymes pour les besoins énergétiques prioritaires de la cellule.

La **catastrophe mitotique** est mise en place par la cellule lorsque celle-ci est soumise à une mitose aberrante. Par exemple, le paclitaxel induit une ségrégation anormale des chromatides sœurs durant la métaphase en intervenant sur les microtubules, ce qui conduit au déclenchement de la mort cellulaire par catastrophe mitotique [31].

Au cours de l'**apoptose**, la membrane plasmique garde son intégrité cytoplasmique (par opposition à l'explosion que représente la nécrose), mais subit des modifications comme l'externalisation des phosphatidylsérines qui permet d'envoyer un signal aux cellules phagocytaires voisines. Au niveau intracellulaire, il y a un clivage de protéines intracellulaires dont les protéines de l'apoptose proprement dites. Ces protéines sont des enzymes appelées

caspases qui permettent de réguler le déclenchement de l'apoptose. Pour cela, elles sont présentes dans le cytoplasme sous forme de proenzymes inactives. Les 14 caspases recensées se classent en deux catégories, les caspases activatrices (caspase 8, 9, 10, ...) et les caspases effectrices (caspase-3, 6, 7, ...). Les caspases activatrices sont responsables de l'activation d'une cascade protéolytique et agissent en clivant les caspases effectrices [33]. Ces caspases effectrices vont être à l'origine de l'exécution de l'apoptose et du clivage de la plupart des protéines intracellulaires [33].

La mitochondrie joue un rôle central dans le processus apoptotique (voie intrinsèque), *via* la perméabilisation de sa membrane libérant des protéines, dont le cytochrome C, qui vont activer les caspases. La perméabilisation de la membrane est sous le contrôle de protéines anti-apoptotiques (dont Bcl-2 et Bcl-xl) et de protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, ...). En réponse à un stress, il y a un déséquilibre des facteurs pro et anti-apoptotiques conduisant à la perméabilisation de la mitochondrie. Durant cette perméabilisation, on observe également une libération d'IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein), qui sont identifiés comme des inhibiteurs de caspases. Les IAP à l'état physiologique permettent donc la régulation de l'apoptose. Dans le cas des cellules tumorales, une surexpression d'IAP est parfois observée et correspond à l'inhibition de l'apoptose. Il en est de même pour les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, pour lesquelles une surexpression est régulièrement observée [2]. Une autre voie de l'apoptose, appelée voie extrinsèque, fait intervenir des récepteurs à domaine de mort qui sont exprimés naturellement à la surface des cellules. L'apoptose est alors déclenchée après fixation de ligand sur ces récepteurs, comme par exemple le TNF et Fas-L.

La plupart des thérapies anti-tumorales, lorsqu'elles induisent de l'apoptose, utilisent la voie intrinsèque. Par exemple, lorsque qu'une thérapie provoque des dommages à l'ADN, ceux-ci sont détectés puis induisent l'activation de p53 entraînant un arrêt du cycle cellulaire. Si les dommages sont irréparables, p53 active le programme apoptotique impliquant l'expression et la régulation d'un nombre important de protéines dont l'activation de Bid puis de Bax. Lorsque p53 est mutée, la voie apoptotique est altérée et la cellule réplique plus facilement un ADN endommagé [34].

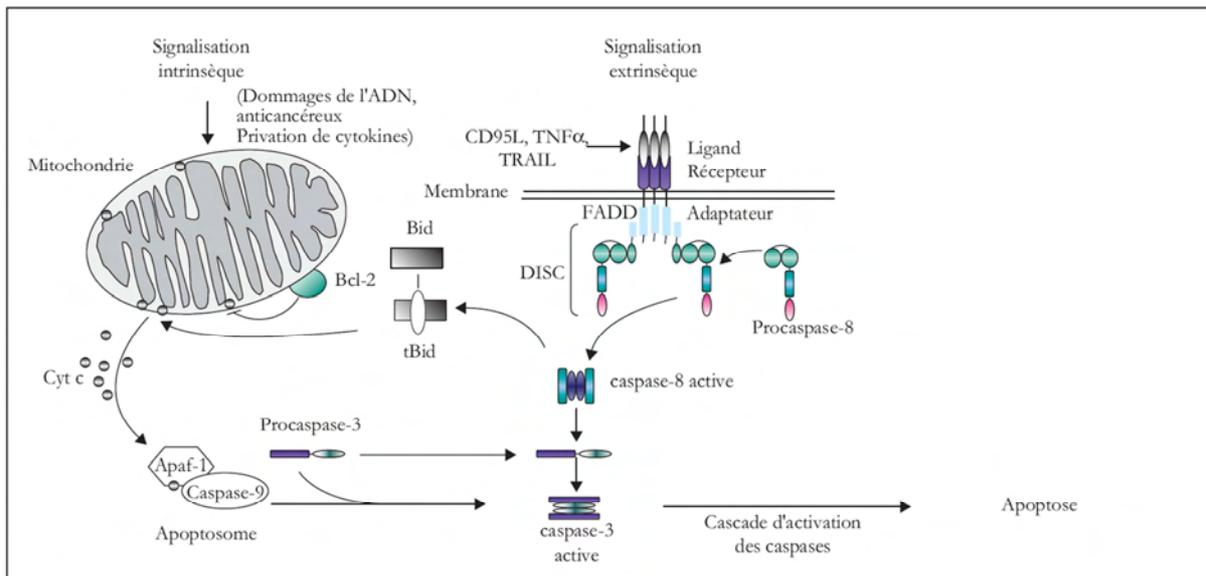


Figure 6 : Signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose [35]

F. Une induction de l'angiogenèse

La prolifération tumorale est à la fois contrôlée par les mécanismes intracellulaires que l'on vient de détailler mais également par ses interactions avec son environnement. Dans un tissu normal, le métabolisme de la tumeur nécessite un apport en nutriments et oxygène ainsi que l'évacuation des résidus métaboliques et du CO₂. Folkman, en 1971, a été le premier à émettre l'hypothèse que sans ce développement angiogénique, la croissance tumorale au delà d'un volume de quelques millimètres de diamètre était impossible [36]. Le passage d'une tumeur en phase latente à une tumeur agressive est lié au développement d'une néovascularisation : on parle de switch angiogénique. Ce passage est lié à un déséquilibre des facteurs pro et anti-angiogéniques et la diffusion de ces facteurs depuis la tumeur vers le microenvironnement (figure 7) [37].

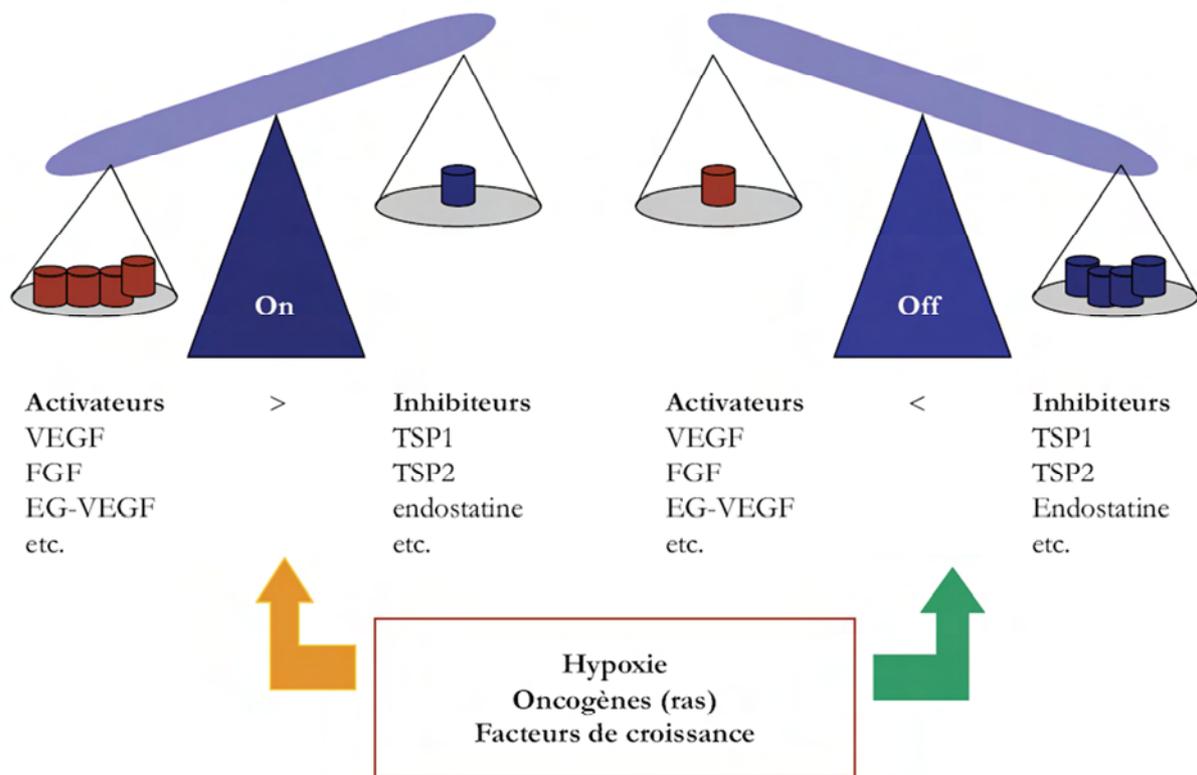


Figure 7 : Le *switch* angiogénique, déséquilibre des facteurs pro et anti angiogénique [38]

Le facteur le plus impliqué est le VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor), molécule pro angiogénique indispensable à la mise en place de ce processus majeur [36, 37]. D'une façon générale, l'ensemble de ces facteurs responsables du *switch* angiogénique est régulé *via* des voies de signalisation spécifiques mais est également sous le contrôle de la présence d'oxygène. Cette régulation par la présence en oxygène est liée à l'activité du facteur de transcription HIF-1.

Le gène de HIF-1 α est constitutivement exprimé dans tous les organes [39] et la régulation de la protéine HIF-1 α se fait essentiellement au niveau traductionnel. Ainsi, la quantité dans le cytoplasme et la capacité de transactivation de HIF-1 dépendent de manière importante de la concentration en oxygène dans le milieu. En condition d'oxygénation normale ($pO_2 > 40$ mmHg ; 5 % d' O_2), la protéine HIF-1 α est hydroxylée sur deux résidus proline (402 et 564) situés dans le domaine ODD par des prolyl hydroxylases (PHD 1-3) qui ont besoin d'oxygène pour fonctionner, puis subit une acétylation par une acétyltransférase ARD1. Ces modifications permettent la reconnaissance avec la protéine pVHL de HIF-1 α , ce qui déclenche l'ubiquitinylation de cette dernière et sa dégradation par le protéasome [40].

FIH-1 (facteur inhibant HIF-1) est une enzyme utilisant l'oxygène comme substrat. En présence d'oxygène, elle hydroxyle le domaine C-TAD de HIF-1 α , empêchant ainsi

l'interaction de HIF-1 α avec son coactivateur CBP/p300 et prévenant l'expression de ses gènes cibles [39].

En situation hypoxique, HIF-1 α n'est plus dégradée par le protéasome et peut être transloquée dans le noyau où elle s'hétérodimérise avec HIF-1 β . L'hétérodimère ainsi formé reconnaît une séquence HRE (Hypoxia Response Element) présente sur les promoteurs des gènes cibles, dont plus de 70 ont déjà été décrits, et qui sont impliqués dans de nombreux mécanismes tels que :

- l'angiogenèse : VEGF, ANG 1...
- le métabolisme : les transporteurs du glucose (GLUT-1 et GLUT-3)...

Des auteurs ont démontré que la surexpression de HIF-1 α est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers, en particulier dans les gliomes où son expression peut être associée au grade, à la microdensité vasculaire et à la survie [41, 42]. Dans les gliomes, l'expression élevée de HIF-1 α , détectée par immunohistochimie, ne peut pas être expliquée par l'hypoxie seule. De nombreuses altérations génétiques, comme par exemple la délétion de PTEN, la perte de la protéine pVHL ou les altérations de p53 [43], augmentent son niveau basal d'expression. De même, l'activation constitutive de voies de signalisation comme celle de l'EGF-R conduit à l'induction de HIF-1 α . Cette induction survient tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel. En effet, des cascades de signalisation intracellulaire conduisent à l'augmentation de la synthèse d'ARNm de HIF-1 α [44], dont la traduction peut également être augmentée sous la stimulation indirecte de Akt. L'activité transactivatrice de HIF-1 est également sous la dépendance de la voie des MAPK qui phosphorylent le coactivateur CBP/p300 [45]. L'ensemble de ces mécanismes joue un rôle prépondérant dans l'induction de HIF-1 en situation tumorale et est susceptible de mener à la saturation de son système de dégradation [44].

L'angiogenèse est un processus indispensable pour le développement tumoral, le développement et la mise en œuvre de nouvelles thérapies ciblant les processus angiogéniques semblent prometteur dans ce cadre. Il apparaîtrait ainsi que les thérapies anti-angiogéniques conduisent à une hiérarchisation/normalisation de la vascularisation tumorale, permettant de lutter contre l'hypoxie tumorale qui constitue un facteur majeur d'échec en réponse aux thérapies antitumorales (figure 8).

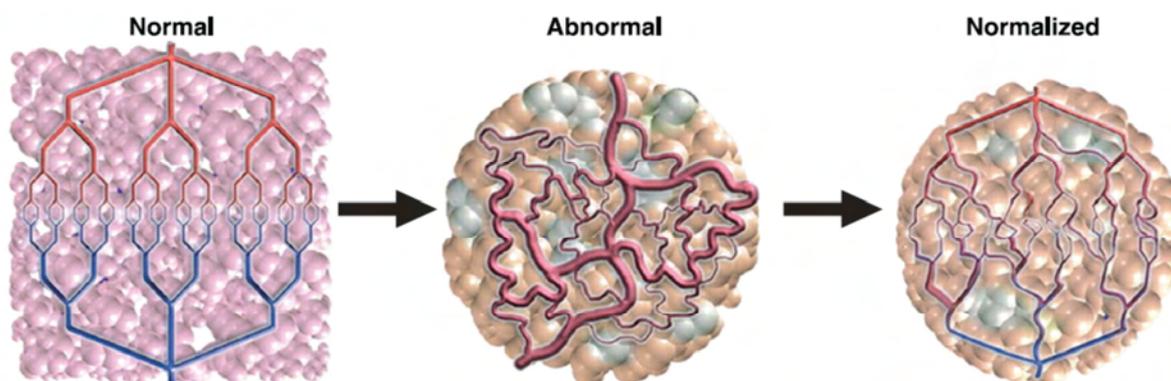


Figure 8 : Normalisation des vaisseaux sous traitement anti-angiogénique [46]

D'une manière générale, la résistance des cellules tumorales aux traitements actuels est lié à la vascularisation anormale de la tumeur qui induit une faible pénétration des molécules cytotoxiques au sein de la tumeur, un faible taux de dioxygène qui intervient dans les processus oxydants et un métabolisme cellulaire particulier (i.e. expression de HIF-1) [46].

G. Émergences de nouveaux marqueurs

L'ordre d'apparition des dérégulations précédemment énuméré n'est pas défini et ne correspond pas obligatoirement à l'ordre d'apparition dans le texte. De plus, une mutation peut conférer à elle seule une dérégulation de plusieurs paramètres, par exemple une capacité de prolifération et de résistance à l'apoptose. Parmi l'ensemble des marqueurs détaillés, de nouveaux marqueurs font leur apparition comme l'échappement au système immunitaire, l'inflammation, l'instabilité génomique ou le dérèglement du métabolisme cellulaire [2]. Par ailleurs, la tumeur est constituée de cellules extrêmement hétérogènes, et ces dernières années un nouveau type cellulaire a fait son apparition dans la discussion : les cellules souches tumorales [47]. Ces cellules sont caractérisées par des marqueurs cellulaires proches des cellules souches du tissu d'origine et possèdent la capacité à elles seules de former une nouvelle tumeur. En effet, ces cellules souches après isolement de la tumeur sont capables lorsqu'elles sont implantées en très faible nombre chez la souris de recréer toute l'hétérogénéité tumorale initiale [47]. Cela implique donc qu'un traitement antitumoral ne pourra éliminer la tumeur que si les cellules souches tumorales sont elles mêmes tuées [48]. L'implication des cellules souches tumorales dans la rechute chez le patient est de plus en

plus décrite [49], ce qui semble montrer qu'elles sont plus résistantes aux thérapies que les autres cellules tumorales. La méthode d'évaluation des nouvelles thérapies (qui sera développée en chapitre 2) se base sur des retards de croissance tumorale n'est donc plus forcément aussi pertinente [50], l'effet du traitement sur les cellules souches tumorales étant *a priori* un paramètre important à évaluer [51]. En revanche, les critères d'isolement et d'identification de ces cellules sont à ce jour largement discutés dans la littérature et aucun consensus n'existe pour inclure ce nouvel aspect dans l'évaluation des nouvelles thérapies anti-tumorales.

II. Stratégies thérapeutiques

La prise en charge de première intention des pathologies tumorales repose sur la chirurgie, suivie d'un traitement par chimiothérapie dans la plupart des cas.

Les différentes thérapeutiques utilisées dans le traitement des tumeurs reposent sur un panel important de molécules ou encore de stratégies *in situ*, mais l'ensemble de ces stratégies, bien qu'efficace dans certaines situations, ne permet pas de résoudre le manque de contrôle tumoral rencontré dans les autres. Les premières chimiothérapies développées il y a maintenant plus de 60 ans, sont encore couramment utilisées, comme par exemple les agents alkylants. D'autres molécules plus récentes sont arrivées par la suite comme les antimétabolites qui permettent de bloquer la synthèse d'ADN.

Enfin, depuis une dizaine d'années, un nouveau type de thérapies dites ciblées est venu en complément des chimiothérapies plus conventionnelles. Ces thérapies ciblées sont développées en se basant sur la biologie des tumeurs et visent à contrecarrer des altérations particulières (par exemple l'angiogenèse), tout en tentant de limiter les effets secondaires et améliorer l'efficacité. Avec l'ensemble de ces stratégies, la mortalité par cancer diminue régulièrement et les nouvelles molécules permettent de gagner en survie dans les cancers du sein, du colon, du poumon, ..., les prescriptions s'appuyant désormais de plus en plus sur des diagnostics moléculaires de la tumeur conduisant à une médecine personnalisée pour le patient.

Dans cette partie vont être développées les principales chimiothérapies utilisées et leurs modes d'action, puis l'utilisation de traitements *in situ* comme la thérapie photodynamique ou la radiothérapie.

A. La chimiothérapie

1. Généralités

Les chimiothérapies sont classées en catégories selon leur mode d'action sur la cellule. Elles peuvent être classées en 5 catégories majeures :

- Les agents alkylants (cisplatine, carboplatine, ...)
- Les antimétabolites (gemcitabine, fluorouracil, ...)
- Les inhibiteurs de topo-isomérases de classe I/II (topotecan, étoposide, ...)
- Les anti-mitotiques (paclitaxel, vinblastine, ...)
- Les thérapies ciblées (gefitinib, bevacizumab, ...)

Les **agents alkylant** les plus utilisés sont le plus souvent à base de sels de platine et sont proposés dans de nombreux cas en première ligne de traitement. Leurs mécanismes d'action reposent sur l'alkylation de l'ADN ou de protéines (transfert de manière covalente de groupements alkyles) [52]. L'action des sels de platine peut aller de la formation de mono-adduit sur l'ADN, à des pontages intra ou inter-brin ou encore des pontages ADN protéines (figure 9).

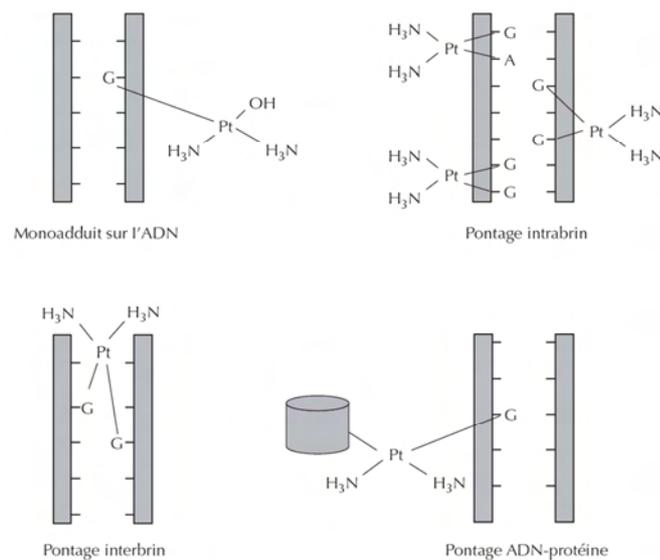


Figure 9 : Structure des différents adduits de platines sur l'ADN [52]

Ces adduits ainsi formés ont un effet cytotoxique important en interférant avec les processus essentiels comme la réplication ou la transcription de l'ADN [53]. Dans un second temps, un ensemble de mécanismes de détection et réparation des dommages de l'ADN se mettent en place. Ceux-ci impliquent généralement l'activation de p53 qui provoquera un arrêt du cycle cellulaire en phase S et G2/M via la protéine p21 puis l'apoptose enclenchée par l'activation des caspases (figure 10) [54]. Bien que le cisplatine soit un puissant inducteur d'apoptose, des phénomènes de résistance peuvent apparaître au cours des traitements. Ils sont la résultante d'une surexpression des protéines de réparation de l'ADN, de la diminution de la concentration intracellulaire en platine, d'un dysfonctionnement de la protéine p53 ou encore d'une suractivation de la voie PI3K/AKT qui exerce un contrôle négatif sur p21 empêchant les arrêts dans le cycle [54].

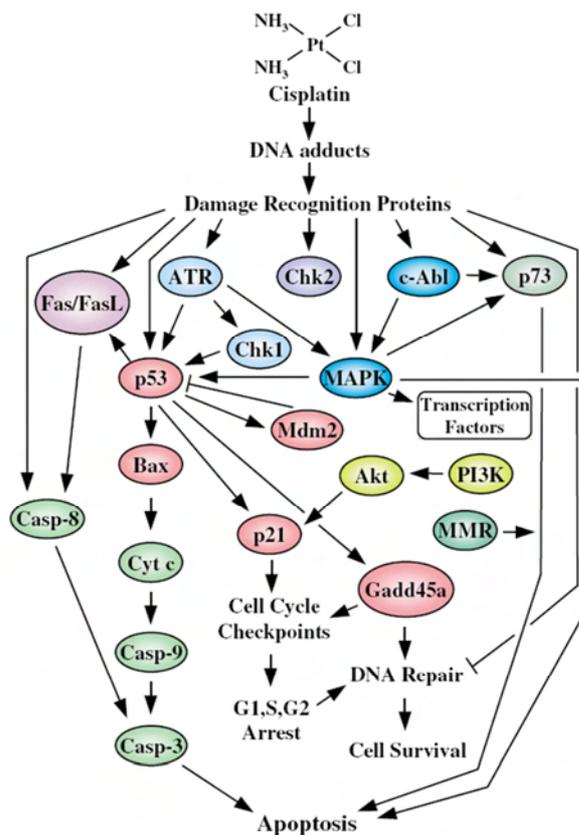


Figure 10 : Effets du cisplatine au niveau cellulaire [54].

Les antimétabolites comme le 5-Fluorouracile ou le méthotrexate sont largement utilisés, mais de nouvelles molécules ont fait leur apparition et se sont imposées, comme la gemcitabine. Ils se définissent comme des interférents avec la synthèse des constituants de l'ADN. Ainsi, il s'agit généralement d'analogues structuraux des bases de l'ADN ou des coenzymes foliniques [55]. Cela va conduire à une diminution de la synthèse d'ADN donc à un arrêt de la prolifération. De plus certains antimétabolites peuvent s'intégrer dans l'ADN provoquant alors une mort cellulaire par apoptose [56].

Parmi, les antimétabolites on peut citer la gemcitabine. Il s'agit d'un analogue pyrimidique qui entre en compétition avec la déoxycytidine et dont l'action principale est l'inhibition de la synthèse de l'ADN et une induction de l'apoptose cellulaire [57, 58]. Il s'agit d'une prodrogue dont l'activation est intracellulaire et après un transport membranaire, elle est phosphorylée par différentes kinases. Trois métabolites actifs sont alors formés (gemcitabine mono, di ou triphosphates), la gemcitabine triphosphate pouvant entrer en compétition avec le déoxycytidine triphosphate (dCTP) pour s'incorporer à l'ADN. Cette incorporation dans les brins d'ADN est favorisée par la gemcitabine diphosphate qui diminue

la concentration cellulaire en dCTP par inhibition de la ribonucléotide réductase (RR). Une fois la gemcitabine triphosphate incorporée, l'ADN ne peut être réparé, la cellule s'engage alors dans un processus de mort par apoptose [59].

Un des mécanismes de résistance à la gemcitabine est lié à la baisse de sa concentration intracellulaire mais également à une augmentation de l'activité de la RR qui empêche l'incorporation de la gemcitabine dans l'ADN [60].

Les inhibiteurs de topo-isomérase I et II, comme le topotecan, l'irinotécan, ou la doxorubicine (topo II) ciblent une enzyme intervenant dans les processus de réplication et de transcription de l'ADN : la topo isomérase. Cette enzyme intervient plus particulièrement dans la ségrégation des chromosomes et est impliquée dans la recombinaison et/ou la réparation de l'ADN [61, 62].

L'irinotécan est une prodrogue, sa forme active est le métabolite SN38, qui va entrer en interaction au niveau cellulaire avec le complexe TopoI-ADN et présente une cytotoxicité phase S spécifique. Le complexe TopoI – irinotécan – ADN n'est pas létal en soit mais c'est la collision de ce complexe avec la fourche de réplication qui conduit à des cassures doubles brins de l'ADN. Ces cassures induisent un arrêt irréversible du cycle cellulaire et une mort par apoptose des cellules [63].

Les anti-mitotiques empêchent la mitose cellulaire. La plupart des molécules se lient à la tubuline ou aux microtubules, modifiant la dynamique microtubulaire et/ou l'état de polymérisation. Les microtubules jouent plusieurs rôles importants dans la prolifération et la migration des cellules eucaryotes ainsi que dans la signalisation et le trafic intracellulaire [64]. Ils sont également impliqués dans la formation du fuseau mitotique intervenant dans la mitose [64].

Parmi les anti-mitotique, on peut citer la vinblastine qui est un agent anti-mitotique, il se fixe à la sous unité β de la tubuline, inhibant ainsi la dynamique des microtubules. Les chromosomes ne sont alors plus capables de progresser en vue de la division et sont en arrêt mitotique conduisant à une mort cellulaire par apoptose. La vinblastine peut également provoquer une apoptose *via* un effet sur p53 et p21 [65].

Le développement des **thérapies ciblées** repose sur l'identification d'altérations moléculaires et/ou de dérèglements des voies de signalisation. Différentes classes existent, comme les inhibiteurs d'activité kinases (imatinib, gefinib, ...), ou les anticorps

thérapeutiques (bevacizumab, cetuximab, ...). Les récepteurs à activité tyrosine kinase dont fait partie l'EGF-R sont impliqués dans la prolifération cellulaire. Des inhibiteurs spécifiques de ces activités tyrosines kinases ont été développés, comme le gefitinib [66]. D'autres caractéristiques comme l'angiogénèse peuvent être ciblées avec des inhibiteurs du VEGF tel que le bevacizumab. Le Tableau II présente les principales molécules de thérapie ciblée approuvée par la FDA [67]. C'est sur le développement de ces nouvelles stratégies que se concentre aujourd'hui une grande partie des efforts de recherche.

Le fonctionnement du gefitinib, qui est un inhibiteur d'activité tyrosine kinase, repose sur le blocage spécifique de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'EGF en se liant au site ATP (Adénosine TriPhosphate) du récepteur empêchant ainsi son autophosphorylation. Cela induit le blocage des voies de signalisation de l'EGF-R, c'est-à-dire la voie PI3K et les MAPK. Cette liaison s'effectue de manière réversible, ce qui signifie que la croissance tumorale est inhibée tant que les cellules sont exposées [68]. Cet effet ne résulte pas seulement du blocage de la prolifération cellulaire mais joue sur d'autres mécanismes comme l'apoptose, l'angiogénèse, ou la réparation de l'ADN (figure 11) [69]. En effet, la voie PI3K/Akt étant une voie centrale de régulation, des facteurs de transcription tels que NF- κ B ou HIF-1 peuvent être modulés par le gefitinib [70].

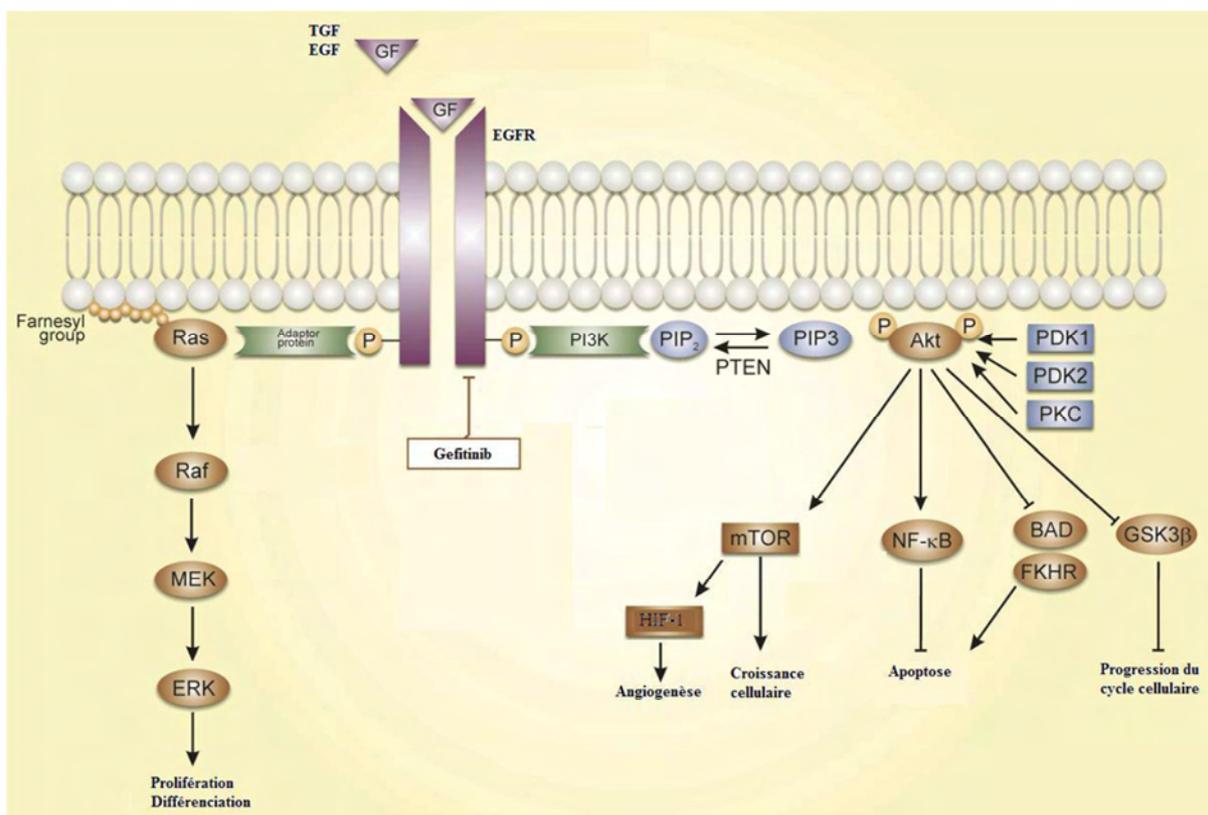


Figure 11 : Effets du gefitinib sur la voie de l'EGF-R, adapté de [3].

Tableau II : Les thérapies ciblées approuvées par la FDA avec leurs indications et le taux de réponses, adapté de [67].

Molécules	Processus	Cibles	Indication	Taux de réponses
Gefitinib (Iressa®)	Prolifération	EGF-R	Cancer du poumon non à petites cellules	9-19%
Erlotinib (Tarceva®)	Prolifération	EGF-R	Cancer du poumon non à petites cellules	10%
	Prolifération	EGF-R	Cancer du pancréas (combiné à la gemcitabine)	8,60%
Cetuximab (Erbix®)	Prolifération	EGF-R	Carcinome avancé de la tête et du cou	13%
	Prolifération	EGF-R	Cancer colorectal métastatique	9%
Panitumumab (Vectibix®)	Prolifération	EGF-R	Cancer colorectal métastatique	10%
Trastuzumab (Herceptin®)	Prolifération	ERBB2	Cancer du sein métastatique (surexprimant ERBB2)	15-26%
Lapatinib (Tykerb®)	Prolifération	ERBB2	Cancer du sein résistant au trastuzumab	39%
Sorafenib (Nexavar®)	Prolifération / Angiogenèse	RAF-1, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR	Carcinome avancé du rein Carcinome hépatocellulaire non résecable	10% 2%
Sunitinib (Sutent®)	Angiogenèse	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, RET	Carcinome avancé du rein Tumeur stromale gastro-intestinale	31% 7%
Bevacizumab (Avastin®)	Angiogenèse	VEGF-A	Cancer colorectal métastatique Glioblastome	3% 20-26%
Imatinib (Gleevec®)	Prolifération	BCR-ABL, PDGFR, KIT	Leucémie myéloïde (chronique et aiguë)	76%
Dasatinib (Sprycel®)	Invasion	ABL, SRC, KIT, PDGFR	Tumeur stromale gastro-intestinale métastasée ou inopérable	38-54%
Nilotinib (Tasigna®)	Prolifération	BCR-ABL	Leucémie imatinib résistante	52%
			Leucémie imatinib résistante	47%

Dans le cadre du traitement de tumeurs, les chimiothérapies sont rarement utilisées seules mais en combinaison afin d'augmenter l'efficacité des traitements. A l'heure actuelle, les deux types tumoraux les plus fréquents dans le monde sont le cancer du poumon et le cancer colorectal [71]. Nous allons détailler les standards chimiothérapeutiques dans ces deux pathologies.

2. Les chimiothérapies dans le cancer du poumon

Le cancer du poumon est un des cancers les plus meurtriers dans le monde avec plus de 1 million de décès par an. Il reste une forme de cancer à forte incidence avec 338 000 nouveaux cas par an en France [71] et il est de très mauvais pronostic, son taux de survie à 5 ans étant inférieur à 10% en Europe [72]. La raison est principalement une détection tardive qui fait que seuls 20 à 30% des patients sont éligibles à la chirurgie et après chirurgie, les deux tiers des patients rechutent [73].

Le cancer du poumon ou cancer bronchique se développe le plus souvent à partir des cellules des bronches, il existe deux grands types de cancers bronchiques : les cancers bronchiques non à petites cellules (80%) et les cancers bronchiques à petites cellules (20%). Les traitements mise en oeuvre dans la prise en charge de ces cancers sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

La chimiothérapie de référence est un agent alkylant (le cisplatine ou le carboplatine) associé en fonction du type tumoral, de l'avancement, de la possibilité d'une résection et de la ligne de traitement à [74] :

- Étoposide
- Paclitaxel
- Docétaxel
- Gemcitabine
- Vinorelbine
- Erlotinib
- Bévacicumab
- Gefitinib

Une activation de l'EGF-R est retrouvée dans 40 à 80 % des cas de cancer bronchique non à petites cellules, ce qui rend l'utilisation du gefitinib intéressante dans ce contexte [75]. Des facteurs de résistance aux traitements ont été clairement identifiés comme la mutation

T790M de l'EGF-R [76]. Ainsi, le diagnostic moléculaire des caractéristiques propres à chaque tumeur permet de proposer un traitement à la carte basé sur les altérations rencontrées [74]. Malgré le nombre de molécules et d'association évalué, le bénéfice en termes de survie est encore loin d'être satisfaisant.

3. Les chimiothérapies dans le cancer colorectal

Les cancers colorectaux représentent 15% de la totalité des cancers et arrivent en deuxième position après le cancer du sein chez la femme et les cancers du poumon chez l'homme [71]. 38 000 nouveaux cas sont diagnostiqués en France chaque année, et ce cancer conduit chaque année à environ 16 000 décès. Malgré la prise en charge thérapeutique avec la chimiothérapie, l'amélioration des techniques de chirurgie, les cancers colorectaux présentent un pronostic grave, la survie à 5 ans étant limitée à 10% tous stade confondus [71]. La moitié des patients a d'emblée au diagnostic, ou développera au cours de l'histoire naturelle de la maladie, des métastases qui restent corrélées à un pronostic péjoratif [71].

Le traitement chirurgical est le seul traitement radical du cancer colorectal, et nécessite une exérèse de qualité avec des marges saines minimales de 5 cm de part et d'autre de la tumeur avec un drainage ganglionnaire si nécessaire.

Les chimiothérapies utilisées sont principalement :

- Le 5 fluorouracile
- L'irinotécan
- L'oxaliplatine
- Le bevacizumab
- Le cetuximab

Le 5 fluorouracile (5-FU) associé à l'acide folinique a permis d'augmenter le taux de réponse de l'ordre (10 à 23%) et a révolutionné la prise en charge des cancers colorectaux qui, en situation métastatique, n'étaient que peu traités [77]. Puis, l'arrivée de l'irinotécan a conduit à un nouveau standard thérapeutique qui associe 5-FU, acide folinique et irinotécan (protocole FOLFIRI) [78]. Le taux de réponse avec cette stratégie s'approche des 35%. L'oxaliplatine est la troisième chimiothérapie majeure dans cette indication et est associée au 5-FU dans le protocole FOLFOX [79]. Les thérapies ciblées sont également présentes dans la prise en charge thérapeutique avec le bevacizumab et le cetuximab. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF qui doit être utilisé en première ou deuxième intention.

L'association du bevacizumab avec le protocole FOLFIRI permet d'atteindre des taux de réponse de 63% avec une médiane de survie de 28 mois dans les stades métastatiques [80]. L'utilisation du cetuximab nécessite un diagnostic préalable du statut de K-Ras, son statut étant un facteur de prédictibilité [81]. L'utilisation du cetuximab en association avec un protocole FOLFOX a donné des réponses objectives de l'ordre de 72%[81].

B. La thérapie photodynamique

1. Généralités

La thérapie photodynamique (PDT) est une thérapie minimalement invasive approuvée en clinique. Cette thérapie est basée sur l'utilisation de deux composants non toxiques qui sont combinés pour obtenir un effet au niveau cellulaire et tissulaire. Le premier composant est un photosensibilisant qui doit cibler les cellules et/ou le tissu et le deuxième composant est une source lumineuse d'une longueur d'onde précise qui va être utilisée pour exciter le photosensibilisant. Cela va induire des réactions photochimiques en présence d'oxygène avec le photosensibilisant (PS) qui va transférer son énergie à l'oxygène entraînant une production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) (figure 12).

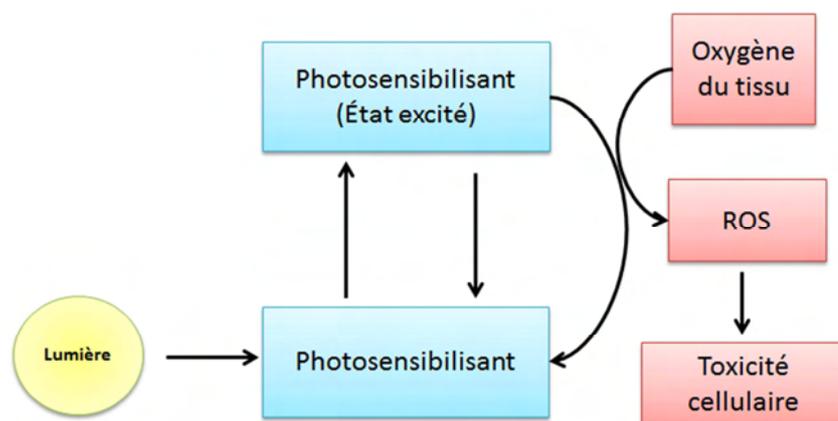


Figure 12 : Mécanismes d'actions de la PDT.

Le photosensibilisant absorbe un photon et passe à un état excité. Les réactions photochimiques induites sont alors de deux types. Pour le type I, le retour à l'état fondamental du PS excité provoque une oxydoréduction directe des molécules biologiques et va former des radicaux et des ions radicalaires conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène

(H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$). La réaction de type II implique un transfert d'énergie du PS directement sur l'oxygène moléculaire qui va conduire à un oxygène singulet excité. Il possède une durée de vie très courte (quelques μs dans l'eau et 25 à 100 μs dans les milieux organiques) mais est très réactif et susceptible de réagir dans son environnement proche (10 à 45 nm) [82]. Le mécanisme de type II est prépondérant et dans les deux cas la présence d'oxygène est primordiale [83].

Les travaux de recherches menés actuellement visent à trouver un photosensibilisant qui soit non toxique pour l'organisme et ne possède pas d'activité thérapeutique propre. De plus il doit posséder une sélectivité pour le tissu tumoral visé afin d'éviter les toxicités liées à l'exposition au soleil, et doit posséder de bonnes caractéristiques photophysiques (rendement en oxygène singulet,...). Il existe à ce jour au moins cinq classes de PS possédant une AMM aux États-Unis ou en Europe (TABLEAU III) [84].

Tableau III : Principaux PS possédant une AMM. Adapté de [84]

Photosensibilisant	Longueur d'onde	Type de cancer
Le porfimère sodique (Photofrin®)	630 nm	Poumon, Oesophage, vessie, canaux biliaires, cerveau et ovaire
ALA (Levulan®)	635 nm	Peau, Oesophage, vessie et cerveau
ALA esters (Metvix®)	635 nm	Peau et vessie
Chlorine m-tétrahydroxyphényl (Foscan®)	652 nm	Tete et du cou, poumon, cerveau, peau , voies bilaires
Dérivé de benzoporphyrine (Visdyne®)	690 nm	Ophthalmique, pancréas et peau
<i>Acide 5-aminolévulinique (ALA)</i>		

Une lumière d'excitation monochromatique et d'intensité définie est utilisée en fonction du photosensibilisant mise en oeuvre. Cette lumière d'excitation est amenée par endoscopie jusque dans la zone à traiter *via* des fibres optique à usage unique connectées à la source laser [85]. La dose de lumière déposée est exprimée en J/cm^2 et est égale à la puissance du laser (en W) x le temps de traitements (en s)/surface (cm^2). Dans le cadre du traitement du cancer superficiel de l'oesophage, une dose de $300J/cm^2$ est recommandée, correspondant à un temps de traitement de 10 min avec un laser de 1W à la longueur d'onde adaptée au PS [85].



Figure 13 : A gauche, un diffuseur cylindrique connecté à une fibre optique ; à droite, traitement PDT par endoscopie de cancer de l'œsophage [85].

Les indications de la PDT par voie endoscopique sont principalement les dysplasies de haut grade sur endo – brachyoœsophage (destruction de la dysplasie dans 90% des cas) [86], les récurrences œsophagiennes superficielles après traitement (destruction dans 80% des cas) [87] et les cholangiocarcinomes (voies biliaires) non opérables (allongement significatif de la survie) [88]. Une utilisation dans le cadre du traitement du cancer du poumon non à petites cellules qui obstrue les voies respiratoires est également approuvée [84]. La PDT présente aussi des applications dans le traitement des lésions de la peau [84]. Pour l'application de la PDT dans d'autres types de situation, son intérêt en terme d'efficacité n'a pas été prouvé de façon claire à ce jour. Cependant, les évaluations cliniques récentes montrent des effets bénéfiques dans le cadre de cancer du pancréas [89], de la tête et du cou ou encore cérébral [84].

2. Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action anti-tumorale de la PDT sont répartis en trois catégories (figure 14) [84, 90]:

- Un effet direct de destruction des cellules tumorales par nécrose, apoptose ou autophagie
- Un effet indirect par destruction de la vascularisation tumorale.
- Un effet indirect dû à une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte.

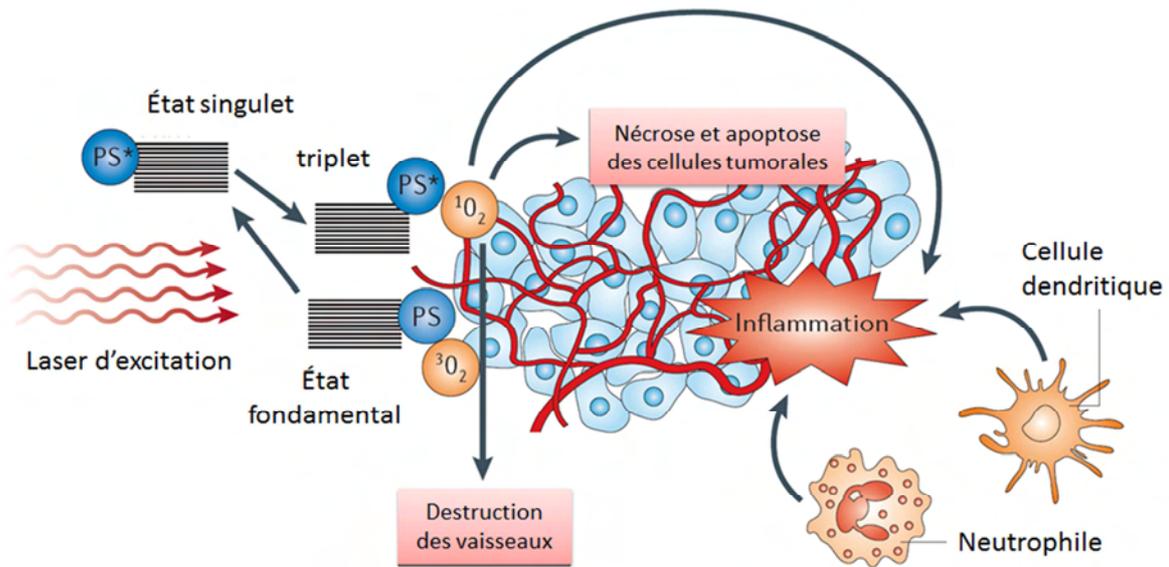


Figure 14 : Mécanismes d'action de la PDT sur les cellules tumorales. Adapté de [91].

L'effet direct de la PDT est la résultante de l'accumulation de PS dans les cellules et la génération de ROS ainsi que d'oxygène singulet qui va entraîner des dommages importants à la cellule, avec une altération des fonctions des organites et des systèmes membranaires. La présence d'oxygène est primordiale dans l'effet direct, tout comme la localisation subcellulaire du PS. En fonction de cela, la cellule pourra mourir par apoptose, nécrose ou autophagie.

L'effet anti-vasculaire de la PDT consiste en des dommages vasculaires survenant après PDT, dommages qui dépendent de nombreux paramètres comme la dose et le type de PS, la dose de lumière,... La PDT provoque immédiatement une vasoconstriction des vaisseaux et quelques heures après, induit un collapsus micro vasculaire [90]. Ce collapsus lié aux dommages induits aux cellules endothéliales provoque un arrêt du flux sanguin et conduit à une hypoxie tumorale puis à la destruction tumorale [92].

L'importance de la réponse immunitaire induite par la PDT a été mise en évidence en comparant les résultats obtenus sur des souris immunocompétentes et souris immunodéprimées, la réponse à long terme étant considérablement améliorée chez les souris disposant d'un système immunitaire [93]. Une activation de macrophages, neutrophiles, cellules T et la production de cytokines IL6, IL10 ont été observées après traitement par PDT. L'ensemble de ces facteurs conduit à une réponse inflammatoire et immunitaire participant à la destruction des cellules tumorales [91].

C. La radiothérapie

1. Contexte

La radiothérapie (RT) est encore à ce jour un traitement de référence dans le cadre de nombreuses tumeurs solides. Elle met en jeu des radiations ionisantes (IR) qui vont induire une réponse locale au niveau du tissu traité. En pratique, elle utilise essentiellement des photons et des électrons, dont les capacités de pénétration dans les tissus sont différentes. Les protons, encore peu utilisés, trouvent actuellement des indications de plus en plus précises. Enfin, d'autres ions, comme les ions carbone, présentent un intérêt potentiel et sont actuellement en cours d'évaluation. Toutes ces particules ont en commun la capacité d'entraîner des ionisations, essentiellement en arrachant des électrons aux atomes et aux molécules qu'elles rencontrent. Ce traitement est souvent administré après la résection tumorale pour en assurer le contrôle local. C'est le cas pour le traitement des gliomes de haut grade.

Les gliomes malins sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et représentent environ 2% des cancers de l'adulte [94]. Avec un gliome de haut grade (glioblastome) la survie des patients sans traitement n'excède pas 9 mois. La prise en charge thérapeutique des gliomes de haut grade associe actuellement chirurgie, radiothérapie et pour en améliorer encore l'efficacité, la radiothérapie est associée à la chimiothérapie. Lorsqu'elle est possible, la chirurgie occupe une place prépondérante dans le traitement des gliomes malins. Cependant, en raison du fort pouvoir invasif des cellules tumorales, une exérèse complète est souvent impossible et les gliomes malins récidivent quasi systématiquement. Suite à la chirurgie, les patients atteints de gliome de haut grade reçoivent donc, en traitement standard, une association radiothérapie (RT)-témozolomide. La RT est délivrée à raison de 1,8 à 2 Gy par jour, 5 jours par semaine pendant 6 semaines. Malgré cela, la survie médiane des patients n'est que de 15 mois, ce qui nécessite de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques [94].

2. Les types de radiothérapie

La radiothérapie est une stratégie ancienne qui a connu de nombreuses améliorations au cours des années, principalement pour éviter l'effet secondaire principal de la RT qui est l'irradiation des tissus adjacents. Afin de délivrer des doses importantes de RT tout en limitant les effets secondaires, comme une radionécrose, la dose totale délivrée à la tumeur est fractionnée en plusieurs traitements. Par exemple, une dose de 60 Gy sera délivrée en 5 fractions de 2 Gy par semaine pendant 6 semaines.

Les différentes techniques de RT développées ne mettent pas en jeu la même énergie. Cette énergie sera définie par le LET (Transfert d'Énergie Linéaire) qui est utilisé pour décrire la quantité d'énergie reçue localement à une cible. Plus la valeur d'une particule de transfert d'énergie linéaire est élevée, plus la quantité de dommages que la particule pourrait potentiellement causer à la cible est importante. La radiothérapie basée sur l'utilisation de rayons X ou γ est considérée comme étant de bas transfert d'énergie (low - LET) alors que les radiations avec des neutrons, des protons, ... ont des LET élevés (high - LET). La valeur de démarcation entre faible et élevé est au alentour de 10 keV/ μm . En fonction du LET, les mécanismes radiobiologiques associés seront différents ainsi que la capacité de pénétration dans les tissus des rayonnements mise en œuvre [95] (figure 15).

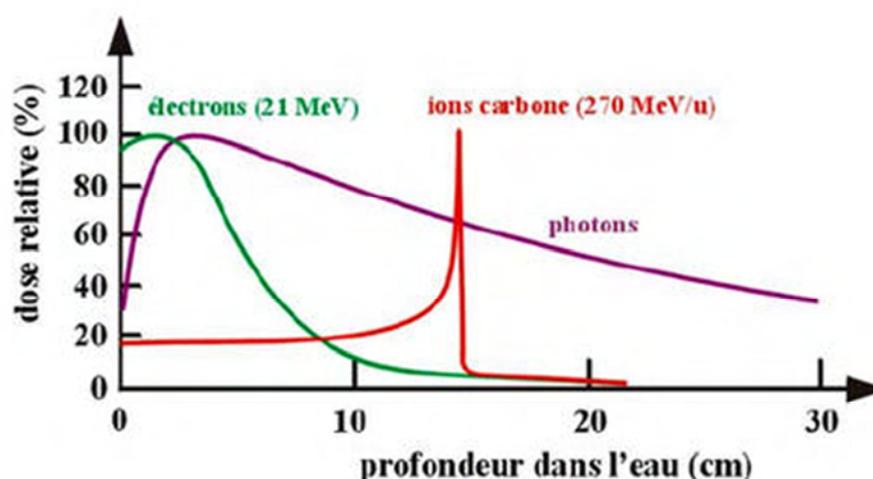


Figure 15 : Pénétration de différents rayonnements. Adapté de [95].

Il existe deux grandes classes de radiothérapie, la RT interne ou externe. Dans le cadre de la RT interne, il s'agit dans la majorité des cas de la curiethérapie (appelée aussi brachythérapie). Elle est principalement utilisée dans le cadre du traitement du cancer de la prostate ou des cancers gynécologiques (tumeur du col de l'utérus) [96, 97]. La curiethérapie

repose sur l'implantation de sources radioactives directement contre la tumeur (endocavitaire) ou dans la tumeur (interstitielle). Les isotopes radioactifs classiquement utilisés sont le césium 137 ou l'iode 125 implanté sous forme de billes ou de petits fils. Cela permet de délivrer lentement une dose importante de radiation à la tumeur [98]. Une autre possibilité pour obtenir une irradiation interne est la radio immunothérapie. Cette technique utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre la tumeur sur lesquels sont fixés des isotopes radioactifs [99]. Ce type d'approches permet de limiter et de cibler des tumeurs disséminées dans l'organisme [99]. Il permet, par exemple, d'obtenir de bonne réponse thérapeutique dans le traitement du lymphome non hodgkinien [100, 101].

Dans le cas de la RT externe, les faisceaux sont émis la plupart du temps par un accélérateur et vont traverser la peau pour atteindre la tumeur à traiter. La RT la plus utilisée est la radiothérapie conformationnelle 3D (trois dimensions). Cette technique permet de faire correspondre le plus précisément possible (de conformer) le volume sur lequel vont être dirigés les rayons et le volume de la tumeur. Elle utilise des images en 3D de la tumeur et des organes avoisinants obtenues par scanner, parfois associées à d'autres examens d'imagerie (IRM, TEP...). Des logiciels permettent de simuler virtuellement, toujours en 3D, la forme des faisceaux d'irradiation et la distribution des doses. Cela permet de délivrer des doses efficaces de rayons en réduisant de plus de 50% l'exposition des tissus sains aux rayonnements [102].

Un autre type de radiothérapie permet de délivrer des doses très localisées, il s'agit de la RT stéréotaxique. La machine utilisée est appelée *gamma knife*, et permet de focaliser les rayons gamma de manière précise au sein de la tumeur. Le CyberKnife® utilise ce système couplé à un système d'imagerie, le tout robotisé pour assurer une précision de traitement. Cette approche permet de traiter des tumeurs localisées dans des zones à risque qui sont inopérables et pour lesquelles la RT classique présente trop de risques (comme la moelle épinière) [103].

La RT utilisant des énergies de transfert élevées est encore peu développée en France. La protonthérapie, ou l'hadronthérapie permettent des traitements extrêmement précis. L'avantage est principalement balistique avec une distribution de l'énergie quasi uniquement en profondeur et une moindre dépendance à la présence d'oxygène [104]. Ce type de traitement peut être proposé dans le cadre de tumeurs résistantes à la RT classique, l'efficacité de la protonthérapie étant prouvée dans de nombreux types de cancer comme la prostate, les gliomes ou le foie [105].

3. Mécanismes d'action

L'irradiation d'une population de cellules produit une cascade d'évènements physiques, biochimiques puis biologiques. Dans un premier temps, il va y avoir une phase d'interaction entre les atomes des tissus biologiques et les radiations par transfert d'énergie (ionisation), entraînant une action directe et indirecte des rayonnements [95].

Dans le cas de l'action directe, il s'agit de l'ionisation/excitation directe des biomolécules parmi lesquelles l'ADN, cible principale de la RT, ce qui va conduire à la mort cellulaire. Ce mécanisme n'est pas prépondérant dans la mort cellulaire induite par RT classique, contrairement à la radiothérapie à haut transfert d'énergie (dont c'est le mécanisme d'action principal) [95].

Pour l'action indirecte, les radiations vont interagir avec la molécule la plus représentée dans l'organisme : l'eau et entraîne sa radiolyse, ce qui conduit à la formation, au sein de la cellule, d'un nombre très important de radicaux libres. C'est le mécanisme majoritaire dans le cadre des lésions radio-induites par RT de faible transfert d'énergie. La radiolyse fait intervenir un certain nombre de transformations qui vont aboutir à la formation de H_2O_2 , de radical OH, de $O_2^{\cdot-}$, ... Le taux d'oxygène en présence est important et conditionne la formation des molécules particulièrement oxydantes. L'ensemble de ces ROS vont provoquer des dommages à l'ADN [95].

Les principaux dommages induits à l'ADN sont [95]:

- Dommages de bases ou sucres
- Cassures de l'ADN simple brin
- Cassures de l'ADN double brin
- Pontages de l'ADN

Une irradiation de cellules avec 1 Gy provoque [95]:

- 1000 à 2000 lésions de base
- environ 200 pontages
- 500 à 1000 lésions simples brin
- environ 40 lésions double brin.

La réponse d'un tissu aux radiations ionisantes fait intervenir la règle des 4R. Le premier mécanisme est la **R**éparation de l'ADN. Puis intervient la phase de la **R**edistribution dans le cycle cellulaire puis la phase de **R**epopulation et pour finir de **R**éoxygénation.

La réparation de l'ADN est une phase critique en réponse à la RT. Elle va permettre d'orienter le devenir de la cellule (figure 16). La plupart de ces dommages peuvent être réparés par la cellule puisque seulement 1 à 2% de ces cassures double brin sont d'emblée létales. De nombreux gènes sont requis pour la détection des dommages de l'ADN (ATM¹, ATR², RAD1,...), détection qui va permettre à la cellule d'induire un arrêt du cycle cellulaire *via* la régulation des cyclines (cycline p21, p27, p16) lors des checkpoints du cycle [106]. Le gène p53 possède une place importante dans la mise en place de ces mécanismes, la mutation de ce gène étant alors un facteur de radiorésistance important. La décision pour la cellule d'entrer en apoptose plutôt qu'un arrêt du cycle cellulaire est largement dépendante de l'ampleur des dommages.

La réparation de l'ADN est primordiale pour préserver l'intégrité du génome. Les dommages radio-induits de l'ADN, directs ou indirects, vont induire la mise en place de mécanismes de réparation. Le mécanisme principal est la recombinaison non homologue (NHEJ) qui est initiée par une kinase appelé DNA-PK³ [107]. Ce type de réparation ne présente pas un haut degré de fidélité de réparation. Ainsi, en cas de réparation infidèle, il y aura une accumulation de mutations pouvant conduire dans le cas d'une cellule saine à une carcinogénèse [108, 109]. Dans le cas où la réparation de l'ADN est impossible, il y aura déclenchement de l'apoptose intrinsèque, même si l'apoptose n'est pas la mort prédominante suite à traitement par RT [110]. Les dommages persistants dans l'ADN peuvent conduire à des problèmes de mésappariement des chromosomes intervenant lors de la division cellulaire, ce qui déclenche une catastrophe mitotique, en général 2 ou 3 cycles après la RT [106]. La figure 16 récapitule l'ensemble de ces évènements.

¹ Ataxia Telangiectasia Mutated

² Ataxia Telangiectasia Rad3

³ Protéine Kinase dépendante de l'ADN

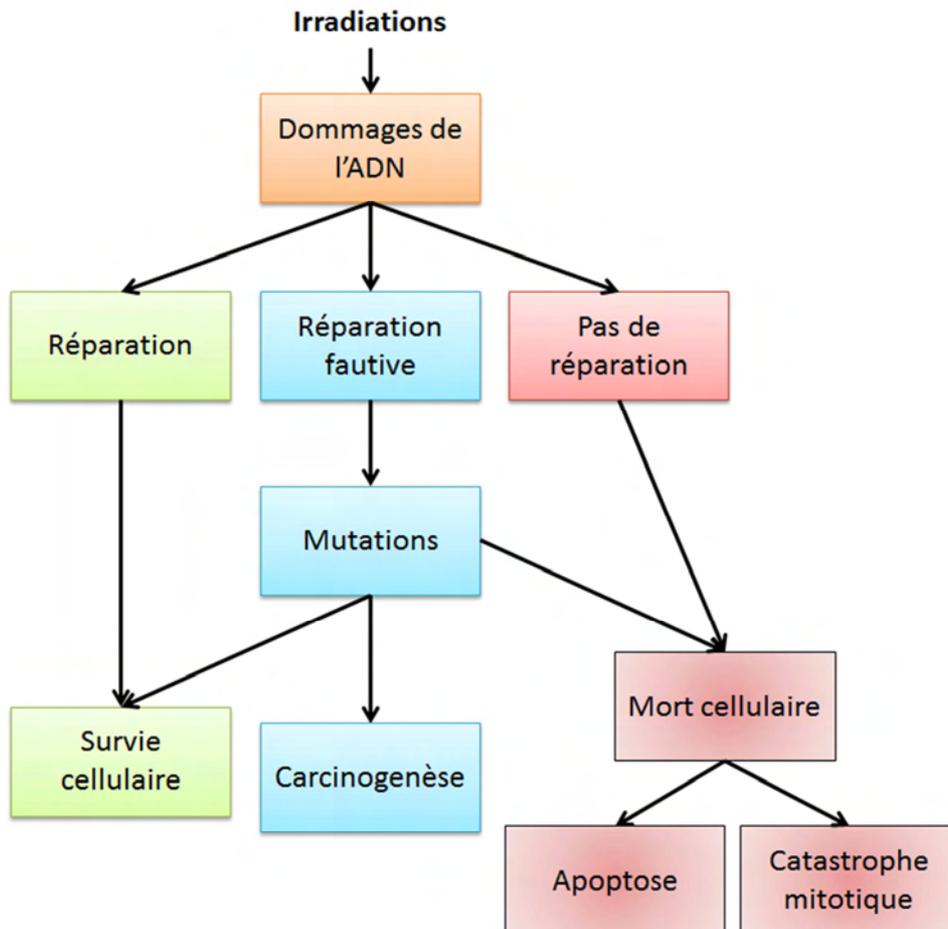


Figure 16 : Dommages à l'ADN induits par la radiothérapie [111].

Parallèlement à la mise en place de la réparation, il y a une réponse cellulaire globale par l'expression de gènes en réponse à la RT. De nombreux facteurs de transcription sont activés après RT, par exemple p53, HIF-1 ou encore NF- κ B [11]. Ces changements d'expression génique conduisent à la production de facteurs de croissance ou encore à la synthèse de TNF α et de VEGF [112]. L'ensemble de ces molécules sera impliqué dans la radiosensibilité ou radiorésistance de la tumeur.

La communication intercellulaire *via* les facteurs diffusibles va permettre la transmission de signal de mort entraînant une réponse de type bystander. Une définition de l'effet bystander est « une cellule répond à la RT alors que c'est la cellule voisine qui a été irradiée » [113, 114]. Cet effet bystander dépend de la dose de RT et permet la propagation du signal de mort dans un nombre important de cellules avoisinantes. Les cytokines (IL6, IL8) produites par les cellules irradiées présentent un rôle important ainsi que le TGF β et les ROS/RNS présents qui vont attaquer les cellules voisines [113, 114]. Il est important de

prendre en compte cet effet pour améliorer l'efficacité de la RT ou pour prévenir des dégâts aux tissus sains.

Le second mécanisme de réponse à la RT est la redistribution cellulaire. La sensibilité aux radiations selon les différentes phases du cycle cellulaire ne sont pas les mêmes (figure 17). Les cellules en phase S sont plus résistantes aux radiations, leur ADN étant moins exposé, la phase la plus radiosensible étant la phase G2/M [115]. La progression dans le cycle cellulaire des cellules survivantes aux radiations va permettre lors de la fraction de RT suivante de cibler les cellules initialement en phase radiorésistante S qui sont dans une autre phase du cycle. Les tumeurs à prolifération rapide présentent une plus grande radiorésistance, le nombre de cellules en phase S à chaque irradiation étant plus important [108].

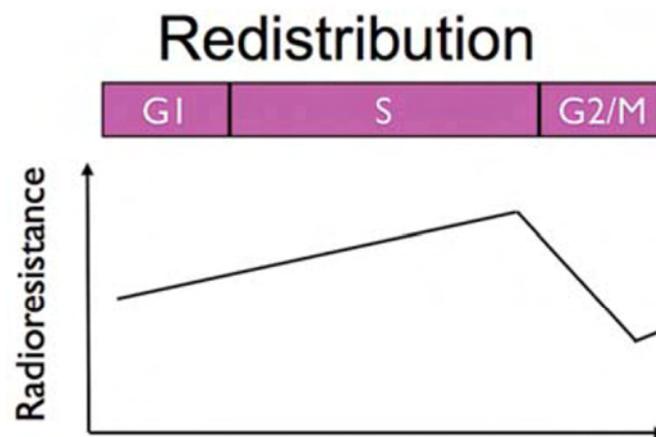


Figure 17 : Sensibilité des cellules à la RT en fonction des phases du cycle cellulaire [111].

La repopulation tumorale est un des facteurs majeurs d'échec de la radiothérapie. L'intérêt de fractionner le traitement de RT en multiples doses, en général une fraction par jour, cinq jours par semaine est de permettre aux tissus sains touchés par les radiations de se régénérer. Les cellules irradiées présentent une prolifération tumorale plus rapide par rapport aux cellules non touchées. Ce phénomène semble être lié à une activation accrue de la voie de l'EGF-R post RT qui est impliquée dans la prolifération cellulaire [111].

Le dernier paramètre est la réoxygénation tumorale. L'hypoxie est un facteur important de radiorésistance, les cellules hypoxiques présentant une résistance 2 à 3 fois supérieure aux cellules en condition de normoxie [111]. L'hypoxie tumorale est un facteur pronostic de la réponse à la RT. Après chaque fraction de RT, il y a une réoxygénation

tumorale qui est la conséquence de la réduction de la pression intra tumorale et la normalisation de la vascularisation (figure 18). Cet effet conduit à la radio sensibilisation des zones hypoxiques pour la fraction de RT suivante et finalement à la réduction de la masse tumorale [111].

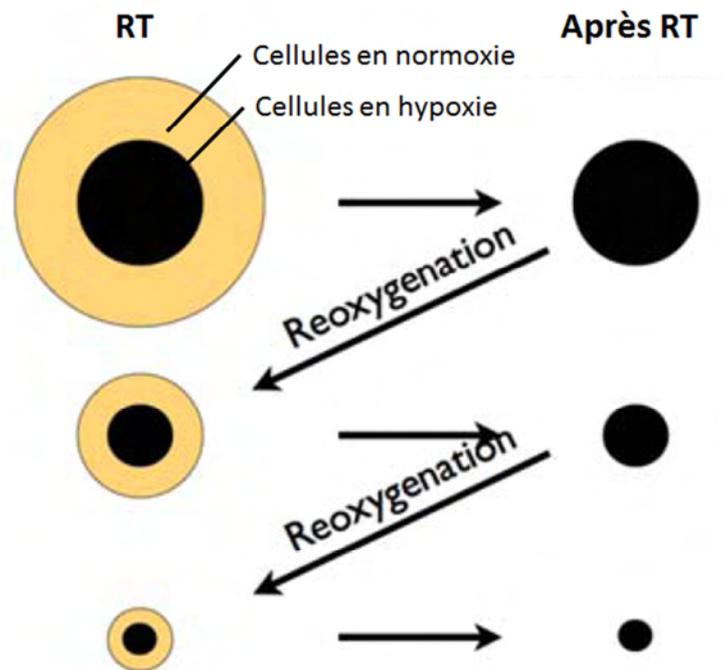


Figure 18 : Réoxygénation tumorale post RT [111].

4. Les associations chimioradiothérapie

L'utilisation de la RT seule présentant pour certains types de cancer une faible efficacité, une association chimiothérapie et radiothérapie est proposée pour augmenter et/ou potentialiser ces effets [116, 117]. C'est le cas du traitement des glioblastomes qui associe le témozolomide (un agent alkylant de l'ADN) et la RT. L'objectif de ce type d'association est d'augmenter la radiosensibilité tumorale (figure 19) [118]. Des essais cliniques évaluent l'intérêt de l'association de certaines chimiothérapies avec la RT, par exemple les inhibiteurs de l'EGF-R [119]. Le rationnel de cette association repose sur le fait que certains patients atteints de gliome malin avec amplification de l'EGF-R présentent une moins bonne réponse à la radiothérapie [120]. L'hypoxie étant un facteur de radiorésistance importante, la sensibilisation tumorale par un accroissement de la quantité d'oxygène dans la tumeur est une possibilité qui est largement étudiée avec l'utilisation d'agents anti angiogéniques qui permettent, *via* la normalisation de la vascularisation, une diminution de l'hypoxie [121].

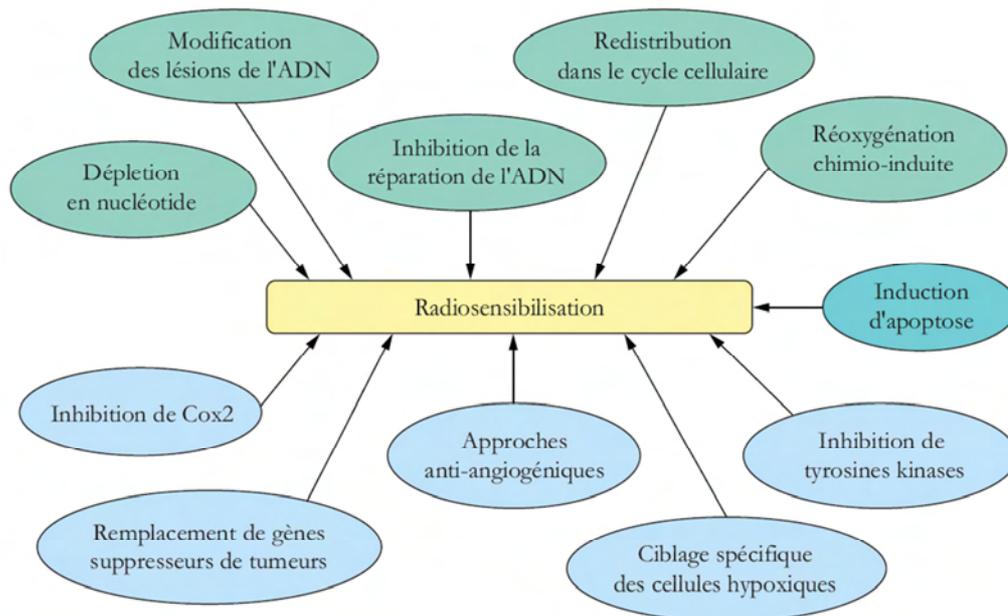


Figure 19 : Les possibilités d'associations pour augmenter l'efficacité de la RT [118].

D. Place des ROS dans les stratégies thérapeutiques

Les ROS présentent une grande importance dans l'effet anti-tumoral induit par les traitements *in situ* comme la radiothérapie ou la thérapie photodynamique. C'est sur la génération de ROS au sein des cellules ou à proximité de la tumeur que reposent les principaux mécanismes d'action de ces stratégies. Dans cette partie nous allons aborder le rôle des ROS dans les cellules.

1. Généralités

Les ROS sont présents de manière naturelle dans la cellule, en particulier l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène, ou encore le radical hydroxyl. Ils sont générés par le métabolisme aérobie des cellules et participent à la régulation de la signalisation cellulaire [122]. Une quantité excessive de ROS peut conduire à des effets toxiques pour la cellule, commençant par des phénomènes d'oxydation qui déstabiliseront l'intégrité cellulaire et pourront conduire à la mort cellulaire [123]. Les ROS peuvent être générées dans de nombreux compartiments cellulaires et par différentes enzymes. C'est le cas de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, du cytochrome p450, de

cyclooxygénases, de la NADPH oxydase au niveau membranaire, ou encore des peroxyosomes [124]. Les ROS sont produits principalement pendant les étapes de transfert d'électrons pour la génération d'ATP, à partir du métabolisme de l'oxygène comme le $O_2^{\cdot-}$ [125]. Le taux de ROS intracellulaires est maintenu par une balance redox, le ratio entre les espèces oxydantes et réductrices jouant un rôle majeur dans la signalisation. Cette balance est maintenue par des systèmes enzymatiques qui neutralisent les espèces oxydantes. Le $O_2^{\cdot-}$ est converti en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD) qui pourra ensuite être transformé par la glutathion oxydase (GSH) ou la catalase [125]. L'ensemble de ces systèmes de défense jouent un rôle majeur dans la protection des cellules vis-à-vis d'un excès de ROS.

2. La place des ROS dans la carcinogénèse

Les ROS possèdent un rôle non négligeable dans la carcinogénèse. En effet, ils peuvent conduire à des dommages de l'ADN et participent ainsi à la transformation maligne. Ils ont été considérés à ce titre comme une classe endogène de carcinogènes [126]. Les ROS sont impliqués dans les premières phases du développement tumoral, avec l'initiation, la promotion et la progression des cellules tumorales [127]. Les ROS et plus particulièrement le H_2O_2 peuvent intervenir dans un grand nombre des caractéristiques des cellules tumorales (développée dans la partie I de ce chapitre). Il est admis que les ROS peuvent induire des dommages à l'ADN, des mutations et une instabilité génomique [128, 129]. Ils sont capables de stimuler la prolifération cellulaire [130], interviennent dans la résistance à l'apoptose [131], augmentent l'angiogénèse [132] et peuvent intervenir dans la migration et l'invasion des cellules [133]. En parallèle, il est prouvé que l'augmentation de la quantité d'enzyme détoxifiantes permet de diminuer l'ensemble de ces phénomènes [122]. Les ROS interviennent dans ces paramètres *via* leurs rôles dans la signalisation cellulaire. En effet, le H_2O_2 est, par exemple, capable d'activer le facteur de transcription HIF-1 [134, 135] (figure 20). Ce facteur joue un rôle majeur dans l'hypoxie et dans la mise en place de l'angiogénèse. D'autres voies peuvent être stimulées par les ROS comme la voie de l'EGF-R. Ainsi, le H_2O_2 va diminuer l'activité de PTEN qui est impliqué dans la régulation négative de la voie de l'EGF-R [136].

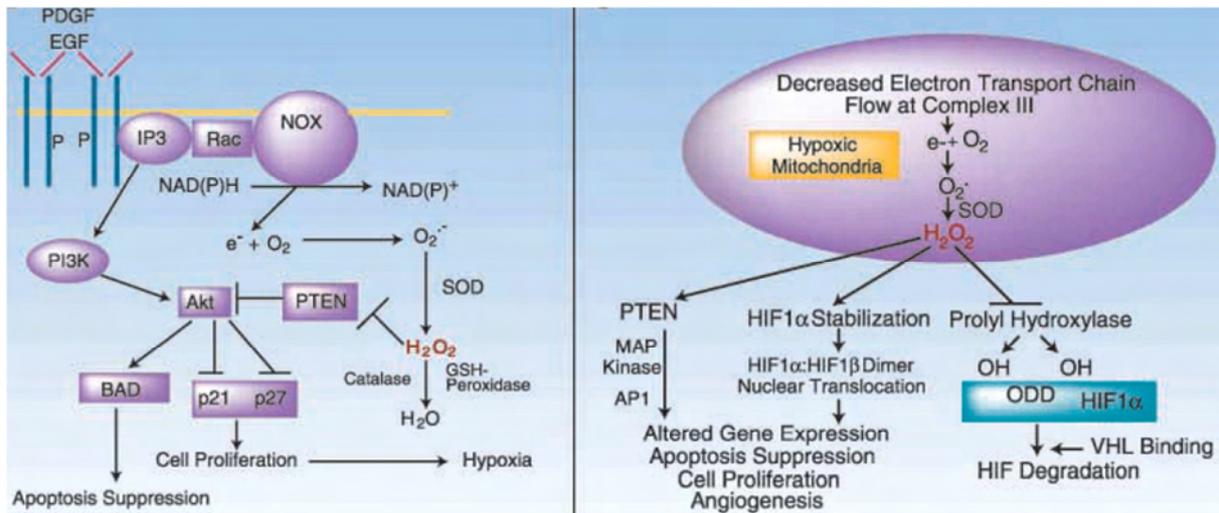


Figure 20 : Influence des ROS sur la voie de l'EGF-R (à gauche) et sur l'activation du facteur de transcription HIF-1 (à droite) [123]

3. La modulation des ROS comme stratégie thérapeutique

Avec le rôle des ROS dans les phénomènes de cancérisation et le maintien des caractéristiques des cellules tumorales, plusieurs approches sont possibles. Il est possible de diminuer le taux de ROS présent dans les cellules en augmentant la séquestration de ceux-ci. L'autre solution est d'augmenter de manière significative le nombre de ROS dans la cellule pour induire des phénomènes létaux et conduire à la mort cellulaire [122]. C'est finalement ce type d'approche qui est utilisé dans le cadre du traitement par RT ou par PDT.

Le rôle paradoxal des ROS est que les faibles doses participent à la progression tumorale alors que des doses plus élevées peuvent induire l'apoptose des cellules [127] (figure 21).

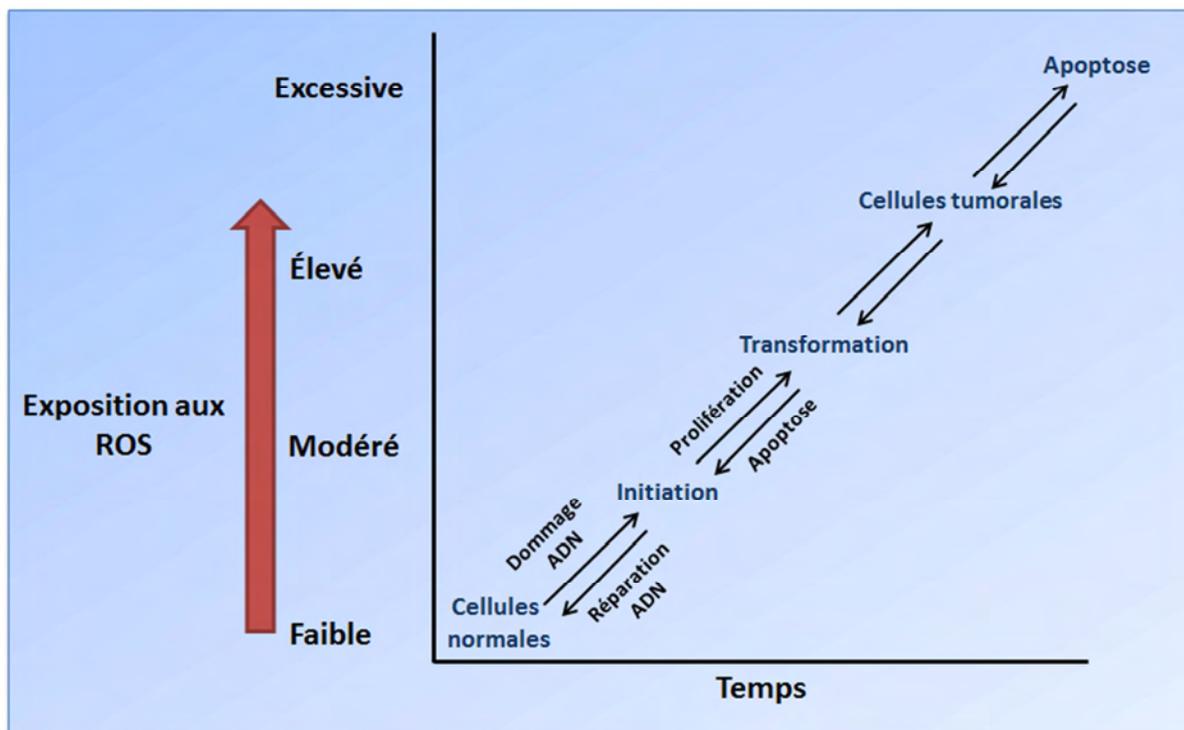


Figure 21 : Effets de l'exposition des cellules aux ROS [123].

Cette apoptose est observée à la fois *in vitro* mais également *in vivo* sur diverses lignées cellulaires [122]. Ces ROS particulièrement oxydants vont induire un nombre important de cassures de l'ADN provoquant un arrêt du cycle cellulaire [137], associé à une diminution de la cycline D et une accumulation de p21 [138]. En parallèle, les ROS vont provoquer une perméabilité transitoire des pores mitochondriaux, ce qui permet le relargage des facteurs pro apoptotiques [122, 139]. L'ensemble des données sur les conséquences des ROS et principalement du H_2O_2 suggèrent que l'augmentation de la concentration intracellulaire semble prometteuse pour lutter contre ces cellules. Le H_2O_2 est capable de diffuser librement dans les cellules [138], ce qui signifie qu'il pourrait atteindre les cellules saines ou tumorales. Cependant les cellules en état stationnaire (en G0) sont intrinsèquement résistantes à des taux élevés de ROS, tandis que les cellules se divisant rapidement y sont sensibles parce que leur ADN est décompacté et donc plus facilement accessible aux dommages oxydatifs [138]. Dans ce contexte, des thérapies *in situ* basées sur la génération de ROS ont été développées, il s'agit de « l'oxydation therapy ». L'injection dans la tumeur ou la circulation de ROS tels que le H_2O_2 s'est révélée très inefficace, les ROS étant en grande partie dégradés par l'activité catalase présente dans les érythrocytes [140, 141]. Pour contrer cela, des systèmes enzymatiques générant des ROS ont été développés, comme par exemple la glucose oxydase

(GO) qui génère une quantité importante de H₂O₂ [125]. D'autres systèmes, comme la xanthine oxydase (XO) permet de générer une quantité importante de O₂^{•-}. L'ensemble de ces systèmes a montré des résultats intéressants sur des modèles *in vivo* mais présentent des effets indésirables systémiques [125]. L'évaluation de nouveaux systèmes de génération est en cours (PEG-XO ou PEG-DAO). Ces stratégies permettent de limiter les effets secondaires mais pour le moment aucune n'a été évaluée chez l'homme [142].

4. Le point sur les RNS

Les « *reactive nitrogen species (RNS)* » participent également à la signalisation cellulaire et dans de nombreux processus comme l'angiogenèse avec le NO. Comme pour les ROS, un excès de RNS peut induire l'apoptose des cellules tumorales *via* un arrêt du cycle cellulaire [143]. Les RNS agissent en partie au niveau intracellulaire en y augmentant la production de H₂O₂, expliquant en partie les mécanismes communs observés [143].

Le NO possède un rôle important dans le développement tumoral [144], car il intervient dans la prolifération, la résistance à l'apoptose, l'invasion ou encore l'angiogenèse [144]. Des stratégies thérapeutiques visant à moduler les RNS sont développées, soit pour en réduire la concentration soit pour l'augmenter.

III. Conclusions

Le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques reposent désormais sur la meilleure compréhension de la biologie des tumeurs avec leurs grandes caractéristiques. Les thérapies les plus performantes comme la radiothérapie reposent sur la génération de ROS qui vont cibler un nombre important de ces caractéristiques pour conduire finalement à la mort cellulaire. Cette génération de ROS semble être une stratégie qui fait ses preuves mais le mode d'action étant assez large, les effets secondaires peuvent être importants. C'est un des défis majeurs de la RT, qui vise à irradier de manière de plus en plus précise la tumeur pour préserver les tissus sains alentours. C'est également sur cette stratégie que repose la PDT, certes le photosensibilisant est systémique mais l'excitation locale permet de réduire au maximum la toxicité. Dans ce contexte, le développement de stratégies permettant de générer une grande variété de ROS dans une zone bien limitée semble une approche qui paraît *a priori* prometteuse.

Chapitre 2 : Recherche préclinique et utilisation de l'imagerie de Bioluminescence

I. La recherche préclinique en oncologie

La découverte et le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses s'appuient sur une connaissance accrue de la biologie des cancers, en particulier pour les thérapies ciblées. Ce développement repose par la suite sur une évaluation de l'activité sur des modèles *in vitro* et *in vivo* qui doivent être prédictifs de la réponse chez l'homme. Cette recherche translationnelle se base sur des données acquises *in vitro* puis *in vivo* pour converger vers les essais cliniques chez l'homme et dans le meilleur des cas, aboutir à un nouveau standard pour le patient (figure 22).

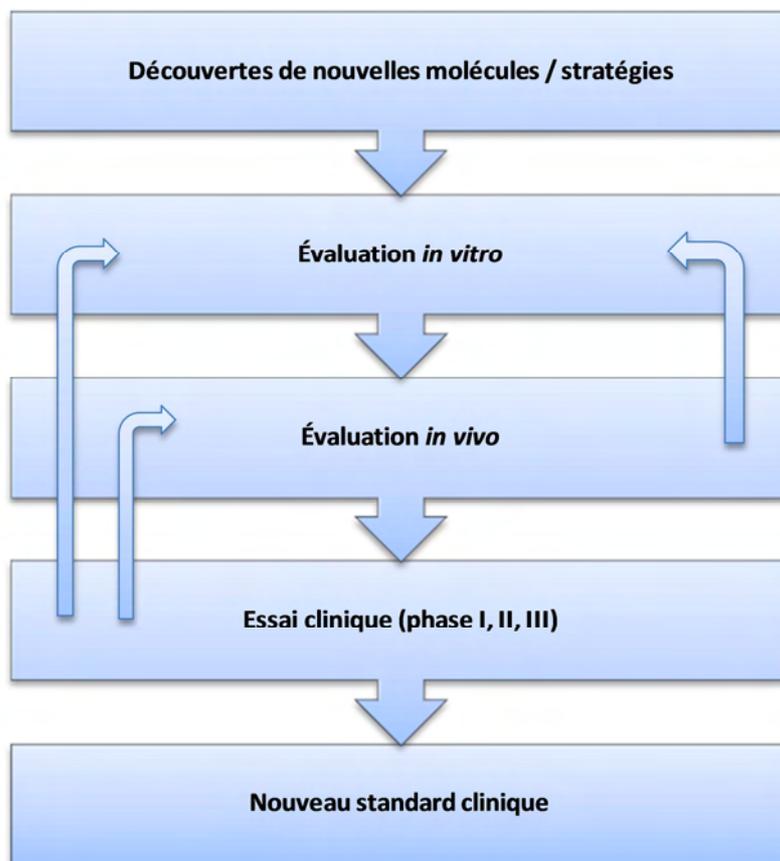


Figure 22 Organisation de la recherche translationnelle pour l'évaluation de nouvelles stratégies anti-tumorales, des modèles expérimentaux à l'homme

La recherche préclinique en oncologie a connu ses débuts dans les années 1950 avec l'utilisation des premiers modèles précliniques puis s'est développée sous l'impulsion du NCI en 1970 (National Cancer Institute) qui imposa dans ses plates-formes d'évaluation des nouvelles molécules, l'utilisation de trois types tumoraux humains différents greffés en sous cutané chez la souris.

A. Généralités

Le seul modèle qui reste pertinent vis-à-vis de l'homme et de sa tumeur reste l'homme lui-même. En considérant les questions éthiques évidentes, l'évaluation des nouvelles thérapies et la compréhension des mécanismes biologiques doivent être obtenues à partir des modèles animaux. Ces essais sur animaux correspondent à l'étape de preuve de concept pour les molécules qui seront testées en essai clinique de phase I et II. Une des étapes clés de ce processus préclinique est d'utiliser un modèle pertinent tout en tenant compte de la réalité clinique. Un manque de réalité clinique conduit à un manque de prédictibilité important et à une extrapolation délicate des résultats obtenus *in vivo* à l'homme. Un nombre important de nouvelles molécules a montré des effets remarquables sur les modèles animaux, suivi d'un échec indiscutable lors des essais cliniques avec peu ou pas d'effet bénéfique sur la survie [145]. Un exemple récent de ce type d'échec est l'utilisation d'un anti-angiogénique, l'endostatine. Cette molécule a montré une activité anti-tumorale importante sur trois lignées tumorales différentes greffées en sous cutané chez la souris avec une régression totale des tumeurs et une absence de reprise [146]. Ces résultats ont conduit aux essais cliniques chez l'homme. La molécule n'a montrée aucune toxicité particulière mais aucun bénéfice sur le patient n'a été observé [147]. Pour tenir compte de la réalité clinique, l'évaluation préclinique doit prendre en compte les spécificités tumorales, la dose appliquée, le schéma d'administration et la méthode d'évaluation de la réponse [148].

B. Les variables importantes en expérimentation préclinique

1. L'espèce animale

Les modèles spontanés ou les tumeurs transplantées de souris peuvent être étudiés sur des animaux immunocompétents tandis que les tumeurs humaines doivent être xéno greffées chez des souris immunodéprimées pour éviter le rejet du tissu. Les modèles spontanés de

tumeurs chez la souris peuvent être obtenus avec des agents carcinogènes et présentent les avantages d'avoir une diversité génétique importante, une croissance dans le microenvironnement normal, et une angiogenèse ressemblant à la situation clinique [149]. Ce type de modèle est difficile à obtenir et à maintenir.

Les souris génétiquement modifiées qui développent spontanément des tumeurs spécifiques représente une alternative à ce type de souris [150].

Concernant les xénogreffes de tumeurs humaines, ce type de d'approche a permis une avancée importante dans l'évaluation préclinique des anticancéreux. L'avantage incontestable est que la tumeur est d'origine humaine, que la plupart de ces modèles présentent une reproductibilité importante, et qu'une grande variété de lignées tumorales est disponible. Cela signifie qu'il existe un nombre important de données concernant la réponse de la tumeur envers un ensemble de chimiothérapies. L'inconvénient majeur est que ce type de modèle présente un système immunitaire déficient et que les cellules tumorales vont se développer en présence d'un stroma murin [148]. Ce dernier point est particulièrement important lors de l'évaluation d'agent anti-tumoral ciblant l'angiogenèse. En effet, la tumeur humaine xenogreffée a la capacité de générer une néovascularisation chez la souris par l'intermédiaire de facteurs pro-angiogéniques d'origine tumorale [151]. Le réseau vasculaire et le stroma de support à la tumeur sont d'origine murine alors que le parenchyme est d'origine humaine. L'apport en oxygène au sein de la tumeur dépend également des hématies d'origine murine dont la physiologie n'est pas la même que celle des hématies humaines, en particulier la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. La physiologie de la souris variant de celle de l'homme peut traduire un métabolisme différent du produit évalué. La prise de greffe chez les souris *nude* est relativement importante, cependant il arrive que les transplantations ne donnent pas lieu à une croissance tumorale et les métastases représentatives sont rares [152]. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence d'une immunité résiduelle, en particulier la présence de lymphocyte T résiduelle qui peut expliquer ces rejets. Par ailleurs, les taux de lymphocyte B, de Natural Killer (NK) et de macrophages sont décrits pour être parfois plus élevés en comparaison à ceux de souris de même souche non immunodéficientes [153]. Pour résoudre ce problème, la souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) peut être utilisée, elle présente un déficit combiné sévère avec un défaut de fonction à la fois des lymphocytes T mais également des lymphocytes B. Plusieurs études ont montré un meilleur taux de prise de greffe avec ce type de souris [153, 154]. Des souches de souris SCID présentant des déficiences encore plus profondes sont disponibles aujourd'hui (par exemple souris NSG) et des souris humanisées sont envisagées pour résoudre ce problème de

compatibilité interspèces [155, 156]. L'utilisation en oncologie préclinique d'autres espèces est plus rare, la souris étant la plus utilisée. Le rat peut également être mis en œuvre, en particulier pour les modèles de tumeurs spontanées ou chimio-induites. Par contre, les rats immunodéprimés présentent une faible prise de greffe et nécessitent des irradiations massives pour travailler avec des xénogreffes humaines [148, 157].

2. Le type de tumeur

Le choix de la tumeur cible doit être adapté à la stratégie évaluée. En général, les lignées dérivant directement de biopsies (culture primaire) de patients présentent et conservent des caractéristiques moléculaires et histologiques plus proches de celles observées en clinique [158], de plus elles peuvent conserver une histologie proche à celle de la tumeur d'origine du patient d'un passage à l'autre chez la souris (figure 23). Les tumeurs provenant de lignées, présentent à l'histologie un aspect cellulaire homogène et très indifférencié avec des pertes importantes des caractéristiques tumorales (mutations, récepteurs...), ce qui est probablement liées à la pression de sélection appliquée lors de la culture des cellules *in vitro*. Cependant ce type de lignées reste très utilisé pour sa facilité de mise en œuvre et l'important recul que l'on possède sur leur utilisation. De plus, il apparaît que pour les xénogreffes de lignées et celles dérivant de biopsies (culture primaire), une prédictivité équivalente est observée [158].

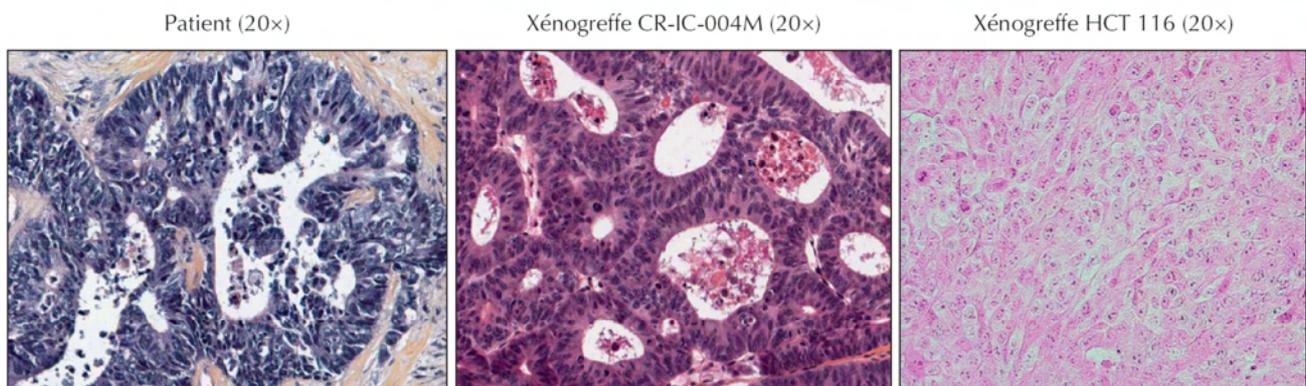


Figure 23 : Maintien de la structure histologique entre la tumeur du patient (à gauche) et sa xénogreffe après huit passages (au centre), en comparaison avec une xénogreffe de lignée de cellules tumorales colique (à droite). Adapté de [157]

Avec le développement des stratégies ciblées visant une dérégulation cellulaire particulière, le choix de la lignée est également devenu un paramètre important. Par exemple, la réponse aux inhibiteurs de l'EGF-R présente d'importantes disparités en fonction des lignées utilisées *in vitro* et *in vivo* [159]. Les niveaux d'expression de l'EGF-R et de HER-2 sont différents entre les lignées cellulaires utilisées et sont corrélés à l'activité de l'inhibiteur. Les études montrent que la réponse aux anti-EGFR dépend du niveau d'expression du récepteur et des mutations affectant la voie de signalisation sous jacente (par exemple PTEN) [160]. Ces données sont également retrouvées en clinique, la présence de mutations étant corrélée à la réponse individuelle aux anti-EGFR [161, 162].

Ceci démontre l'importance d'utiliser, en première approche, plusieurs lignées différentes avec des profils mutationnels distincts. L'utilisation de ces lignées peut permettre une compréhension des mécanismes d'action et permettra de ne pas surestimer la réponse à un agent en choisissant uniquement une lignée répondeuse [159].

3. Le site d'implantation

Le manque de prédictibilité peut également être lié au site d'implantation de la tumeur. La majorité des études *in vivo* sont réalisées avec des tumeurs sous cutanées alors que les modèles orthotopiques (implantation des cellules tumorales dans l'organe correspondant au site anatomique de la tumeur chez l'homme) sont plus prédictives et conduisent à une métastase plus importante de la tumeur [163]. La greffe sous cutanée permet une croissance rapide ainsi qu'un suivi facile de l'évolution tumorale, en revanche elle souffre d'une faible représentativité clinique en grande partie à cause de son développement sans contrainte et de sa vascularisation [163]. De plus, ce type de modèle conduit à l'obtention d'une tumeur localisée sans invasion, ce qui est en partie lié au développement d'une capsule fibreuse dense autour de la tumeur [164].

Les modèles orthotopiques présentent l'avantage d'être plus raffinés, la tumeur se développant dans le tissu d'origine de la tumeur primitive et ces modèles sont donc, avec le développement possible de métastases, beaucoup plus proches de la clinique [165]. La mise en œuvre de ce type de modèles est encore délicate, la chirurgie étant complexe, le nombre d'animaux, et donc au final la significativité, s'en retrouve diminuée. Le suivi de la croissance et de la réponse aux traitements est également plus compliquée, nécessitant la mise en place d'outils d'imagerie *in vivo* pour accéder à certains paramètres de la tumeur (volume,

métabolisme, biomarqueurs...) [165]. Les modèles disséminés souvent obtenus par injection de cellules en IV présentent également ces mêmes avantages, avec une bonne corrélation vis-à-vis de la clinique et sites d'implantations des métastases [165].

En première approche, l'évaluation de l'activité anti-tumorale dans un modèle sous cutané, facile à mettre en œuvre, est à privilégier avec dans un second temps une évaluation sur des modèles orthotopiques [165]. Cette double approche est nécessaire car même si l'effet des agents cytotoxiques a été décrite pour être généralement peu influencé par l'environnement tumoral [157], des études ont montrées des différences importantes de réponses liées en particulier à la vascularisation (flux sanguin et oxygénation) [164]. Par ailleurs, dans le cas de la réponse aux thérapies ciblées, celle-ci peut varier sensiblement selon une implantation orthotopique ou hétérotopique de la tumeur [166].

4. Le début du traitement

Dans le cadre du traitement de patients et encore plus dans le cadre des essais cliniques de phase I, les patients traités présentent en général une maladie avancée et hautement métastatique. Il est rare d'observer de petites tumeurs localisées, sans dissémination. Ce paramètre est important à considérer lors de l'évaluation de nouvelles stratégies. Si le traitement est débuté avant ou le jour même de la xénogreffe, il s'agit d'une étude d'inhibition de la croissance tumorale. Dans le cas où le traitement débute sur une tumeur établie avec une taille comprise entre 60 et 200 mm³, il s'agit de retard de croissance tumorale. Les données ont montré que ce type d'étude sur un modèle établi est bien plus prédictif des résultats chez l'homme [167]. Une taille de 60 mm³ lors du début du traitement peut encore engendrer des erreurs, il existe encore à ce stade de l'immunité résiduelle dont une importante activité des NK qui pourrait participer à la régressions complète de la tumeur [158]. Finalement, en lien avec la clinique, le traitement le plus proche des conditions clinique est un traitement débutant avec des tumeurs de 8-10 mm de diamètre, correspondant à un volume compris entre 256 et 500 mm³. Ce type de conditions est plus proche en taille mais également la capacité limitée de pénétration de la chimiothérapie dans la tumeur en raison de la présence de large plages de nécrose et d'hypoxie, ainsi que d'une mauvaise vascularisation [158]. Ce type d'études bien que plus représentatives n'est que rarement mené, à la fois pour donner une chance accrue à la molécule évaluée mais également pour des considérations éthiques pour l'animal. Un

traitement sur un volume important laisse supposer que le volume tumoral risque de dépasser les limites réglementaires au cours de l'étude [158].

5. La dose utilisée

Les doses utilisées en recherche préclinique sont un paramètre important pour obtenir une réponse qui pourra être extrapolée chez l'homme. Ces doses sont également à l'origine du manque de prédictibilité chez l'homme [67]. D'une manière générale, les doses maximales tolérées (DMT) chez la souris sont bien plus élevées que chez l'homme, les doses de chimiothérapie utilisées sont donc dans la majorité des cas 4 à 5 fois plus élevées que ce qui est potentiellement administrable en clinique [148]. Ces données signifient que la concentration du médicament dans le sang chez la souris est largement supérieure à ce qui est atteignable chez l'homme et peut conduire au final à de fausses réponses positives chez la souris. Des études ont ainsi comparé l'effet de chimiothérapies connues pour être actives ou non en clinique sur les pathologies tumorales données avec des modèles précliniques [168-171]. Ils ont évalué chez la souris l'efficacité tumorale de ces agents en utilisant la DMT ou en utilisant une dose équivalente à celle utilisée chez l'homme. Sur une large variété de tumeurs, incluant des tumeurs pulmonaires, cérébrales ou gastriques, un effet anti-tumoral important des agents testés a été observé en utilisant la DMT alors que cela ne correspond pas aux profils retrouvés en clinique, soulignant ainsi un taux très important de faux positifs. Avec des doses cliniques chez la souris, un profil d'activité similaire est retrouvé entre les études *in vivo* et les résultats chez l'homme [168-171].

Ces résultats mettent en avant l'importance du choix des doses pour l'évaluation préclinique des nouvelles thérapies.

6. Le Schéma d'administration

Le schéma d'administration est un paramètre de haute importance dans l'activité d'une molécule [172]. Ce paramètre est à considérer en fonction de contraintes cliniques ultérieures. Par exemple, la radiothérapie externe est administrée tous les jours, cinq jours par semaine dans le cadre du traitement de glioblastome. La plupart des études visant à évaluer les

associations chimiothérapie – radiothérapie ne tiennent pas compte de ce schéma de traitement et utilisent une seule fraction de radiothérapie. Tsai, *et coll.* ont étudié l'impact du fractionnement de la radiothérapie (1 fraction de 10 Gy vs. 5 fraction de 2 Gy) sur les profils d'expression génique de cellules de carcinome mammaire, de carcinome prostatique et de gliosarcome [173]. Les résultats obtenus montrent que le fractionnement de la radiothérapie non seulement diminue l'efficacité globale de l'irradiation, mais également conduit à un profil d'expression génique complètement différent du schéma d'irradiation unique. Une autre étude sur l'évaluation préclinique d'une association de la radiothérapie avec un inhibiteur du protéasome a montré que selon le protocole d'administration utilisé un effet radiosensibilisant pouvait être obtenu ou non [174].

C. Évaluation de l'activité anti-tumorale

Le choix du critère de réponse est un paramètre important. De manière courante, l'évaluation de l'activité antitumorale est réalisée, pour les tumeurs sous cutanées, par un suivi du volume tumoral mesuré au pied à coulisse [175]. Ce suivi dans le temps du volume tumoral permet de déterminer le retard de croissance tumorale, paramètre le plus utilisé dans la recherche préclinique en oncologie [159]. Un retard de croissance étant transposable en termes de bénéfice chez le patient, il est considéré comme un point d'évaluation pertinent mimant la progression de la maladie [165]. D'une manière strictement rigoureuse, pour appliquer ce critère de réponse, il faut que

- la masse de la tumeur soit directement proportionnelle au nombre de cellules ;
- les cellules atteintes par le traitement meurent rapidement
- et que les cellules restant vivantes reprennent un taux de prolifération identique aux cellules contrôle [165].

Beaucoup de thérapies, comme les radiations ionisantes ne tuent pas les cellules immédiatement mais ont un effet retardé après plusieurs générations cellulaires [165]. Dans ce cas, ce critère de réponse donne une information qui peut être imprécise sur la mort cellulaire [165].

Le délai de croissance tumorale est déterminé à partir de deux groupes expérimentaux, CTRL vs Traité, l'effectif de ses groupes dépendant de la variabilité. Les souris sont randomisées dans les groupes pour s'affranchir de l'hétérogénéité des tumeurs. Les

caractéristiques tumorales comme la vitesse de prolifération, l'hypoxie, l'angiogenèse et la réponse au traitement pouvant varier au cours du traitement, il est important de répartir les souris dans les groupes expérimentaux avec un volume tumoral équivalent. Le volume tumoral est suivi plusieurs fois par semaine sur chaque animal jusqu'à atteindre 2, 5 ou 10 fois le volume initial. Le délai de croissance tumorale est la différence du temps mis pour les tumeurs traitées à atteindre ce volume moins le temps mis pour les tumeurs contrôles à atteindre ce même volume (figure 24). Il est donc une mesure directe de l'effet du traitement sur la croissance.

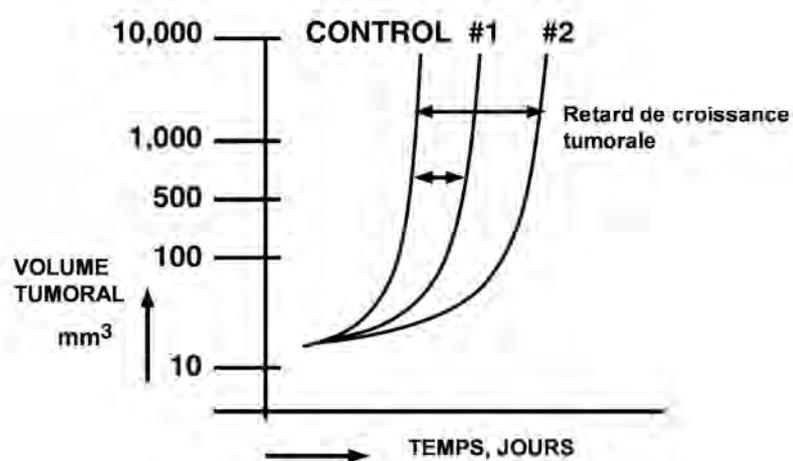


Figure 24 : Représentation du calcul de retard de croissance tumorale. Adapté de [165]

Il n'y a pas de consensus concernant le volume final à atteindre ; en fonction du mode d'action de la molécule et du volume de départ, il peut être adapté. Par exemple, pour les agents anti-prolifératifs testés sur des tumeurs à croissance rapide, un point final élevé apparaît préférable [159]. Ce point doit rester néanmoins conforme aux règles d'éthique. De multiples points peuvent être utilisés mais il est admis que plus le volume final est faible, meilleure est la prédictivité de l'efficacité de l'agent [176].

La réponse aux thérapies peut également être évaluée par l'inhibition de croissance qui est calculée comme le rapport du volume tumoral (ou poids tumoral, bioluminescence) du groupe traité versus le groupe témoin :

$$T/C = (\text{Volume tumoral du groupe traité au jour } x / \text{Volume tumoral du groupe témoin au jour } x) \times 100.$$

La valeur optimale correspond au T/C minimal qui reflète l'inhibition de croissance maximale [165]. Le niveau d'activité anti-tumorale est déterminé en accord avec les critères du NCI et permet de déterminer le niveau d'activité du composé :

- absence d'activité ($T/C > 42\%$),
- activité modérée ($10\% < T/C < 42\%$)
- activité forte ($T/C < 10\%$).

Une autre évaluation repose sur l'excision de la tumeur et des essais *ex vivo* pour déterminer la survie cellulaire après traitement [177]. Pour cela, à la suite du traitement, la tumeur est excisée, une suspension cellulaire est préparée et mise en culture. Après incubation, la fraction survivante de cellules peut être déterminée et comparée avec les tumeurs contrôle. Cet essai présente la limitation de faire pousser les cellules hors de l'environnement mais apporte un gain en terme de temps [177].

La survie globale des animaux permet également de définir l'activité d'une molécule, on parlera de gain de survie. Cette approche est valable pour les tumeurs hétérotopiques ou orthotopiques.

Dans le cadre des tumeurs orthotopiques, le suivi longitudinal et non invasif de la tumeur primitive mais également des métastases est facilité par les techniques d'imagerie *in vivo* qui permettent la détection des tumeurs, l'évaluation de la taille et la possibilité d'en connaître les caractéristiques en utilisant des marqueurs moléculaires adaptés. Des avancées technologiques majeures permettent désormais de mettre en œuvre, chez le petit animal (souris, rat) les mêmes modalités d'imageries que celles utilisées en routine en clinique (TEP, IRM, Scanner X...), avec d'excellentes performances en termes de résolutions spatiale et sensibilité [178].

D'autres outils principalement utilisés en recherche préclinique ont été développés et sont basés sur la détection de photons : on parle d'imagerie optique ou photonique. C'est le cas de l'imagerie de bioluminescence (BLI) qui permet la détection de photon émis par des cellules génétiquement modifiées après l'ajout d'un substrat [179]. Une autre modalité d'imagerie optique repose sur la détection de la fluorescence [180, 181]. L'utilisation de l'imagerie de fluorescence proche infrarouge (pour s'affranchir des problèmes d'absorption et d'auto fluorescence) permet la détection de cellules tumorales et permet la vérification en temps réel de la qualité d'exérèse de tumeurs [182]. Faisant suite à une injection intraveineuse d'un agent de contraste fluorescent dans le proche infrarouge, cette imagerie loco-régionale spécifique d'un biomarqueur tumoral (protéase du type cathepsine, intégrines ou antigène tumoral) conduit à une amélioration de la sensibilité et de la spécificité de la détection des foyers tumoraux [183, 184]. Dans ce type d'application, les modèles animaux ne répondent pas obligatoirement à la pertinence clinique physiopathologique mais ils sont représentatifs en termes de site d'implantation et de démarche thérapeutique. Par exemple, dans le cadre de

l'entraînement des chirurgiens pour la pratique d'un geste chirurgical délicat ou encore pour évaluer de nouvelles stratégies comme l'imagerie de fluorescence per opératoire qui dans ce cadre pourra être réalisé sur des tumeurs spontanées chez le gros animal comme le chien [185, 186]. En effet, la clinique vétérinaire est également une ressource dans la recherche préclinique et est confrontée à divers types animaux comme le furet (de la même famille que le blaireau), ce qui permet d'évaluer et de tester la mise en œuvre de protocoles de traitements innovants [187].

II. L'imagerie de Bioluminescence

A. Principes

Le principe de la bioluminescence repose sur la détection de l'émission de photons par un organisme vivant avec une caméra CCD de haute sensibilité. Cette émission de photons est sous la dépendance de la luciférase, enzyme qui en oxydant un substrat, va permettre l'émission de photons. La bioluminescence provenant de la luciole nord américaine est la plus utilisée (*Phototinus Pyralis*). Le gène luciférase (*luc*) de la luciole va produire l'enzyme qui va convertir la D-luciférine, par une série de réactions, en oxyluciférine qui est non réactive en émettant des photons à 562 nm (figure 25). Un autre gène (*luc*) provenant d'une anémone de mer (*Renilla Eemiformis*) peut être utilisé avec un substrat différent (la coelenterazine) et permet l'émission de photons à 482 nm.

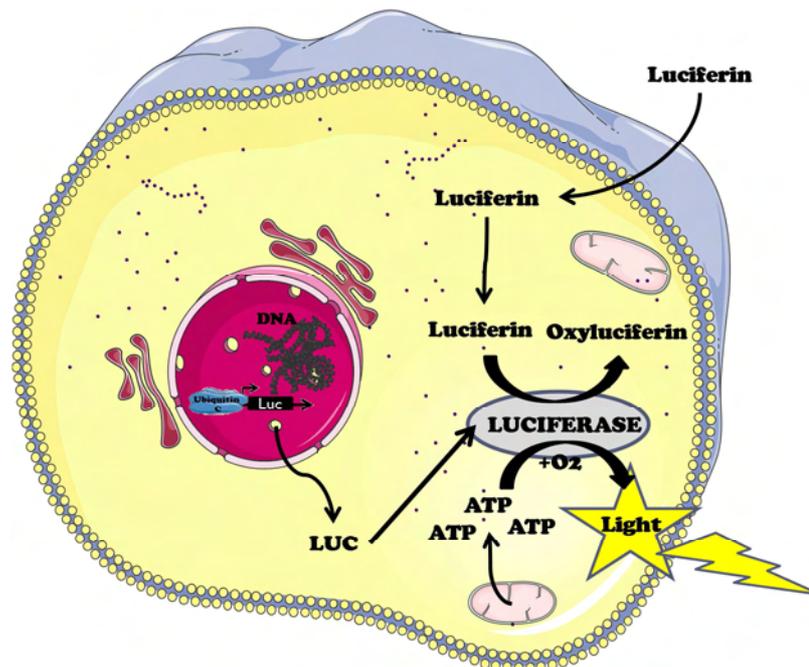


Figure 25 : Principe de la réaction de BLI dans une cellule.

L'imagerie de bioluminescence nécessite la construction génétique d'une cassette contenant le gène de la luciférase dont l'expression sera placée sous la dépendance soit d'un gène constitutivement activé (l'ubiquitine C), d'un gène d'intérêt ou de facteurs de transcription (NF- κ B , HIF-1,...). Ce type de construction avec des promoteurs inductibles permet de réaliser une analyse fine de l'expression génique en condition *in vivo*. Le choix du

gène de la luciférase utilisé est important. L'utilisation de la Renilla luciférase présente l'intérêt majeur que la réaction enzymatique est indépendante du métabolisme énergétique de la cellule (ATP, magnésium) contrairement au gène *luc*. En revanche, un des obstacles lié à son utilisation est la faible stabilité de son substrat dans le plasma sanguin et l'absorption importante des photons à 482 nm dans les tissus [188, 189]. En effet, l'absorption des photons par les tissus dépend de leur longueur d'onde, le proche infrarouge étant la longueur d'onde la moins absorbée. De plus, le signal obtenu avec le gène *firefly luc* est plus important et est plus stable dans le temps [188, 189].

Lorsque ces cellules génétiquement modifiées sont injectées à une souris, il est alors possible de les localiser et de mesurer la quantité de photons émis. Pour cela, l'animal reçoit une injection de substrat (la luciférine) par voie *i.p.* ou *i.v.* puis est placé dans l'enceinte hermétique à la lumière de l'appareil de bioluminescence (figure 26). Il est à noter qu'aucune toxicité n'a été rapportée suite à des injections répétées de luciférine. Les photons produits *in vivo* cheminent à travers les tissus jusqu'à la peau où ils forment une image de projection qui est acquise avec une caméra CCD (Charged Coupled Device) ultra-sensibles à bas bruit refroidie entre -70 et -90°C afin de diminuer le bruit de fond thermique et électronique permettant de gagner ainsi en sensibilité. Les photons détectés par la caméra sont ensuite convertis en image 2D par un logiciel de traitement. L'intensité du signal de bioluminescence dépendra de plusieurs facteurs [190] :

- Le nombre de cellules exprimant le gène rapporteur
- L'efficacité du gène rapporteur
- La disponibilité en cofacteur (ATP et O₂)
- Le temps entre l'injection du substrat et l'imagerie (pharmacocinétique de la luciférine considérée)
- La profondeur du tissu (absorption ; diffusion)
- L'atténuation du signal (présence d'une peau pigmentée, de poils,...)

Le signal de BLI est donc proportionnel à la fois au nombre de cellules présentes mais reste sous la dépendance de l'activité métabolique de la cellule, en particulier la disponibilité en O₂ et en ATP [191].

L'imagerie de BLI est donc une approche quantitative pouvant être influencée par un nombre important de facteurs mais qui permet de suivre dans le temps des processus biologiques dans divers domaines d'application comme l'inflammation ou l'oncologie.

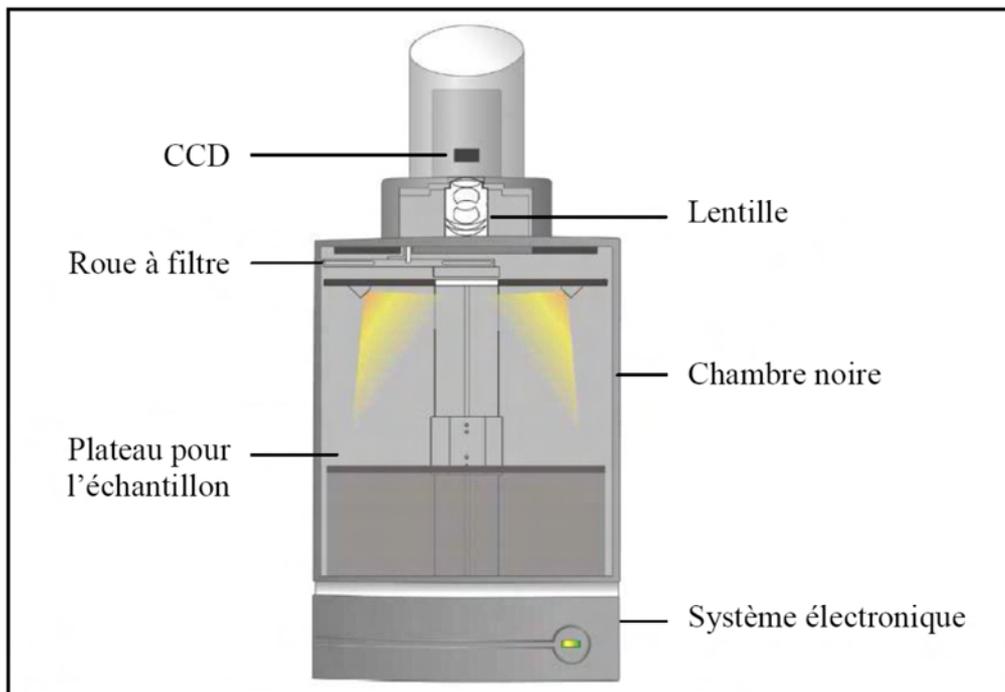


Figure 26 : Dispositif d'acquisition de bioluminescence IVIS Lumina® (Caliper)

B. Applications en inflammation

La bioluminescence reposant sur l'expression génique, il existe un nombre important d'applications en fonction du gène transfecté ou encore des cellules. Par exemple, il est possible de suivre les processus liés à l'angiogenèse en utilisant une souris transgénique VEGF-R2, dont l'ensemble des cellules a été modifié pour exprimer la luciférase sous la dépendance du VEGF [192]. La société Caliper® a développé un nombre important de souris transgéniques permettant des applications en cardiovasculaire ou encore en rhumatologie [193].

Par exemple, il est possible de réaliser un suivi cinétique de l'activation de NF- κ B pendant la mise en place d'arthrose dans des modèles animaux de souris transgénique NF- κ B-luc [193]. Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans la réponse inflammatoire et va, après son activation, induire l'expression de nombreux gènes cible lié au processus inflammatoire (interleukines, chemokines,...). NF- κ B est un facteur de transcription qui existe sous forme latente inactive dans le cytoplasme : il est alors associé à une sous unité inhibitrice : I- κ B. Cette association avec I- κ B empêche la translocation nucléaire de NF- κ B. La plupart des stimuli activateurs de NF- κ B comme le TNF α , l'IL-1, ou encore les radiations

ionisantes conduisent à l'activation d'un complexe multi protéique IKK qui phosphoryle I- κ B au niveau de deux résidus sérines (Ser 32 et Ser 36 pour I- κ B α) [194]. Cette double phosphorylation est ensuite reconnue par une enzyme de type E3 (enzyme du système ubiquitine protéasome) menant à l'ubiquitinylation et la dégradation de I- κ B par le protéasome. Une fois I- κ B dégradé, NF- κ B n'est plus séquestré dans le cytoplasme et subit une translocation dans le noyau, où il reconnaît un motif spécifique de liaison à l'ADN (motif κ B) sur la région promotrice de nombreux gènes. Le gène codant pour I- κ B fait partie des premiers gènes à être transcrits par NF- κ B, pouvant ainsi moduler son activation [195].

NF- κ B induit l'expression de nombreux gènes clés impliqué dans :

- la régulation négative de la voie de signalisation : I- κ B α , I- κ B β ...
- la réponse immunitaire : cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, COX2...
- l'inhibition de l'apoptose : cIAPs, A1/BFL1, BCL-X_L, c-FLIP...
- la prolifération : cycline D1, c-MYC... [196]

NF- κ B peut être activé dans de nombreux cas, allant d'un stress physique (température) à un stress chimique. La radiothérapie est connue pour activer ce facteur de transcription [11] Des études suggèrent que cette activation interviendrait dans les phénomènes de radiorésistance des cellules tumorales, en particulier en stimulant l'expression de gènes anti-apoptotiques et en favorisant la prolifération post-irradiation [197].

La figure 27 présente le principe de la réaction de BLI quand celle-ci est régulée par le facteur de transcription NF- κ B.

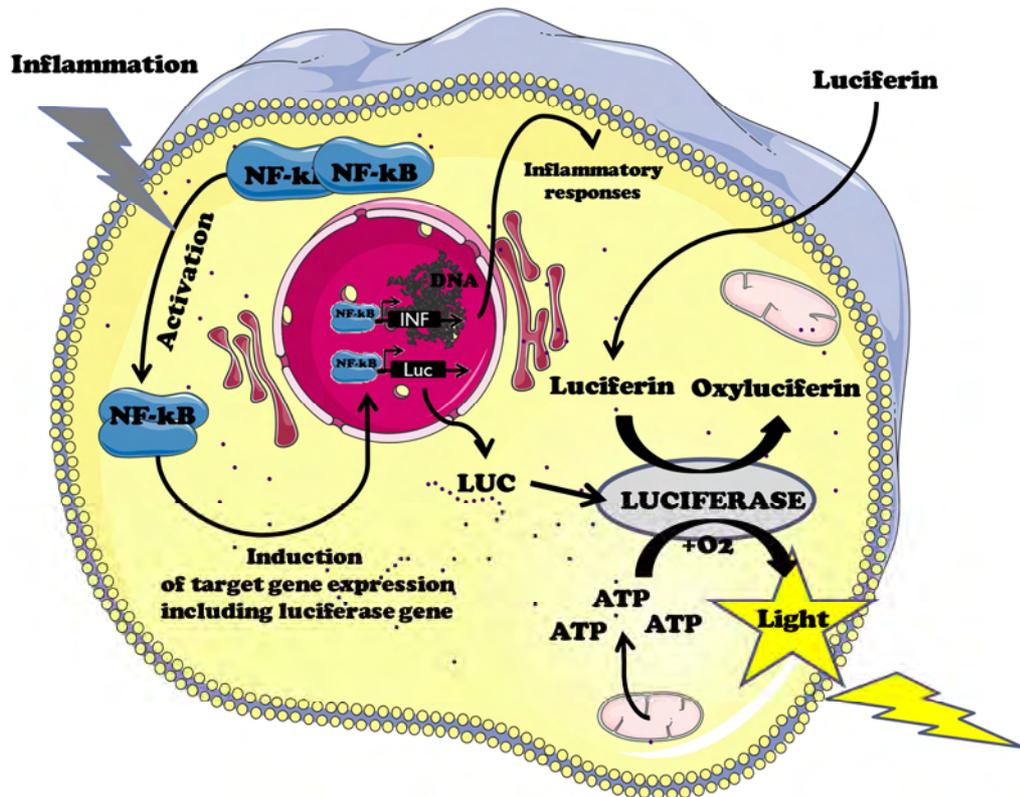


Figure 27 : Principe de la réaction de BLI faisant suite à l'activation de NF-κB

Les souris NF-κB ont été utilisées avec succès dans l'évaluation de l'inflammation induite par du TNF α ou du LPS au niveau pulmonaire [198]. Dans le travail de Ansaldi *et coll.* une imagerie de BLI a été effectuée avant puis 3h, 6h et 24h après un traitement avec un activateur de NF-κB [198]. Une augmentation progressive du signal de BLI a été observée avec un maximum d'activation de NF-κB dans les 3h suivant l'instillation intratrachéale avec du LPS ou TNF α (figure 28). Carlson *et coll.* ont également évalué l'effet de l'injection de LPS par voie intraveineuse chez la souris. Une augmentation de l'activité luciférase a été observée dans les poumons mais également dans d'autres organes. Les auteurs ont confirmé ces résultats en réalisant de l'imagerie de BLI *ex vivo* confrontée à une étude de l'activité de NF-κB *in vitro* [199].

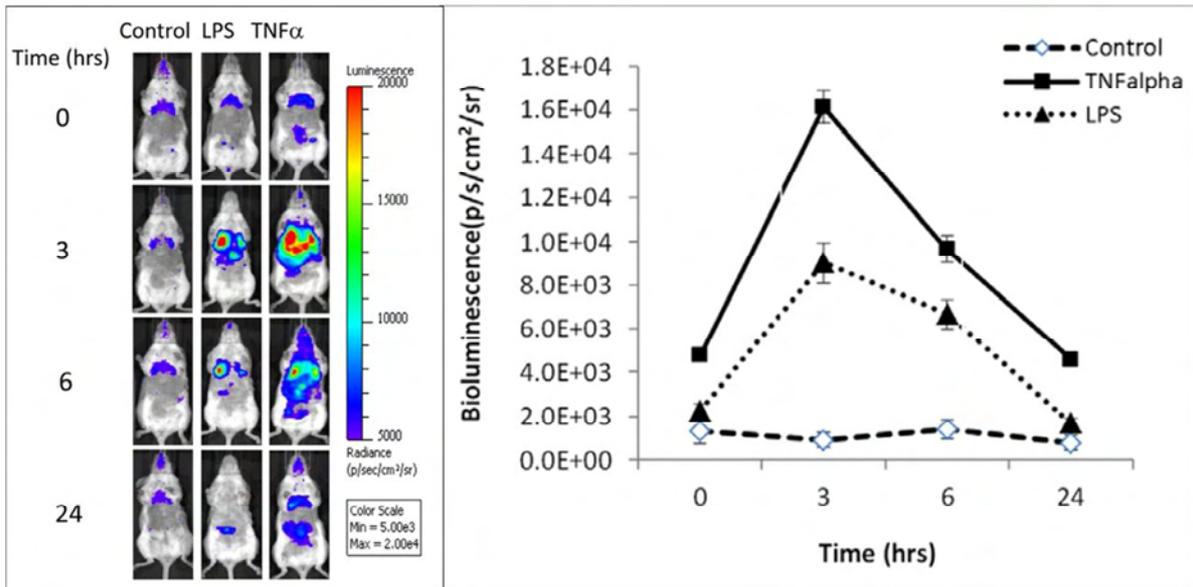


Figure 28 : Cinétique de l'activation de NF- κ B par BLI après administration de LPS ou TNF α [198].

L'étude de l'activité de NF- κ B par BLI dans le cadre de l'inflammation permet d'obtenir un nombre important d'information comme la cinétique du processus inflammatoire et la localisation des sites impliqués [200, 201]. La souris NF- κ B - luc présente toutefois un bruit de fond de bioluminescence important, qui est lié à l'activation basale de NF- κ B (figure 29). En effet, ce signal varie avec l'âge et le sexe de l'animal [199]. D'autre part, certains organes de l'animal présentent une luminescence basale plus importante que d'autres. Par exemple, au niveau de l'abdomen, une expression importante de NF- κ B est retrouvée au niveau des plaques de Peyers qui sont situées le long de l'intestin [199]. Cela est également observé au niveau du thymus.

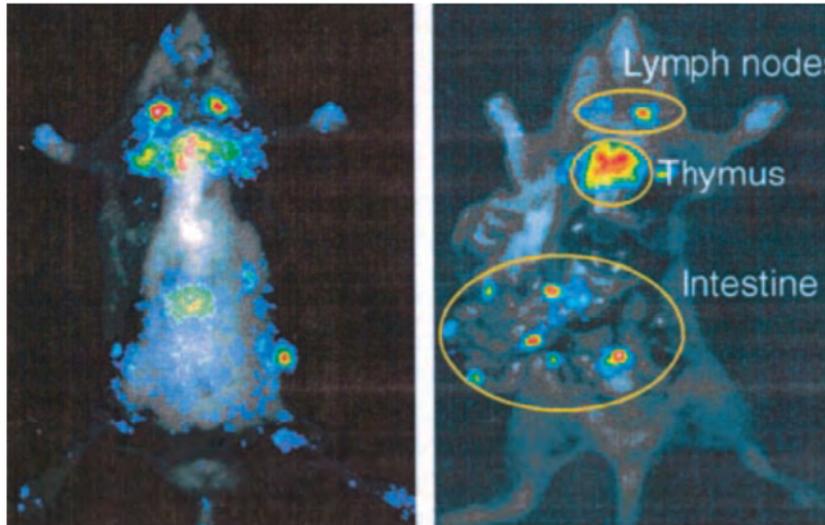


Figure 29 : Imagerie de BLI d'une souris NF- κ B luc. A gauche la souris est intacte, à droite les organes de la souris sont extériorisés. [199]

D'autres types de souris transgéniques ont été développés dans le cadre d'études sur l'inflammation (par exemple des souris dont la BLI est sous la dépendance de promoteurs comme iNOS (Nitric Oxyde Synthase) ou I κ B) [202]. En utilisant ces souris, il est possible de mettre en évidence, avec l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs spécifiques, le rôle de NF- κ B dans des processus inflammatoires bien spécifiques [193].

C. Applications en cancérologie

L'utilisation de la BLI en recherche préclinique en oncologie est la plus courante. Elle a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés en proposant une nouvelle méthode non invasive pour le suivi de la prolifération tumorale en présence d'un agent antitumoral [179, 191, 203]. La première expérience de ce type remonte à 1994, l'activité de la luciférase ayant été mesurée dans un broyat tissulaire pour évaluer la réponse à une thérapie [204]. Depuis, avec l'amélioration de la sensibilité des détecteurs, cette démarche est désormais possible *in vivo*. Dans ce cadre, les cellules tumorales sont transfectées (ou transduites) avec le gène de la luciférase sous la dépendance d'un gène constitutivement activé dans la cellule, en général l'ubiquitine C. Le gène rapporteur étant intégré dans le génome des cellules tumorales, celui-ci est répliqué pendant les divisions ce qui permet de suivre la croissance tumorale au cours du temps de manière non invasive. La mesure quantitative du nombre de photons émis par la tumeur permet donc d'évaluer l'effet de nouvelles thérapies sur la croissance tumorale [205]. Le nombre de photons émis augmentant de manière proportionnelle à la division cellulaire, la

cinétique de la croissance peut être déterminée en réalisant 2 à 3 imageries de BLI par semaine et permet de suivre une éventuelle régression. La BLI étant basée sur un système enzymatique dépendant de l'ATP et d'oxygène, seules les cellules métaboliquement actives contribuent au signal de BLI qui diminuera si les cellules meurent ou bien se retrouvent en conditions hypoxiques. D'une manière générale le signal de BLI est proportionnel au volume tumoral mais l'imagerie de BLI étant un système basé sur l'expression génique et un système enzymatique, le métabolisme cellulaire intervient dans le signal obtenu [191]. A ce titre, l'imagerie de BLI permet de déterminer une activité tumorale. Il n'est pas rare d'observer une diminution de la BLI qui va précéder la diminution du volume tumorale, celle-ci intervenant bien après la mort cellulaire [179]. Il est ainsi possible de visualiser les plages de nécrose présentes dans la tumeur. Une nécrose centrale de la tumeur résultant d'une angiogenèse insuffisante apparaît en général dans les 3 à 4 semaines [179].

Avec la capacité de détection, l'amélioration des plasmides et du gène de la luciférase (luc2), il est maintenant possible de détecter un nombre de cellules extrêmement faible (10 à 100 cellules), variant selon les modèles [179]. Cette propriété permet, en plus de l'évaluation de la croissance tumorale, une localisation de la dissémination des cellules tumorales chez la souris et permet ainsi l'étude de la métastase [206]. Par exemple, il est possible de détecter des métastases osseuses de carcinome mammaire d'une taille d'environ $0,5\text{mm}^3$ [207].

Des études suggèrent que l'imagerie de l'apoptose peut être utilisée comme un biomarqueur de la réponse à un agent anti-tumoral [208]. Cela est basé sur l'hypothèse que les traitements les plus efficaces induisent une apoptose importante dans la tumeur [209]. La détection de ces événements permet alors de déceler, de manière extrêmement précoce, l'efficacité potentielle d'un nouveau traitement [209]. La détection de l'apoptose peut reposer sur l'expression de différents événements intervenant au cours de ce processus, par exemple, le ciblage des motifs phosphatidyl sérine par l'annexine V ou encore l'évaluation de l'activité de la caspase 3. La caspase 3 est une enzyme possédant un rôle central dans le déclenchement de l'apoptose [210]. En l'absence de stimuli, l'enzyme est présente dans la cellule sous une forme inactive (pro-caspase3). L'activation de cette enzyme constitue ainsi une cible intéressante pour évaluer la mise en place de processus apoptotique dans la cellule. Basée sur la capacité que possède cette enzyme à cliver les fragments Z-DEVD, une luciférine modifiée a été synthétisée par la société Promega[®]. Celle-ci possède un fragment Z-DEVD couplé à sa structure, ce qui l'empêche d'être utilisée par la luciférase. Dans les cellules apoptotiques, ce

fragment est clivé par la caspase 3 activée, la luciférine est ainsi libérée et peut interagir avec la luciférase pour induire l'émission de photons [211-213]. Le signal de bioluminescence obtenu est proportionnel à l'activité de la caspase 3 et reflète le taux d'apoptose des cellules. Le principe de fonctionnement de cette bioluminescence en utilisant la Z-DEVD luciférine est détaillé sur la figure 30.

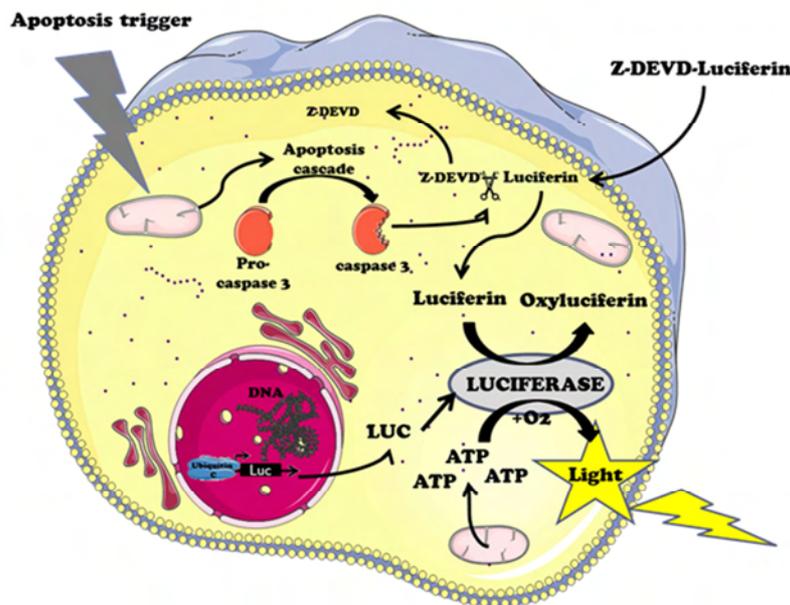


Figure 30 : Principe de l'imagerie de l'apoptose par bioluminescence

Cette détection de l'apoptose reposant sur l'activité de la caspase 3, il est impératif que la thérapie utilisée induise une apoptose caspase dépendante. Dans ce contexte, Scabini *et coll.* ont évalué cette nouvelle luciférine modifiée sur deux lignées cellulaires différentes avec des chimiothérapies connues pour induire de l'apoptose caspase 3 dépendante dans leurs modèles [211]. Une augmentation du signal de BLI a été observée 24h après le traitement. Cependant, les auteurs suggèrent de réaliser une imagerie de BLI standard pour normaliser les résultats obtenus avec la Z-DEVD luciférine [211]. Cela permet d'obtenir un signal d'apoptose fiable ne dépendant pas du signal de BLI standard qui est lié à l'activité luciférase. En effet, il a été observé que les traitements qui provoquent des arrêts du cycle cellulaire entraînent une augmentation de la synthèse de la protéine de la luciférase conduisant artificiellement à une augmentation de la BLI [211].

La détection de l'apoptose par bioluminescence étant particulièrement séduisante, des études avec cette Z-DEVD ont été réalisées au sein du laboratoire. Les résultats de ces études sont décevants, aucune différence de signal de BLI n'a été observée, et cela même en

reproduisant à l'identique le protocole décrit dans la publication de Scabini. Cette luciférine bien que très attractive, apparaît particulièrement difficile d'utilisation en raison du nombre de facteurs intervenants dans son métabolisme (i. e. double clivage enzymatique...)

En conclusion, l'imagerie de BLI est couramment utilisée en recherche préclinique et permet de manière non invasive de documenter de nombreux processus comme l'inflammation ou l'apoptose. Cependant, elle peut présenter plusieurs limites induisant une forte variabilité des résultats. La réaction de BLI est dépendante de la présence d'ATP, d'oxygène et de la luciférine. Le signal obtenu est donc lié au métabolisme cellulaire. Dans le cadre de tumeurs de taille importante, l'oxygène ou encore la luciférine elle-même peut ne pas atteindre les cellules centrales, ce qui ne permettra pas de les détecter [206]. De plus, les cellules tumorales ont la capacité d'utiliser un métabolisme anaérobie, ne consommant pas d'oxygène et ne produisant pas d'ATP. Dans ce cadre, il sera impossible par imagerie de BLI de détecter ces cellules [206]. Une dernière problématique concerne la quantification des photons émis par la tumeur. L'intensité du signal va dépendre à la fois de la tumeur, mais également des tissus traversés, les photons subissant de l'absorption et de la diffusion. La localisation de la tumeur, par exemple situé en orthotopique ou sous cutanée pourra alors présenter un impact sur la quantification et pour comparer les valeurs obtenus, il est nécessaire de faire une correction par analyse spectrale [214]. Par ailleurs, la quantification de BLI devient également complexe dans le cadre de modèles disséminés pour lesquels chaque foyer d'activité tumorale va donc présenter une composante d'absorption/diffusion de photons qui lui est propre.

Chapitre 3 : Les plasmas froids

D'une manière générale, les plasmas sont des gaz ionisés (encore dit excités) et sont considérés à ce titre comme le 4^{ème} état de la matière. L'état plasma est obtenu après excitation d'un gaz, aussi bien l'air ambiant qu'un gaz noble (argon, néon, hélium...) par un apport d'énergie, sous forme électrique ou radiative par exemple. Le plasma est un état transitoire, qui disparaît plus ou moins vite en fonction des caractéristiques du milieu.

La composition du plasma est de nature complexe, il contient des ions, des électrons, des radicaux et des espèces excitées. Le terme « plasma » en physique a été emprunté au monde de la biologie par la ressemblance du plasma physique en termes de complexité moléculaire au plasma sanguin [215]. Il est également à noter qu'une émission de radiation, notamment UV, est généralement associée au plasma, ainsi que la présence d'un champ électrique transitoire.

La température des électrons (T_e) qui composent le plasma est en général très élevée (>10.000 K), tandis que la température des particules neutres et des ions (T_i) qui donnera la température globale du plasma dépend du type de plasma considéré et peut ainsi varier de la température ambiante jusqu'à une température $>10^7$ K. Le plasma peut alors être considéré comme froid ($T_i \ll T_e$) ou chaud ($T_i \sim T_e$). Du fait de cette différence importante de température entre T_e et T_i , les plasmas froids peuvent également être appelés plasmas hors équilibre. Le soleil ou les éclairs sont des plasmas chauds présents de manière naturelle, tandis que les plasmas froids sont plus couramment rencontrés dans les laboratoires. Le développement récent des plasmas froids atmosphériques de laboratoire à des température n'excédant pas 40°C , permet d'envisager de nouveaux domaines d'application, en particulier pour le milieu biomédical. En effet, jusqu'à ce jour, les plasmas utilisés dans le domaine médical étaient principalement des plasmas chauds, notamment pour leurs effets thermiques, par exemple dans le cadre de la cautérisation. Un des dispositifs médicaux basé sur les plasmas chauds le plus utilisé en milieu hospitalier est un appareil permettant la coagulation par plasma argon (APC) lors d'interventions chirurgicales [216].

Dans ce chapitre, les différentes sources et les plasmas ainsi générés seront présentés dans une première partie. Nous aborderons ensuite la composition du gaz et la détection des espèces générées et pour finir les différentes applications biomédicales avec les mécanismes d'action associés.

I. Les sources de plasmas froids

Il existe deux grandes catégories de plasmas, qui vont se distinguer par leur mode de génération, leur mode de propagation et les espèces réactives mises en jeu. Les plasmas peuvent être regroupés en deux catégories, les plasmas DBD et les plasma jets [217]. Les caractéristiques de ces deux types de plasma sont détaillées dans le tableau iv. Le principal plasma direct utilisé est la DBD (Dielectric Barrier Discharge – décharge à barrière diélectrique), il sera détaillé dans la partie suivante. Il est important de noter qu'il n'existe qu'un seul dispositif de génération de plasma froids qui est commercialisé par une société allemande (NeoPlasTool®), ce qui signifie que toutes les autres sources sont développées au sein de laboratoires académiques ou industriels et ne sont donc pas disponibles pour l'ensemble de la communauté scientifique. Cette spécificité permet à chaque laboratoire d'ajuster de manière très fine les paramètres de sa source en fonction du type d'application considéré et ainsi d'obtenir des effets plus spécifiques. En revanche, il est difficile de comparer les résultats d'un groupe à un autre.

Tableau IV : Les différentes sources de plasma froid. Adapté d'après [218]

Sources	DBD	Jet (Plasma needle, plasma gun...)
Mode de production	La zone de traitement sert d'électrode.	Production entre deux électrodes puis transport dans un flux de gaz jusqu'à la zone de traitement
Gaz	Air	Gaz noble/air
Distance de traitement	~mm	~mm – cm
Courant électrique	Traverse le tissu	Dépend du type de plasma jet
Radiations UV	Faible	De faible à moyenne
Densité électronique du plasma au site d'application	Élevé	Faible à Élevé selon le type de sources

A. La décharge DBD

1. Généralités

Le plasma direct le plus couramment utilisé est la FE-DBD (Décharge à barrière diélectrique avec électrode flottante). **Dans le cas d'une décharge DBD**, le plasma est généralement créé entre deux plaques de métal plat parallèles qui sont recouvertes d'une fine couche de matériau diélectrique. Un courant électrique de haute fréquence (variant du Hz au kHz) est utilisé avec une tension de l'ordre du kV. Ceci permet de générer un plasma entre les deux électrodes lorsque celles-ci sont séparées d'une distance inférieure à quelques millimètres. Le gaz présent entre les deux électrodes est alors ionisé et crée un plasma (figure 31). La couche de diélectrique permet d'éviter le passage à l'arc et de réduire le courant présent dans le plasma à quelques mA [219].

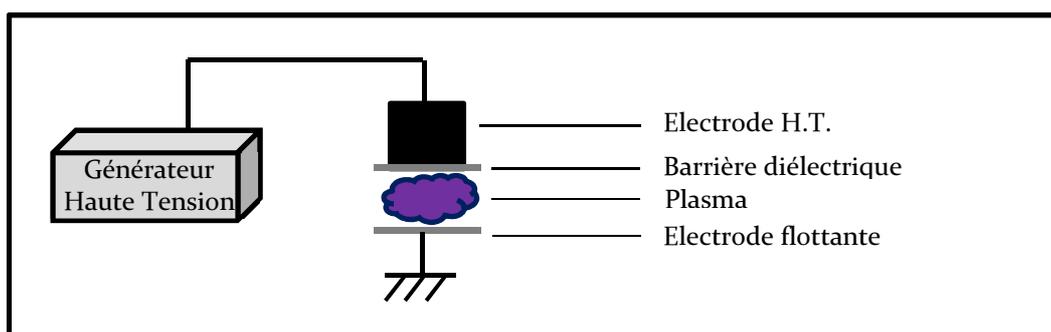


Figure 31 : Schéma d'une décharge DBD

La **décharge FE-DBD** utilise, quant à elle, une première électrode recouverte d'un diélectrique et c'est la zone d'application du plasma (par exemple la peau) qui sert de seconde électrode. Cette dernière est alors qualifiée d'électrode flottante (figure 32).



Figure 32 : Photo d'une décharge à barrière diélectrique (FE-DBD) dans l'air

Ainsi, la surface de l'électrode peut être adaptée en fonction de la surface de la zone d'application du plasma. Ce type de plasma présente l'avantage d'être très réactif, la zone de traitement étant directement en contact avec les espèces actives générés par le plasma. Cela est particulièrement vrai dans le cas des espèces réactives de demi-vie courte. L'inconvénient majeur de ce type de décharge est son manque de flexibilité, la distance de traitement entre l'électrode et le tissu devant être faible. Par ailleurs, le courant de faible intensité traversant le tissu traité peut être à l'origine d'effets thermiques ou encore de la stimulation électrique de muscles. De par l'excitation du gaz mais également à cause du courant électrique présent, il est admis qu'une DBD peut provoquer un échauffement de la zone traitée d'une dizaine de degrés maximum [217, 220].

Le plasma produit par FE-DBD très réactif contient de nombreuses espèces actives qui sont détaillées dans le tableau I. Ces espèces, avec les autres éléments du plasma (les UV, le champ électrique) pourront agir directement sur la zone traitée. La composition du plasma dépend du gaz dans lequel le plasma est généré, mais également de la distance de traitement ou encore de la durée, ce qui signifie que la composition peut être adaptée en fonction des espèces en présence ou de l'effet désiré. Les effets biologiques de ce type de plasma seront traités plus loin dans ce manuscrit.

Tableau V : Concentrations relatives des espèces chargées et neutres dans la phase gazeuse d'une DBD. Adapté d'après [219, 221]

Espèces générés dans le plasma	Densité (cm⁻³)
Superoxyde (O ₂ • ⁻), électrons	10 ¹⁰ -10 ¹²
Hydroxyl (OH•)	10 ¹⁵ -10 ¹⁷
Peroxyde d'hydrogène	10 ¹⁴ -10 ¹⁶
Oxygène singulet	10 ¹⁴ -10 ¹⁶
Ozone (O ₃)	10 ¹⁵ -10 ¹⁷
Oxyde nitrique (NO)	10 ¹³ -10 ¹⁴
Ions Positifs (M ⁺)	10 ¹⁰ -10 ¹²

2. Exemple de la décharge DBD du laboratoire

La décharge DBD va être caractérisée par différents paramètres qui vont jouer sur le plasma généré que soit au niveau de sa composition et de sa réactivité (figure 33). Les paramètres principaux intervenant sont :

- La tension appliquée à l'électrode pour l'excitation du gaz
- Le type de diélectrique et sa surface
- Le type d'impulsion (ns, μ s,)
- La fréquence
- Le temps d'application

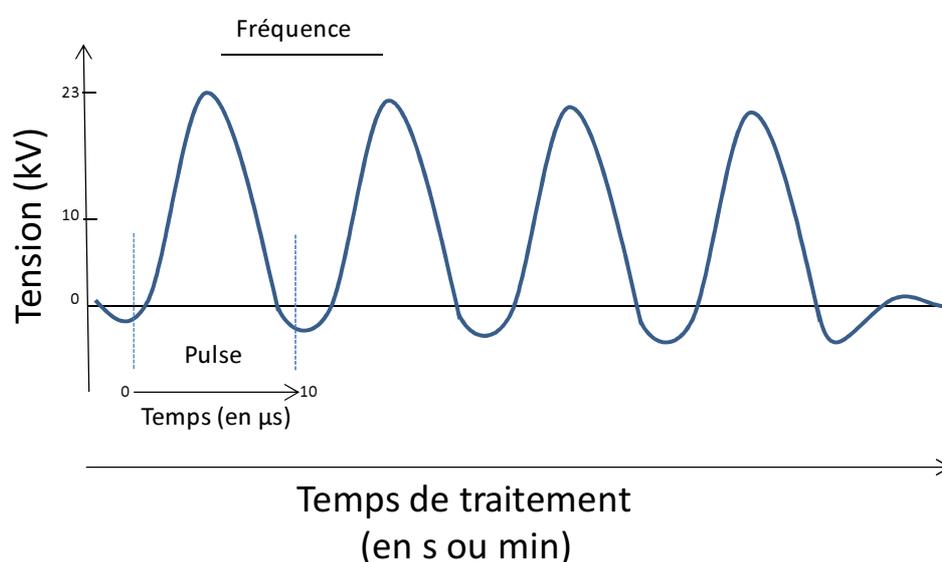


Figure 33 : Allure typique des impulsions électrique appliquées aux bornes des électrodes pour générer le plasma.

Ces paramètres vont influencer la décharge plasma et peuvent être ajustés pour obtenir le type de plasma désiré. C'est en partie cette possibilité de réglage qui complique de manière importante la comparaison de résultats d'un laboratoire à l'autre. De plus, à ce jour, aucune norme n'a été établie pour définir les doses appliquées pendant un traitement plasma. Les doses généralement retrouvées dans la littérature sont soit en temps de traitement (s ou min), soit en J/cm^2 .

Le paramètre primordial est de connaître la quantité d'espèces générées dans le plasma. Celui-ci sera en partie dépendant du nombre de décharge (pulses) que l'objet à reçu, c'est-à-

dire du temps de traitement et de la fréquence qui permet ainsi de calculer un nombre de pulses total. Cependant, ce nombre de pulse ne prend pas en compte la tension/courant appliquée, ni le type de diélectrique. La tension/courant appliquée et la tension/courant pour l'excitation du gaz peuvent varier de manière importante suite à des déperditions d'énergie. C'est cette mesure détaillée en partie expérimentale qui a permis à notre équipe de déterminer la puissance du plasma généré. L'équipe de Fridman, quant à elle, a déterminé la puissance de son plasma en calculant l'apport d'énergie apporté par sa décharge grâce à un système de calorimétrie [222].

La décharge développée au sein du laboratoire est une DBD proche de celle décrite par ailleurs [223]. Le générateur est alimenté en 220V, cette tension est transformée en impulsions électriques qui sont de durée μs , la tension appliquée peut atteindre 23kV. Le système permet de faire varier la fréquence du monocoup à plusieurs kHz. La barrière diélectrique utilisée est du verre d'une épaisseur de 1 mm. Une caractérisation spectroscopique des espèces générés sera détaillé ultérieurement en partie expérimentale.

B. Les Plasma Jets

1. Généralités

La caractéristique principale de ce type de plasma est qu'il est produit entre deux électrodes, et se propage ensuite jusqu'à la zone d'application *via* un flux de gaz. Il en existe un très grand nombre, qui sont pour la plupart encore développés en laboratoire de recherche (figure 34). Le plasma Kinpen[®], commercialisé par la société allemande NeoplasTool, est la seule source plasma disponible à l'achat actuellement.

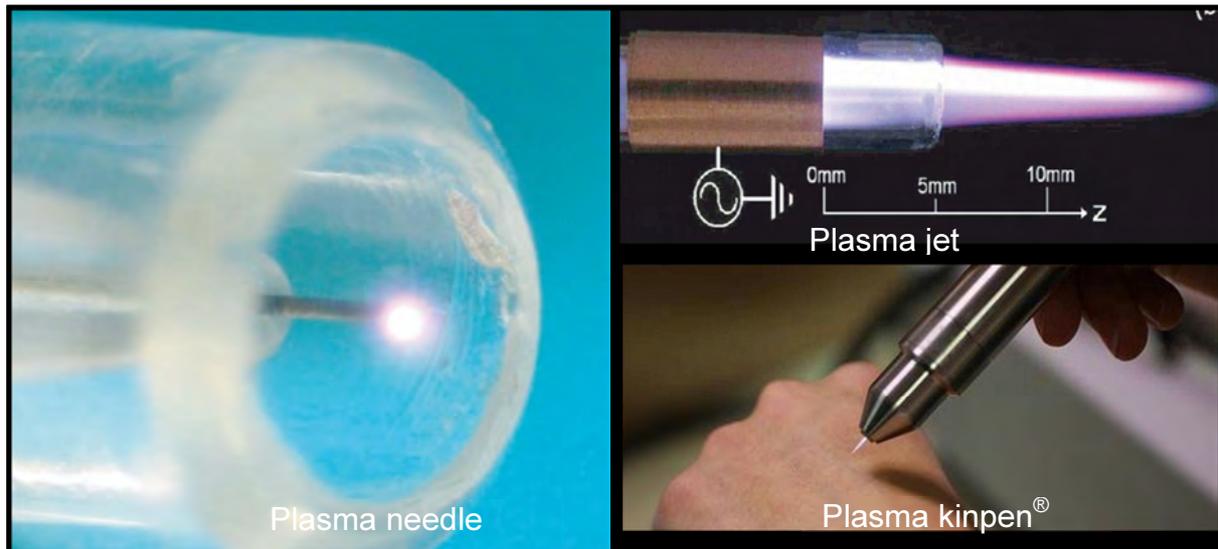


Figure 34 : Différents types de plasma indirect

Ce type de décharge présente l'avantage d'être très flexible pour différents types d'applications comme le traitements de tissus [224]. De par sa configuration, la zone de génération du plasma se situe à distance de la zone de traitement, le plasma est généré au niveau de l'électrode par un apport d'énergie en présence d'un flux de gaz qui permettra au plasma de se propager jusqu'à la sortie du tube dans lequel il a été généré (figure 35).

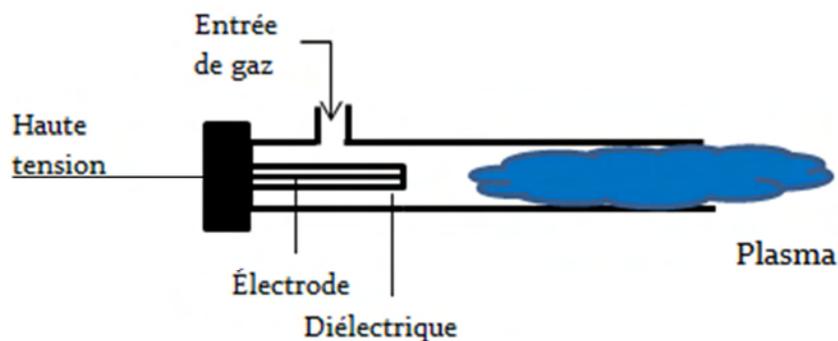


Figure 35 : Schéma de fonctionnement d'un plasma Jet

Le plasma étant généré dans une enceinte confinée, les espèces initialement présentes seront principalement dérivées du gaz utilisé (généralement de l'argon ou de l'hélium). En revanche, lorsque le plasma atteint la sortie du tube, il va rencontrer l'air et ainsi provoquer l'excitation des molécules présentes dans l'air [225]. Dans cette zone, on parle de plume plasma. Ce phénomène va ainsi permettre d'obtenir au sein du plasma des espèces actives

proche de celles observées lors d'une décharge DBD. La possibilité de faire des décharges dans des gaz ou mélanges de gaz permet de faire varier la production d'espèces générées. Les gaz généralement utilisés sont les gaz rares comme l'argon, l'hélium ou le néon, auxquels peut être ajoutée une fraction d'oxygène. La variation de l'ensemble de ces paramètres conduit à des compositions différentes en espèces réactives. Un des avantages des plasmas Jets est la possibilité d'appliquer les plasmas de manière flexible dans la zone de traitement désirée. De plus, la source haute tension, comme l'électrode, se trouve à une distance importante de la zone traitée, limitant ainsi le risque électrique. Les mécanismes de propagation du plasma dans les capillaires sont toujours à l'étude, tout comme les caractéristiques de la plume plasma. Le plasma Jet développé au sein du laboratoire GREMI est appelé le Plasma Gun. Il est présenté en détails dans le paragraphe suivant.

2. Le plasma Gun

Le plasma Gun est une variété de plasma Jet possédant trois caractéristiques principales :

- une génération de plasma dans des capillaires de faible diamètre sur des distances supérieures à 1 m,
- l'utilisation d'un débit de gaz très faible inférieur à 1L/min
- une vitesse de propagation du plasma dans le capillaire à des vitesses supérieurs à 10^7 cm/s [226].

La photo du système est présentée sur la figure 36. L'ensemble de ce système développé au sein du GREMI a été breveté en 2007 [227].

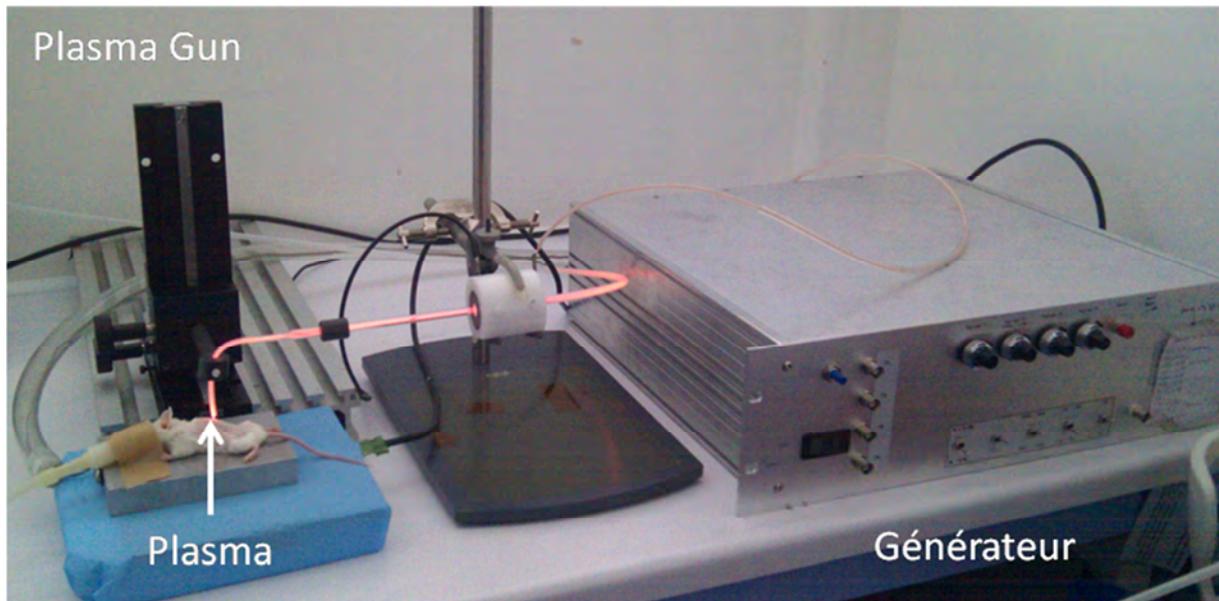


Figure 36 : Photo du Plasma Gun en fonctionnement

Ce dispositif permet de générer des colonnes de plasmas pulsées à la pression atmosphérique (PAPS : Pulsed Atmospheric Pressure Plasma Stream). Le front d'ionisation qui compose la tête du PAPS, partie la plus lumineuse, a souvent été dénommée « balles » plasma. Cette appellation n'est plus appropriée car il n'y a pas transfert de matière mais simplement transfert d'excitation et d'ionisation. Le réacteur du plasma gun est décrit en figure 37, celui-ci se compose électrode interne en tungstène et d'une tube diélectrique.

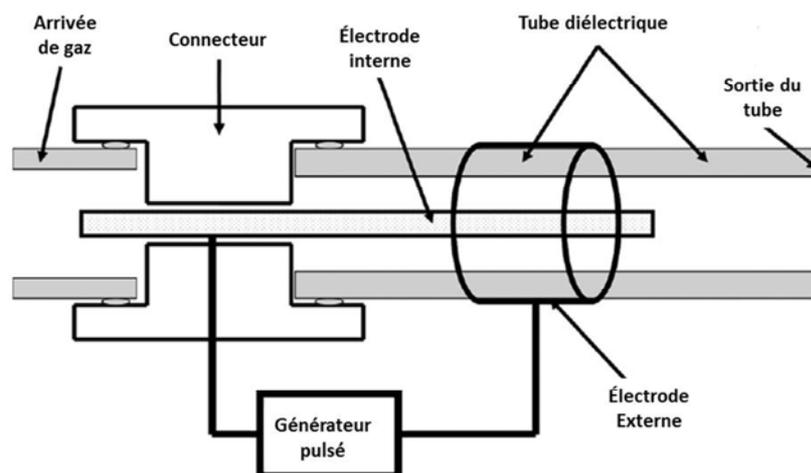


Figure 37 : Schéma du réacteur du plasma Gun

Le tube de sortie peut être relié à des capillaires dont le diamètre peut varier de quelques micromètres à plusieurs millimètres (figure 38). Ce type de raccordement permet d'envisager la réalisation de traitements *in situ* en particulier des applications endoscopiques,

le plasma pouvant ainsi être délivré dans des zones difficiles d'accès au contact direct du tissu. Pour les expériences réalisées dans ce travail, le générateur utilisé pour cette décharge est identique à celui utilisé pour générer le plasma DBD, ce qui signifie que les pulses utilisés sont également de type μ s. Une tension pulsée de 20 kV est appliquée aux électrodes avec un taux de répétition pouvant varier de quelques Hz à quelques kHz (1 à 4000 Hz).

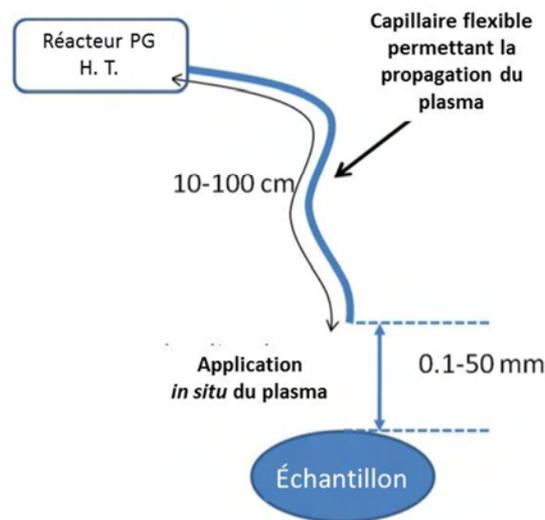


Figure 38 : Schéma d'application in situ du plasma gun

II. Les applications biomédicales des plasmas froids

L'utilisation des plasmas froids dans le domaine biomédical est un nouveau champ de recherche en pleine expansion. Les domaines d'application vont de la stérilisation d'instruments médicaux, à la décontamination des mains jusqu'à l'évaluation du plasma comme agent anti-inflammatoire dans le cadre du traitement de colite chez la souris [228] ou encore en cosmétologie [229]. Dans cette partie, l'application du plasma dans les domaines de la stérilisation, axée plus particulièrement dans le cadre de la cicatrisation, et la coagulation du sang sera tout d'abord traitée.

A. Décontamination / Stérilisation et cicatrisation

1. Généralités

Historiquement, les plasmas en médecine étaient utilisés pour leurs propriétés thermiques, en particulier pour la stérilisation ou la cautérisation [230]. Les progrès dans le développement des plasmas froids ont permis d'explorer l'utilisation des plasmas froids en décontamination/stérilisation et c'est aujourd'hui le domaine d'application le plus avancé, concernant le plus d'équipe de recherches, et pour lequel les mécanismes d'action sont les mieux décrits. La stérilisation/décontamination est très utilisée dans la vie courante, que ce soit en milieu industriel (désinfection des sols à la serpillière) ou hospitalier. Ainsi, la stérilisation des instruments médicaux est un enjeu majeur de santé publique, en particulier avec l'émergence des souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques. Jusqu'à présent, la stérilisation reposait sur l'utilisation d'une température élevée (autoclaves [231, 232]) ou de produits chimiques comme l'oxyde d'éthylène [233, 234], l'ozone [235, 236] ou le chlore [237, 238]. Cependant, ces méthodes posent des problèmes à la fois de traitements d'effluents mais peuvent également détériorer le matériel sensible ou encore provoquer de la toxicité [239].

Depuis la première démonstration de l'effet des plasmas sur des bactéries en 1996 [240], de nombreuses équipes travaillant dans le domaine ont également démontré l'efficacité cytotoxique importante que possède le plasma [230, 241-243]. Ces résultats ont été obtenus aussi bien sur des bactéries gram négatives, gram positives mais aussi sur biofilms, les champignons, ou encore les virus [241, 244]. D'une manière générale, le plasma possède une activité importante contre les micro-organismes, mais nous pouvons noter par exemple une activité plus importante envers les bactéries gram négatives que gram positives. Les mécanismes d'actions seront détaillés plus précisément dans la partie suivante, mais cet effet est lié en partie à sa possibilité d'accéder dans des zones étroites et confinées [220]. Cela a entraîné le développement de deux champs distincts : la stérilisation de surfaces [245] et la décontamination de tissus biologiques comme la peau [217, 246, 247]. Ce deuxième champ est motivé par la désinfection de tissus vivant comme les blessures ou encore des maladies cutanées. Dans ce scénario, l'interaction directe du plasma avec le tissu à traiter est inévitable donnant lieu à des questions sur la toxicité de ce type de traitements sur les tissus traités, avec les dommages potentiels aux tissus sains [217]. Les propriétés du plasma peuvent être

modulées de manière importante pour obtenir des espèces d'intérêt particulier pour une application donnée. L'application du plasma sur les tissus doit être modulée finement et pour cela, l'identification précise des espèces ainsi que leurs concentrations optimales d'utilisation doit être déterminée.

Les équipes allemandes sont les plus avancées dans la désinfection de tissus vivant (MPI-MPE Garching). Un prototype de désinfection des mains a ainsi été développé [248]. Ce système permet avec une décharge de plasma froid une désinfection en quelques secondes de la main (figure 39).

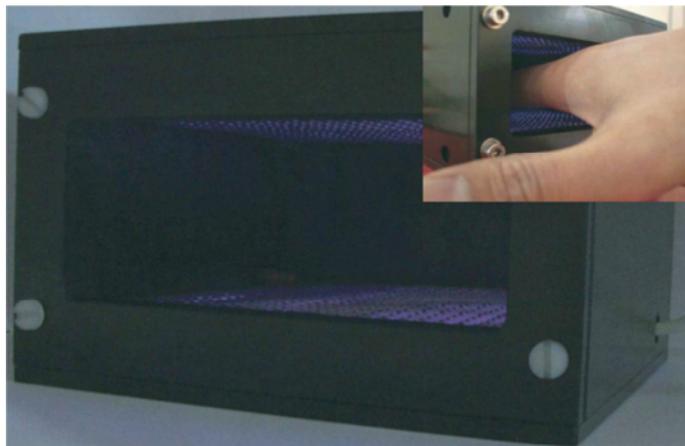


Figure 39 : Prototype développé pour la décontamination rapide des mains par plasma [248]

Ce système présente de nombreux avantages pour une utilisation en milieu hospitalier, un faible encombrement, une désinfection rapide (quelques secondes) et une efficacité sur de nombreux micro-organismes. L'efficacité du plasma sur des staphylococcus résistant à la méticilline a été prouvé en utilisant un autre dispositif (MRSA – Méthicilline Résistant Staphylococcus Aureus) (figure 40).

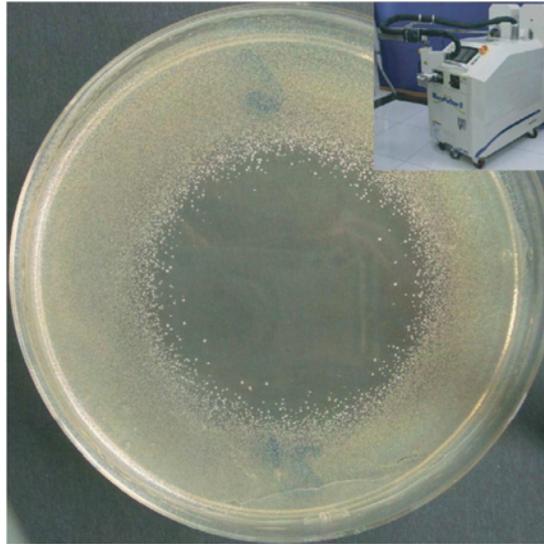


Figure 40 : MRSA traité pendant 2 min par plasma froid, une zone d'inhibition de 5 cm de diamètre est observée [220].

Au niveau clinique, une source de plasma froid à pression atmosphérique (MicroPlaSter[®]) est cours d'évaluation de phase I et II pour la décontamination de plaies (figure 41). Le traitement standard des plaies est basé sur l'utilisation d'une large variété d'antibiotiques qui peut conduire dans le temps à l'induction de résistances bactériennes mais également à l'apparition de phénomène allergiques. Les infections bactérienne empêchent les processus de cicatrisation et entraînent des douleurs importantes [249].

La source plasma développé par les équipes Allemandes présente une efficacité de réduction bactérienne de souches représentatives d'infections de plaies, en particulier d'ulcère de la jambe [218, 250]. D'autre part, aucune résistance primaire ou secondaire n'a été observée après traitement au plasma [218, 250].



Figure 41 : Photos de la source de plasma MicroPlaSter®

Les résultats de la phase I font état d'un bénéfice important du traitement avec le plasma dans le cadre de plaies chroniques infectées. Le traitement provoque une réduction importante de la charge bactérienne et n'est accompagné d'aucune douleur, et aucun effet secondaire n'a été rapporté. L'efficacité de ce système a été confirmée dans une étude de phase II qui a recruté plus de 150 patients avec des infections chroniques de plaies ou des ulcères. Ces patients ont reçu en moyenne 9,2 séances de traitement d'une durée de 2 à 5 minutes. Le traitement a été très bien toléré par l'ensemble des patients et aucun effet secondaire n'a été décrit. Une réduction significative de 34% de la charge bactérienne a été observée entre les plaies traitées au plasma et les plaies non traitées [251]. D'autre part, une cicatrisation plus rapide a été observée pour les plaies traitées par le plasma froid (figure 42). Ces résultats très prometteurs sont les plus avancées parmi l'ensemble des applications des plasmas froids.



Figure 42 : Ulcère infecté de la jambe avant traitement (à gauche) et après 20 séances (5 semaines) de traitement au plasma froid généré avec le MicroPlaSter (à droite) [218].

2. Mécanismes d'action

Avec l'ensemble des résultats obtenus dans le domaine de la stérilisation/décontamination, les mécanismes d'action majeurs du plasma froid sur les micro-organismes sont les mieux décrits. Cependant, les effets dose dépendants allant d'effets létaux (mort cellulaire [252, 253]), sub-létaux (action bactériostatique [254]) et non létaux avec des changements métaboliques [255] sont encore des phénomènes complexes dont les mécanismes ne sont pas complètement établis.

Les plasmas froids étant composés de différents éléments (ROS et RNS, température, champ électrique, radiations UV, espèces excitées et particules chargées), il est important de discriminer l'importance des différents constituants dans le pouvoir désinfectant du plasma (figure 43).

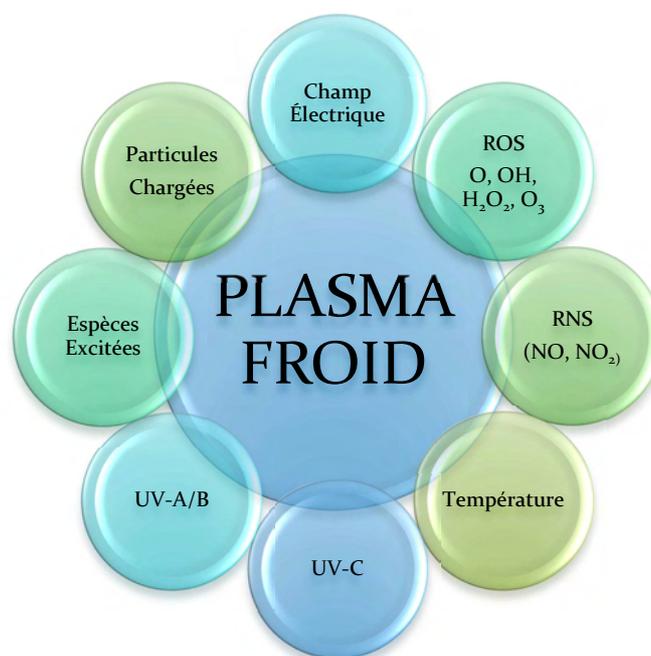


Figure 43 : Les différents composants du plasma froid. Adapté d'après [256]

- Un des paramètres connus pour inactiver des microorganismes est **la température**. Le plasma froid possède une température proche de la température ambiante, l'ensemble des mesures de température du gaz ne montrant aucune augmentation significative [257]. De ce fait, l'ensemble des auteurs concluent à un effet négligeable de la température.

- **Les radiations UV** ont été largement étudiées pour leur pouvoir germicide et sont utilisés en routine dans de nombreux types d'application nécessitant une stérilisation. Les lampes UV à mercure sont décrites pour induire des dommages létaux aux cellules, en particulier une dimérisation des bases thymidiques au niveau de l'ADN, ce qui bloque la capacité de répllication des bactéries [258]. La génération d'UV par le plasma dépend du type de décharge utilisé mais aussi du type de gaz. Toutefois, cette production d'UV est minime [257]. La production d'UV émise par la source plasma utilisée dans les essais clinique (MicroPlaSter) a été comparée à une exposition naturelle au soleil. Pour les UVA, 1 min de plasma correspond à une exposition de 5 min au soleil, pour les UVB : 1 min de plasma correspond à une exposition d'1 min au soleil et pour finir concernant les UVC : 1 min de plasma correspond à 10s au soleil. Ces données sont récapitulées dans le tableau suivant (

- TABLEAU VI).

Tableau VI : Comparaison des intensités de radiation UV pour une exposition de 5 min entre entre le soleil et le plasma froid [218]

Exposition de 5 min	UVC (180-280 nm)	UVB (280-320 nm)	UVA (320-400 nm)
Soleil	1 - 2,5 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	30 – 50 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	~ 600 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
Plasma MicroPlaSter	10 - 16 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	40 – 60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$	< 100 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

De plus, d'autres expériences visant à sélectionner les composants pouvant interagir avec les bactéries ont été menées. En plaçant une plaque de quartz entre la décharge et l'échantillon à traiter, seuls les UV peuvent atteindre la cible. Les auteurs n'ont observé aucun effet important des UV produits par les plasmas sur les bactéries. Dans ce contexte, l'émission d'UV semble être un paramètre n'ayant qu'une faible influence.

- **Les particules chargées et le champ électrique** présents dans le plasma peuvent présenter un rôle non négligeable dans les effets de rupture de la membrane externe des bactéries [259-261]. Des études ont montré que l'accumulation de charges sur la face externe de la membrane des bactéries conduit à un dérèglement des forces électrostatiques produisant la rupture de la membrane puis une fuite du cytoplasme et la mort bactérienne [262, 263]. Ce type d'effet n'est pas observé sur les cellules eucaryotes qui sont bien plus tolérantes aux charges et champs électrique [264]. De nombreux agents désinfectants utilisent d'ailleurs cette propriété pour spécifiquement éliminer les bactéries sans effet sur les cellules. La chlorhexidine, un puissant antiseptique, est une solution cationique qui agit en se fixant sur

la membrane et en inactivant les charges négative conduisant finalement à l'inactivation de la bactérie [263].

- **Les espèces réactives (RS)**, que ce soit les **ROS** ou les **RNS** ont un rôle prédominant dans l'effet du plasma sur les micro-organismes. Suivant le type de décharge ou le gaz utilisé, les concentrations en RS peuvent varier dans la décharge plasma. Parmi ces RS, deux molécules sont particulièrement intéressantes et décrites pour intervenir principalement dans le cadre de la stérilisation par plasma, il s'agit du H_2O_2 et de l'Ozone. Ces molécules ont déjà été décrites pour présenter un effet germicide important [128, 265]. Concernant le rôle du H_2O_2 , l'équipe de A. Fridman a déterminé la concentration de H_2O_2 produite par une DBD [266]. Il a été observé une production linéaire de H_2O_2 en fonction du temps de traitement par plasma. Avec une dose élevée de $12 J/cm^2$, le plasma produit l'équivalent de $6,5 mmol/L$ de H_2O_2 dans $1 mL$ d'eau. Il apparaît que pour obtenir un effet proche d'une faible dose de plasma ($0,5 J/cm^2$) avec du H_2O_2 seul, il faut une concentration de H_2O_2 très importante, de l'ordre de $200 mmol/L$, soit une concentration largement supérieure à ce qui peut être généré par le plasma. Ces données mettent en lumière que le H_2O_2 joue un rôle dans l'effet antiseptique du plasma, mais ce composant n'est pas le candidat prépondérant. Il est important de rappeler que le H_2O_2 généré par le plasma n'est pas seul mais en présence de nombreux autres RS qui peuvent, en interagissant ensemble, présenter un effet potentialisé. Le rôle de l'ozone a également été évalué dans l'effet inactivateur du plasma froid. En utilisant des concentrations identiques d'ozone à celles générées par le plasma, les auteurs concluent que comme le H_2O_2 , l'ozone ne présente pas un rôle majeur [266]. Même si le sujet reste débattu, il semble que les deux composés présentant le rôle le plus critique pour expliquer l'effet antiseptique du plasma (hormis les espèces chargés) sont le radical $OH\cdot$ et l'anion superoxyde $O_2\cdot^-$. Le radical $OH\cdot$ est à l'origine d'un phénomène oxydatif important au niveau cellulaire et l'anion superoxyde possède une réactivité importante envers les molécules biologiques, en particulier les protéines mais également l'ADN ou des dégâts important peuvent être générés [266]. L'ensemble de ces dégâts conduisant au final à la destruction du micro-organisme.

Concernant la cicatrisation, ce processus physiologique est multiétapes et nécessite tout d'abord une stérilisation de la plaie, puis les phénomènes de régénération tissulaire se mettent en place pour la fermeture de la plaie. Le plasma est un promoteur de la cicatrisation en agissant comme stérilisateur mais pas seulement [218]. En effet, il a été démontré que le plasma permet aussi la promotion de la cicatrisation par la stimulation de la régénération

tissulaire [217]. L'effet bénéfique du plasma sur la cicatrisation est lié à l'importante production exogène d'oxyde nitrique (NO). Le NO est décrit pour être un vasodilatateur important, capable de stimuler les fibroblastes et présentant également une action anti bactérienne [267]. Il existe d'ailleurs des études basées sur la NO - Thérapie qui utilise un générateur de NO (le Plazon) dans le cadre du traitement d'ulcères [268, 269]. Ces études montrent que le traitement de plaies avec du NO permet de multiplier par 2,5 la vitesse de cicatrisation [268, 269]. Cet effet sera discuté plus en détail dans la partie décrivant les effets du plasma sur les cellules eucaryotes.

En conclusion sur les mécanismes d'actions du plasma dans le cadre de la stérilisation et de la cicatrisation, il apparaît que les espèces chargées ont un rôle majeur dans la déstabilisation de la membrane et que les RS, en particulier l'anion superoxyde, présentent une activité importante. Même si les autres RS et les autres constituants du plasma semblent présenter un rôle mineur, il ne faut pas les exclure car au final c'est bien la combinaison de l'ensemble de ces paramètres qui conduit à l'effet observé.

B. Coagulation/hémostase

L'hémostase regroupe les différents mécanismes assurant la prévention des saignements spontanés et l'arrêt des hémorragies en cas de rupture de la continuité de la paroi des vaisseaux sanguins. Plusieurs acteurs interviennent dans cette fonction physiologique : la paroi du vaisseau, les plaquettes, les systèmes de la coagulation (les facteurs de la coagulation présent dans le plasma) et de la fibrinolyse. L'hémostase est souvent nécessaire au décours des opérations chirurgicales qui nécessitent le contrôle des saignements.

1. Applications

L'utilisation des plasmas dans ce domaine d'application a débuté il y a 30 ans par l'utilisation des plasmas chauds avec un dispositif très utilisé en chirurgie de nos jours. Il s'agit de l'APC (Argon Plasma Coagulateur) qui sert principalement à la découpe de tissu et à l'hémostase (figure 44). Son principe de fonctionnement repose sur l'effet thermique avec une dénaturation des protéines et une dessiccation des tissus [216].

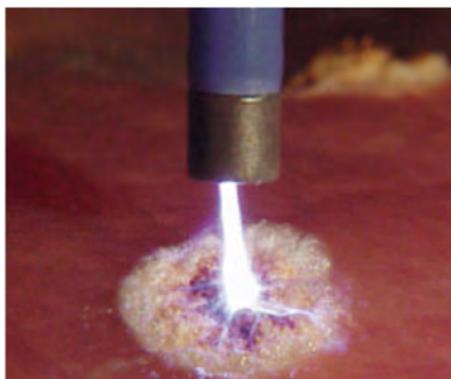


Figure 44 : L'APC en fonctionnement sur un tissu

La profondeur d'action est limitée à 2-3 mm, ce qui fait de ce système un outil relativement maniable et sûr. Les principales complications rapportées sont la douleur, les saignements, les perforations et le risque d'explosion [270-272]. Une coagulation avec des mécanismes d'action plus respectueux des tissus pouvant être un plus, des études récentes ont évalués l'intérêt du plasma froid dans ce cadre. Ces études ont montré qu'une température élevée n'est pas nécessaire pour la coagulation [273, 274]. En effet, l'application d'un plasma généré par DBD pendant 15s permet la formation immédiate d'un caillot sanguin (figure 45).

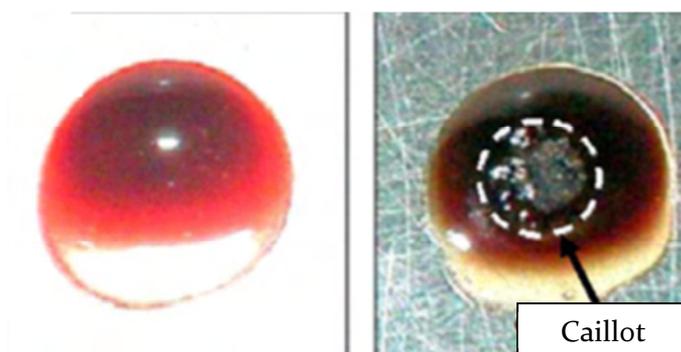


Figure 45 : Coagulation d'une goutte de sang totale. A gauche, une goutte de sang non traité, et à droite une goutte de sang traité pendant 15s au plasma [273].

Ces données obtenues *in vitro* semblent mettre en œuvre des processus de coagulation naturel et n'est absolument pas lié a un effet de la température du plasma. Les données obtenues ont été confirmées *in vivo* chez la souris SHK1. Dans cette étude, les auteurs ont réalisé une lésion sur la veine saphène et ont appliqué un traitement DBD de 15s (figure 46). Le traitement au plasma permet de stopper le saignement dès le début de l'application [273].



Figure 46 : Coagulation après traitement plasma chez la souris. A gauche avant le traitement et à droite après 15s de traitement avec la DBD [273].

Ces résultats ont par ailleurs été confirmés chez le rat lors d'une collaboration entre notre équipe et les laboratoires de F. Clément (LCABIE - IPREM / UMR 5254 – Université de Pau) et J.P. Cambus (Laboratoire d'Hématologie - CHU Rangueil U858/I2MR INSERM, Université Paul Sabatier). Nous avons observé une réduction significative du temps de saignement lors d'une incision standardisée de la queue chez le rat (figure 47). Le temps de saignement pour les rats CTRL est de l'ordre de 100s, alors que le temps de saignement est raccourci à 50s pour les rats traités avec le plasma Gun pendant une durée de 30s.

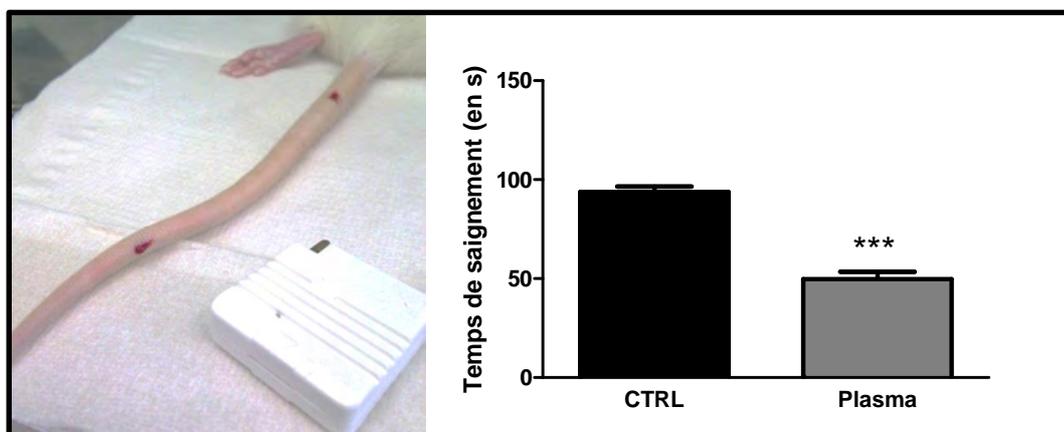


Figure 47 : Temps de saignements chez le rat. A gauche, une photo de l'incision standardisée sur la queue de rat. A droite, temps de saignement moyen pour les rats CTRL et traités au plasma. (n=12, moyenne +/- SEM)

2. Mécanismes d'action

Les mécanismes de coagulation résultant d'un traitement au plasma froid sont pour le moment très peu décrits dans la littérature. Une seule équipe s'est intéressé à ces mécanismes jusqu'à ce jour, et ceux-ci ne sont pas validés par l'ensemble de la communauté et peuvent prêter à discussion [217, 273, 274]. Il est cependant admis que le plasma induit une coagulation via un phénomène physiologique qui reste encore à définir. La température est

clairement écartée, l'élévation de température étant, comme déjà discuté auparavant, très faible. Par ailleurs, des expériences *in vitro* menées au sein du laboratoire en collaboration avec l'équipe de Pau, ont montré que les processus de coagulation étaient principalement liés aux RS générés par le plasma. Pour cela, nous avons réalisés des traitements direct et indirect de l'échantillon. Dans le cadre d'un traitement direct, le plasma est généré directement au contact de l'échantillon à traiter alors que pour un traitement indirect, du PBS est traité puis ce PBS est mis en contact dans l'échantillon. Lors de ce type de traitement, seuls les RS générés peuvent agir et l'échantillon n'est pas soumis aux autres composants du plasma comme les UV, le champ électrique... Les résultats obtenus, en effectuant une comparaison de l'efficacité d'un traitement direct vs indirect sur la coagulation ont montré un effet identique.

La production importante d'espèces ionisées par le plasma, en particulier des ions H⁺ conduit à une réduction importante et rapide du pH des milieux non tamponnés. Le pH pourrait promouvoir la coagulation en augmentant la concentration en ions calcium intervenant ensuite dans la cascade de la coagulation. Le dosage de la concentration en calcium pendant le traitement n'a cependant montré aucune variation, ce qui écarte un effet lié au seul calcium [274]. D'autre part, la variation de pH du sang au cours de traitement est également très faible [274]. Finalement les auteurs émettent l'hypothèse que le plasma pourrait interagir avec les protéines impliquées dans la coagulation. Une étude du fibrinogène suggère que le plasma entraîne une coagulation via une augmentation de la conversion de la protéine du fibrinogène en fibrine [274]. Ces données sont à confirmer par des études complémentaires.

III. Effets du plasma sur la peau et les cellules

Dans cette partie, l'effet du plasma sur les cellules de mammifères sera développé avec la tolérance du plasma sur les tissus, en particulier la peau puis les effets du plasma au niveau cellulaire sur les cellules non tumorales et pour finir tumorales.

A. Tolérance du plasma au niveau cutané

Ce point est particulièrement important dans le cadre du développement des différentes applications, en particulier dans le cadre de la décontamination de la peau et de la

cicatrisation. L'effet du plasma sur la peau en termes de tolérance a été étudié par différentes équipes afin de mettre en évidence l'inocuité de ce type de traitement. L'effet d'une décharge DBD a été étudié tout d'abord sur des prélèvements humains de peau issue de cadavres [217]. Un traitement de 5 min avec une DBD sur la peau n'induit aucun dommage visible et les coupes histologiques avec un marquage Hematoxylin Eosine (H&E) n'ont révélé aucune modification du tissu (figure 48).

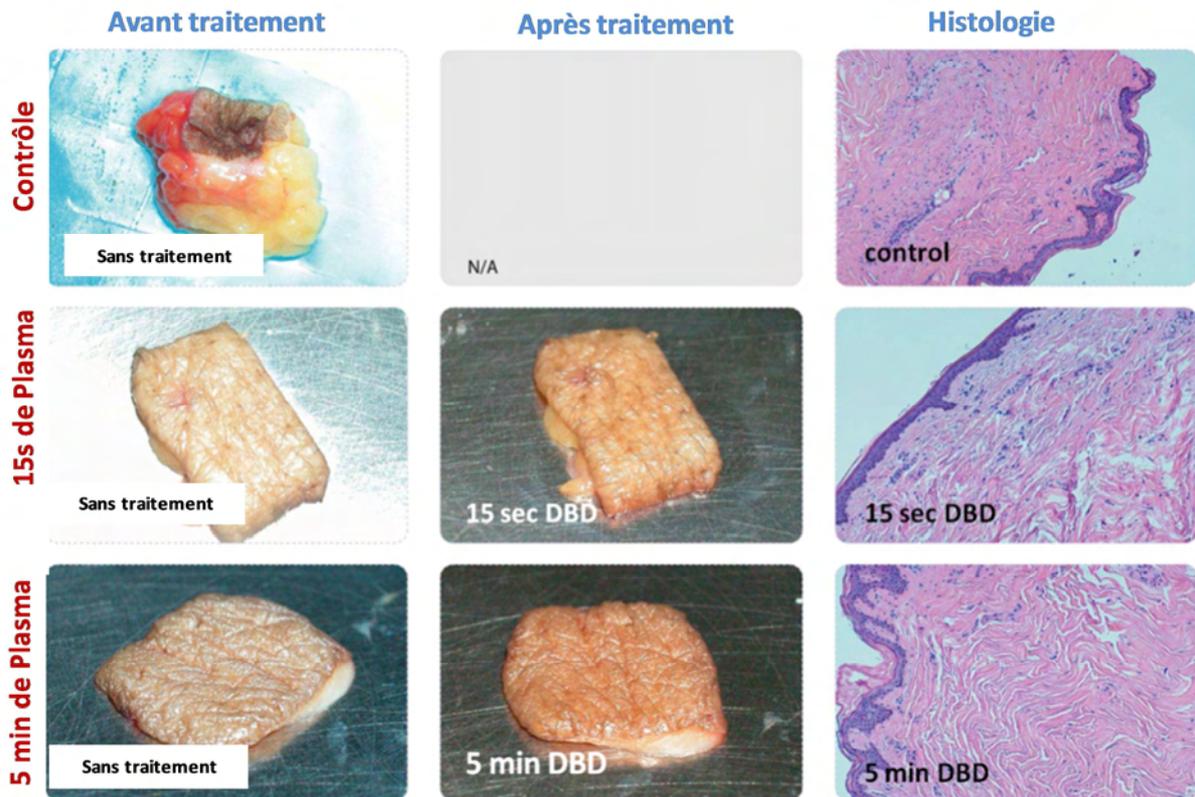


Figure 48 : Effets du plasma (DBD) sur la peau au niveau macroscopique et histologique. Adapté d'après [273]

L'effet du plasma au niveau cutané a ensuite été étudié chez la souris SHK1 avec des doses croissantes de plasma. De cette manière, la dose maximale a pu être déterminée avec le système utilisé (DBD). En effet, comme décrit précédemment, la composition du plasma pouvant être extrêmement modulable, ces résultats sont à considérer pour cette décharge donnée. La fréquence et la durée du pulse peuvent influencer de manière importante ces résultats [217]. Une dose maximale tolérée de 10 min avec une puissance de 0,6 W/cm² et de 40s avec une puissance de 2,3 W/cm² a été déterminée [217, 273]. Au delà, une détérioration importante du tissu et une brûlure ont été observées (figure 49). Il est important de rappeler

que la manière dont sont calculés les W/cm^2 ou les J/cm^2 peuvent varier d'une équipe à l'autre, aucune « norme » n'étant admise à ce jour.

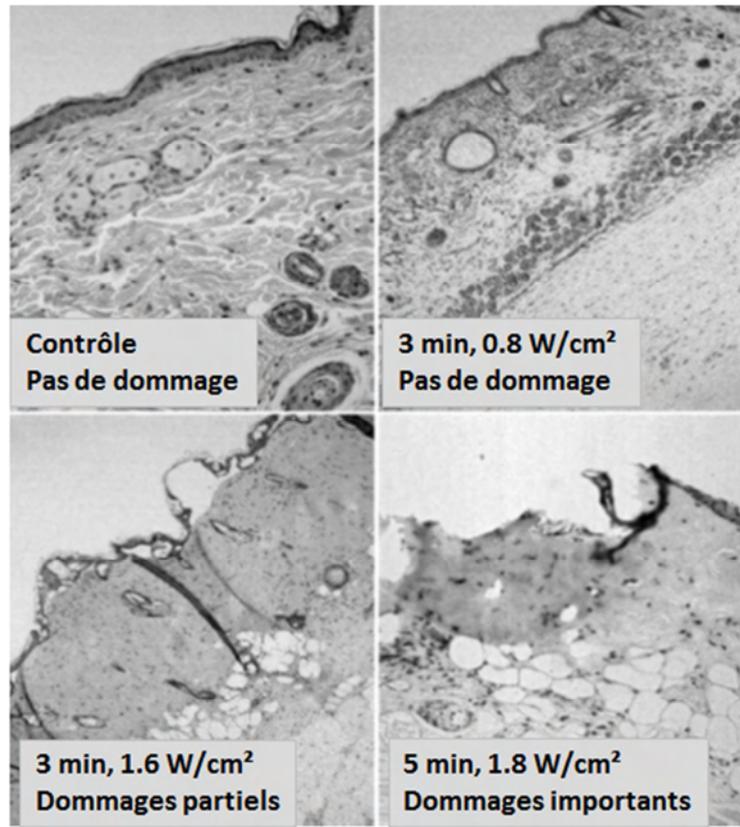


Figure 49 : Coupes histologiques de peau de souris traitées avec différentes doses de plasma [217].

Il est important de rappeler que la dose nécessaire dans le cadre de la stérilisation est de l'ordre de la minute au maximum, ce qui signifie que les doses efficaces en stérilisation sont 10 fois inférieures à la dose maximale tolérée. Ces études ont par ailleurs été confirmées par la suite sur la peau de porc vivant [275]. L'ensemble de ces données ont été intégrées dans un graphique récapitulatif qui reprend la puissance du plasma, la dose appliquée et les zones d'efficacité (figure 50). Les analyses tissulaires permettent de mettre en évidence des doses efficaces sans dommages, cependant les effets au niveau cellulaire des plasmas sont importants à déterminer.

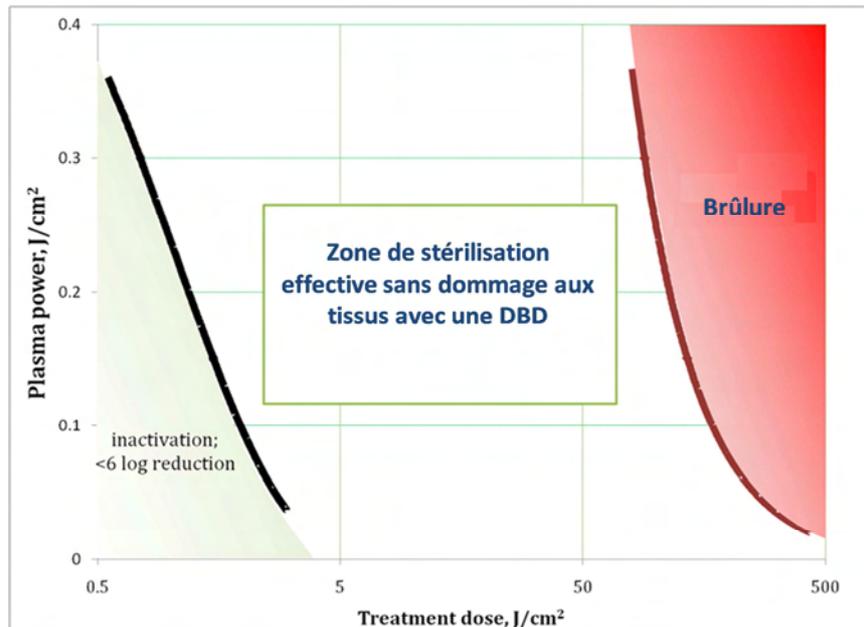


Figure 50 : Marge de manœuvre du traitement au plasma. Adapté d'après [266]

B. Effets du plasma sur les cellules

Le plasma peut avoir de nombreux effets au niveau cellulaire et ces effets sont particulièrement dépendants de la dose appliquée. Ils peuvent aller d'expositions non dommageables pour la cellule, à des traitements où les cellules sont seulement affectées, et avec des doses plus élevées, à l'induction d'une mort cellulaire importante [266]. Les mécanismes impliqués dans la réponse à ces différentes doses de plasma sont à ce jour peu décrits.

Les données *in vitro* sur des fibroblastes, des cellules endothéliales ou encore des cellules de muscle lisse montrent que les cellules sont affectées par le plasma d'une manière dose dépendante. En exposant les cellules à un plasma jet d'hélium de faible intensité, un détachement des cellules de leur substrat est observé [276-280]. Ces cellules restent viables et possèdent la capacité de réadhérer et de proliférer à nouveau [281]. Ces cellules détachées adopte une forme circulaire proche de celle observée lors du traitement des cellules avec de la trypsine (figure 51).

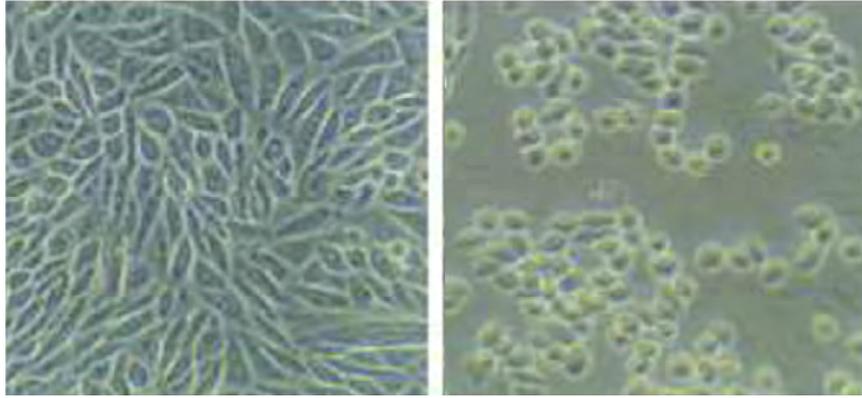


Figure 51 : Morphologie des cellules avant (photo de gauche) et après 5s d'exposition au plasma (photo de droite). Adapté d'après [276]

Yonson et al, ont également observé que durant cette phase les cellules deviennent perméables de manière transitoire [281]. Des études de transfection ont d'ailleurs rapportées une efficacité de l'ordre de 20% avec l'utilisation de plasma froid comme agent de transfection. La transfection d'ADN a été réalisée avec succès par une autre équipe sans altération de la viabilité cellulaire [282]. Une formation de pores membranaires permettant le passage de molécule hydrophile a été décrite dans le cadre de ces études [282, 283]. Ces données sont à la fois très encourageantes dans le cadre du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour délivrer des molécules (ADN, ARN,..) dans les cellules *in situ*, mais soulèvent également des questions sur ce phénomène transitoire dans le cadre de la stérilisation de tissus.

L'adhésion des cellules aux substrats repose sur les molécules d'adhésions cellulaires (CAM), en particulier les intégrines (contact cellules substrat) et les cadhérines (contacts cellules – cellules). Deux hypothèses sont avancées pour expliquer le phénomène de détachement cellulaire après traitement plasma. Dans la première, la génération de RS par le plasma puis l'interaction de ces RS provoqueraient un stress oxydant au niveau des molécules d'adhésion et induiraient ainsi leurs destruction. Cependant, des études récentes ont montré que cet effet était également observé en présence d'antioxydant qui empêche l'action de ces ROS [280]. De plus, ce phénomène semble du type cellulaire indépendant, dépend du type de décharge utilisé en particulier de la présence d'un champ électrique ou non. Ces données suggèrent une validité plus importante de la deuxième hypothèse qui repose sur un phénomène physique et non biologique. Le détachement cellulaire serait lié à la présence du champ électrique et des particules chargées qui, en interagissant avec la membrane plasmique, provoqueraient une déformation de la cellule pour minimiser les forces électrostatiques mises en jeu. La cellule adopterait ainsi une configuration sphérique conduisant à son détachement

[261, 276]. A la différence des bactéries, les cellules eucaryotes tolèrent les charges électriques [264], ce qui explique que les cellules restent viables et ont la capacité de réadhérer à la matrice bien qu'elles subissent un stress mécanique important.

A coté de ses modifications d'adhésion et de la perméabilisation cellulaire, une inhibition de la migration cellulaire a été observée [278]. Avec des doses de plasma plus importantes, une induction d'apoptose ou de nécrose a été décrite par plusieurs équipes [278, 284]. L'apoptose induite intervient dans des délais tardifs entre 12 et 18h après traitement et même jusqu'à 72h après pour des fibroblastes [284]. Le type de mort cellulaire impliqué semble dépendant de la dose de plasma appliquée. Un graphique (figure 52) récapitulant l'effet du plasma sur la survie en fonction de la dose a été établi par l'équipe de Fridman [266].

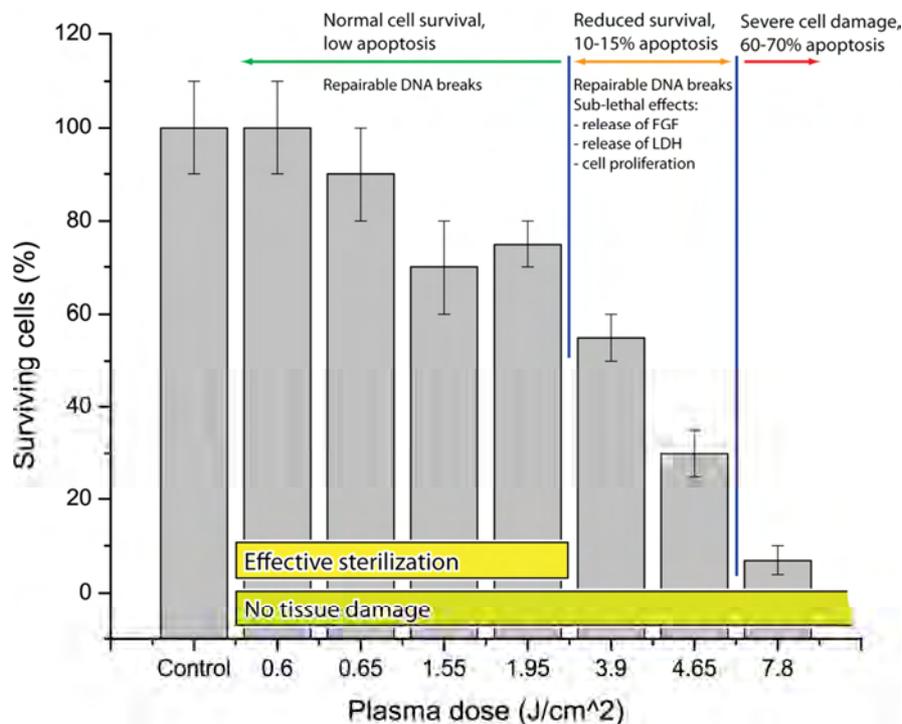


Figure 52 : Récapitulatif des effets de différente dose du plasma sur les cellules de mammifères.
[266]

D'autre part, à l'inverse de hautes doses capables d'induire de l'apoptose, de faibles doses de plasma sont capables de stimuler la prolifération cellulaire. Cette donnée a été observée sur des fibroblastes mais également sur des cellules endothéliales *in vitro* [285, 286]. Cette augmentation de la prolifération cellulaire résulte de l'expression et du relargage par les cellules traitées de facteurs de croissance dont le FGF-2. Le plasma *via* la production de ROS dans le milieu extracellulaire est capable d'induire des changements importants dans la

signalisation cellulaire. Les auteurs ont montré qu'en augmentant les doses de plasma, une importante mort cellulaire des cellules endothéliales est induite [285]. Le rôle des RS dans cet effet a par la suite été confirmé par une autre étude qui a montré que le plasma était capable de générer dans le milieu des espèces telles que le H_2O_2 , OH^\bullet , O_2^- , ONOO^- , et NO_2^- . L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a ensuite mis en évidence l'importance du $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^\bullet$ dans la prolifération induite par le FGF-2 libéré après traitement plasma [287]. Ces données sont à mettre en relation avec l'effet stérilisant du plasma dans le cadre de la cicatrisation. La stimulation de la régénération tissulaire peut passer par ce type de mécanismes.

Il existe encore peu de publications sur les mécanismes d'action du plasma au niveau de la cellule et les composants du plasma impliqués dans les effets observés ne sont pour le moment pas encore clairement définis. De nombreux travaux sont encore nécessaires, cependant, tout comme les bactéries, l'effet principal du plasma sur les cellules serait d'après la littérature dépendant de la génération de RS par le plasma.

C. Effets du plasma sur les cellules cancéreuses

Il existe très peu d'études concernant l'utilisation du plasma froid pour le domaine de l'oncologie. La première publication rapportant un effet du plasma sur des cellules tumorales date de 2007 [223] et rapporte que le plasma froid possède une activité anti-tumorale *in vitro* sur des cellules de mélanome en utilisant un plasma généré par FE-DBD. Cet effet anti-tumoral est lié à une importante induction d'apoptose pour des doses intermédiaires et à une mort par nécrose pour des doses plus élevées [223]. Ces données sont proches de celles observées pour les cellules non tumorales. Les auteurs se sont intéressés à l'influence du pH dans le déclenchement de l'apoptose. En effet, comme discuté précédemment, le plasma produit des H^+ qui vont faire chuter rapidement le pH de la solution traitée comme cela est présenté sur la figure 53. Cette diminution pourrait être à l'origine de l'apoptose induite mais cette hypothèse a rapidement été écartée, un pH de l'ordre de 5,4 n'ayant aucun effet sur la viabilité cellulaire. Les auteurs ont par ailleurs montré l'importance du volume de milieu dans lequel sont baignées les cellules pendant le traitement, suggérant ainsi le rôle que peut avoir les espèces générés par le plasma dans la mort cellulaire induite.

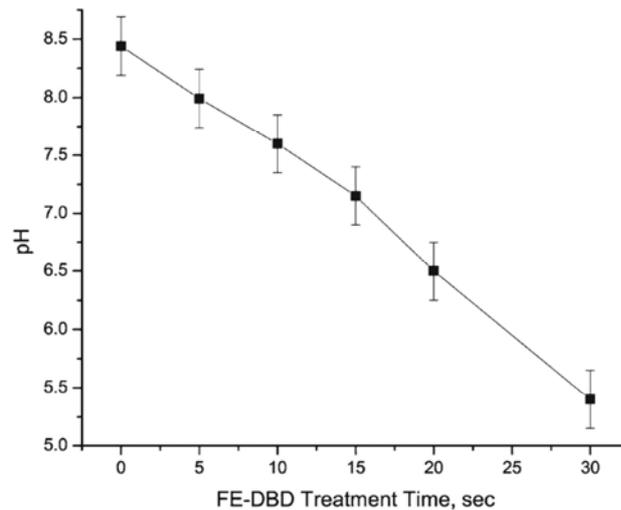


Figure 53 : Variation de pH du milieu de culture pendant le traitement plasma. Adapté d'après [223]

Cette publication est le point de départ de l'ensemble du travail mené au cours de cette thèse et suggérait le potentiel prometteur du plasma en cancérologie bien qu'aucune donnée ne soit disponible sur cet effet *in vivo*. Une autre publication portant également sur le traitement de cellules de mélanomes a décrit une induction d'apoptose après traitement au plasma [288].

D'autres publications apportant des informations sur le rôle des RS dans l'apoptose induite dans le cadre du traitement de cellules tumorales ont été publiées par la suite mais elles ne seront abordées que dans la partie discussion, celles-ci ayant été publiées en parallèle de nos travaux présentés dans la partie suivante.

IV. Conclusions

La thématique plasma médecine est actuellement en plein essor, dans des domaines d'application potentiels de plus en plus variés. Le champ d'application 'historique' en stérilisation est aujourd'hui bien avancé avec des essais cliniques qui paraissent prometteurs. Les autres domaines sont en cours de développement et le nombre grandissant de publications témoigne du dynamisme de la thématique. Dans le contexte de cette thèse, nombre d'informations développées dans cette première partie n'était pas disponibles et/ou connues au moment de la réalisation des travaux et peuvent d'ailleurs encore aujourd'hui prêter à discussion. Quoi qu'il en soit, la possibilité de générer un plasma avec une source DBD ou

encore avec le plasma Gun au niveau de la zone à traiter et les potentialités biomédicales fait du plasma froid une alternative thérapeutique attrayante pour un grand nombre de pathologies. C'est dans ce cadre, avec la connaissance de l'importance des ROS dans les effets anti-tumoraux observés après radiothérapie ou encore la PDT, que l'intérêt du plasma froid en tant que nouvel agent anti-tumoral a été évalué.

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJECTIFS

Le cancer est encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique qui représente à la fois un coût économique pour la société mais surtout un coût considérables en termes de vies humaines. Les cellules tumorales possèdent une large variété de dérégulation qui leur permet de proliférer, de résister à l'apoptose ou encore de se propager dans l'organisme. Les traitements disponibles pour ces pathologies dépendent du type tumoral et prennent en compte les caractéristiques tumorales. Après la chirurgie, une chimiothérapie et éventuellement une radiothérapie sont administrées afin de permettre si ce n'est une réduction, du moins un contrôle tumoral. Les développements récents de nouvelles molécules font intervenir des thérapies dites ciblées qui visent des caractéristiques tumorales précises comme la voie de l'EGF-R. A l'inverse, la radiothérapie est une stratégie dont le mécanisme d'action repose en grande partie sur les propriétés oxydantes des ROS générés au niveau cellulaire qui vont agir sur un nombre très important de processus cellulaires.

Dans ce contexte, l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques est nécessaire, en particulier celles basées sur des phénomènes physiques permettant d'avoir un angle d'attaque original en s'appuyant sur un mécanisme d'action global au niveau cellulaire mais qui conduit à un traitement localisé au niveau tumoral.

Dans la démarche du développement d'une nouvelle thérapie, le premier objectif de ce travail a été d'évaluer la tolérance des plasmas froids. Ces études ont été réalisées chez la souris pour définir la tolérance que ce soit au niveau de l'organisme entier ou encore au niveau du tissu traité. La détermination de la tolérance au niveau cutané a été menée afin de définir l'effet de doses croissantes de plasma sur les paramètres de l'inflammation. Les doses maximales tolérées pouvant ainsi être déterminées et devraient permettre l'élaboration d'un protocole de traitement réaliste qui sera applicable par la suite. L'évaluation de la faisabilité d'une application *in situ* du plasma au niveau pulmonaire a également été conduite et a permis de déterminer les doses acceptables par ce tissu particulièrement sensible.

A partir de ces résultats, le second objectif a été de déterminer si le plasma possède une activité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo*. Deux sources de plasma différentes disponibles, le plasma DBD et le plasma gun, permettent d'envisager différents types de traitement en

fonction de la source utilisée. L'activité antitumorale de la DBD et du plasma gun a été évaluée *in vitro* sur différentes lignées cellulaires cibles. La lignée U87-MG qui est un modèle de gliome possédant une résistance à la chimio et à la radiothérapie importante et les lignées H460, HCT-116 et Mia PACA qui sont respectivement des modèles de tumeurs du poumon, du colon et du pancréas. Les mécanismes d'action au niveau cellulaire ainsi que les composants du plasma impliqués dans ces effets ont été étudiés en analysant principalement les effets du plasma sur l'ADN, le cycle, la prolifération et l'apoptose.

L'évaluation de l'activité antitumorale *in vivo* a été réalisée tout d'abord sur un modèle de tumeur cérébrale implanté en sous cutané chez la souris *nude* en utilisant la source DBD. Nous avons ensuite étudié les mécanismes d'action associés à cet effet *in vivo*, en particulier en termes d'induction d'apoptose et de modifications du cycle cellulaire.

Pour finir, nous avons évalué l'activité des plasmas froids sur des modèles de carcinome colorectal et de carcinome pancréatique implantés en situation orthotopique chez la souris *nude* afin de réaliser des traitements pertinents vis-à-vis de la situation clinique mais également des caractéristiques tumorales (hypoxie, vascularisation...).

Chapitre 4 : Étude de tolérance des plasmas froids

La première approche dans le cadre de l'évaluation des plasmas froids comme agent anti-tumoral est d'étudier ses effets en termes de tolérance avec la détermination des doses que l'on pourra appliquer par la suite.

I. Publication sur la tolérance

Les travaux menés sur la tolérance ont conduit à la rédaction d'un article scientifique publié en 2010 dans un numéro spécial « Plasma Médecine » du journal *Plasma Processes and Polymers* et qui est présenté ci-dessous (IF= 4.0)

Cet article est le premier de l'équipe dans la thématique plasma médecine et aborde la tolérance du plasma sur la souris ainsi que les résultats préliminaires en termes d'efficacité antitumorale du plasma sur un modèle de gliome malin (U87) greffé en sous cutané. Les résultats concernant l'efficacité antitumorale dans cette première publication seront développés dans le chapitre 6 avec les deux articles suivants. Il était important dans un contexte novateur de se positionner rapidement, la démonstration de l'activité antitumorale du plasma *in vivo* n'ayant jamais été rapportée.

La première partie de l'article détaille la source plasma utilisée. Il s'agit d'une FE-DBD possédant une tension de 17kV avec une fréquence pouvant varier de 1 Hz à 1300Hz. La fréquence choisie pour cette étude est de 100Hz, la puissance ainsi déposée est de 1,6 W/cm², la surface de traitement étant de 2,5 cm². Les caractérisations de la tension et du courant ont été établies en fonction de la fréquence de traitement (de 1 à 1300 Hz) pour vérifier que ces paramètres étaient inchangés en fonction de la fréquence. Une tension de 17 kV avec un courant de 1,5A était délivrée par le générateur.

Une étude spectroscopique a ensuite été réalisée pour déterminer les espèces présentes dans le plasma produit. Cette étude a montré une contribution importante de l'azote, mais également une présence faible d'UVA, UVB et UVC qui ne peut cependant pas être négligée. En faisant varier la fréquence, nous avons observé que le spectre ne présente pas de variation significative suggérant que la composition du plasma reste identique. Une modulation des espèces générées dans le plasma a ensuite été effectuée en générant le plasma dans un mélange air/argon. Ce mélange permet de générer une quantité importante de OH et de NO excités et augmente en même temps la présence des UV.

L'évaluation de la tolérance du plasma a été réalisée chez la souris par un suivi du rythme respiratoire et cardiaque, en effet en raison du courant électrique dans le plasma, de faibles contractions musculaires au niveau de la zone traitée sont observées chez la souris au cours de l'exposition au plasma et une incidence sur le diaphragme et la fonction cardiaque étaient donc suspectées. Le traitement ne provoque pas d'effets indésirables majeurs, les rythmes respiratoires et cardiaques ne sont pas impactés par le traitement.

L'effet du plasma a ensuite été évalué au niveau cutané, un traitement de 20 min à 100 Hz ne provoquant pas de dommages visibles immédiats. Cependant la répétition de ce traitement pendant 3 jours consécutifs induit une brûlure importante et une desquamation. Pour comprendre la cause de cette brûlure, la température sous cutanée au niveau du site d'exposition a été mesurée au cours du traitement. Une augmentation locale de la température de l'ordre de 4°C intervient dès la première minute puis cette température se stabilise pendant le reste du traitement. Dès l'arrêt de l'exposition au plasma, un retour à la température normale intervient dans la minute.

Le plasma générant un nombre important d'espèces et provoquant une diminution rapide du pH, le pH cutané et sous cutané a été mesuré après traitement. Le pH diminue rapidement d'un pH neutre (pH 7.0) à un pH acide de l'ordre de pH 2.0. De manière surprenante, le pH sous cutané varie d'un pH 7 à un pH 8,5 suggérant un transfert d'espèces différentiel à travers la peau. La toxicité cutanée du plasma semble liée à cette diminution du pH, et dans une moindre mesure, à l'augmentation de température et à l'exposition aux UV.

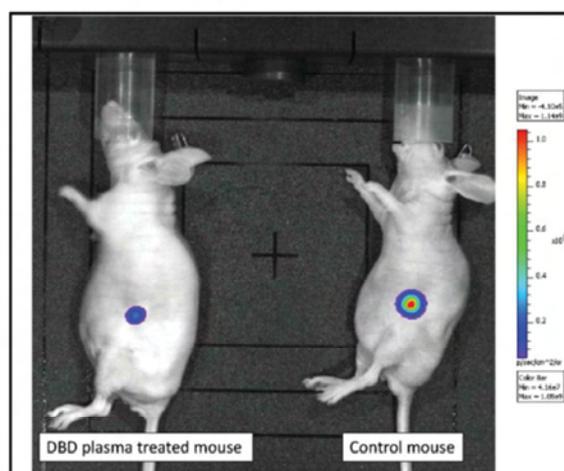
A partir de ces paramètres et afin de limiter la toxicité du plasma, une exposition de 6 min a été appliquée dans le cadre de l'évaluation de l'activité anti-tumorale du plasma. Afin de limiter l'impact de la température pendant le traitement, la dose de 6 min est appliquée en 3 fois 2 minutes séparées d'une minute. Cette exposition n'induit pas de dommages visibles au niveau de la zone de traitement. L'effet anti-tumoral du plasma a alors été évalué sur un type tumoral présentant une forte chimio et radorésistance, un modèle de glioblastome (U87-MG). L'activité tumorale a été évaluée par imagerie de bioluminescence (BLI). Après la première dose de plasma, une augmentation de la BLI a été observée suggérant une réoxygénation tumorale comme cela est observé après radiothérapie. Après 5 jours de traitement, une diminution de la BLI est observée, traduisant l'activité anti-tumorale du plasma.

La discussion porte sur la place des différents composants du plasma dans l'effet anti-tumoral observé.

Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results

Marc Vandamme,* Eric Robert, Sabrina Pesnel, Emerson Barbosa, Sébastien Dozias, Julien Sobilo, Stéphanie Lerondel, Alain Le Pape, Jean-Michel Pouvesle

This work was conducted to evaluate the potential antitumor effect of an *in vivo* plasma treatment on a U87-luc glioma tumor. A pulsed DBD with μs pulses at moderate power was used for treatment. Electrical analyses and spectroscopic measurements were realized to characterize plasma properties. We showed that the plasma treatment was safe for mice. However, the reiterated long time plasma treatment (20 min, 3 consecutive days) produces a superficial burn. During plasma treatment, we observed an increase of subcutaneous temperature and a cutaneous skin pH reduction. After 5 d of plasma treatment, we observed a dramatical U87 bioluminescence decrease associated with a reduction of tumor volume in U87 glioma-bearing mice.



Introduction

In Europe, estimated new cancer cases in 2006 were about 3.2 million and represented 1.7 million of deaths.^[1] In the past decades, progresses in medical field have led to earlier diagnosis and better therapeutic care. However, in some tumor types, outcome remains poor for the majority of cancers, especially when recurrence occurs.^[1] To increase cancer patient survival, improvement of current therapies and new therapeutic concepts are needed. Current research efforts are focused on the development of cancer specific

therapies with little or no toxic side effects. In this context, we evaluated the interest of a local treatment with non thermal atmospheric pressure plasma as an antitumor treatment.

Over the past few years, non thermal atmospheric pressure plasma (NTAPP) has emerged as a novel promising tool in medicine.^[2] Plasma as an active ionized medium sustained by supply of energy in various forms (electric, thermal, radiative...) containing free charges (electrons, ions), free radicals, excited molecules and energetic photons (UV) can induce processes usually obtained through chemical treatment or radiotherapy. Many medical NTAPP applications are currently under study. For example, plasma sterilization is a well known effect. Application of plasma has been shown to be effective in sterilization of *E. coli*, and a number of other microorganisms.^[3–6] This effect, in atmospheric plasma bacterial inactivation is mainly due to the membrane damage induced by reactive oxygen species (ROS). NTAPP have also recently proved their

M. Vandamme, E. Robert, E. Barbosa, S. Dozias, J.-M. Pouvesle
GREMI UMR-6606 CNRS, Université d'Orléans, 14 rue d'Issoudun -
BP 6744, 45067 ORLEANS cedex 2, France

Fax: 33.(0).2.38.41.71.54; E-mail: marc.vandamme@cnrs-orleans.fr

M. Vandamme, S. Pesnel, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape
TAAM-CIPA, UPS44 CNRS, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 ORLEANS
cedex 2, France

efficacy in blood coagulation by catalyzing the natural blood coagulation processes.^[7]

Plasma can be applied on both medical instrumentation and living tissues. For instance, Fridman et al.^[8] have demonstrated that plasma can be applied directly to a living human tissue without thermal nor chemical damages and that plasma is completely safe from the electrical point of view. Kieft et al.^[9,10] investigated the possibility to apply a plasma needle directly to living tissues using Chinese hamster ovarian cultured cells (CHO-K1) as a model system. They showed an instantaneous detachment of cells from the surface for low doses of plasma (< 0.2 W), while higher doses induces severe damage and necrosis. An induction of apoptosis on 3T3 mouse fibroblast was also demonstrated 24 h after plasma needle treatment.^[11] Active plasma ingredients could be responsible of this effect, such as UV radiation or ROS production inducing apoptosis.^[12,13] These encouraging results prompt authors to investigate plasma effect in cancer treatment. Pioneer studies have provided encouraging results. For example, a plasma-induced apoptosis in melanoma cell line has been obtained with the use of a floating electrode dielectric barrier discharge: FE-DBD plasma.^[14] These results were recently confirmed by another group who has demonstrated that plasma treatment induced cell death in a melanoma cell line.^[15] Mechanisms underlying this apoptotic process in these cancer cell lines remain rather unclear and need further investigations.

These encouraging results dealing with *in vitro* induction of apoptosis on different cell lines, led us to perform *in vivo* plasma tolerance assessment and, to the best of our knowledge, a first preliminary approach on potential antitumor effect of non thermal plasma treatment.

To this end, we used a pulsed DBD device very close to that of the Drexel University system.^[7] Plasma production occurs at atmospheric pressure in air when sufficiently high voltage is applied between the floating potential mouse skin and the high voltage electrode, which is covered by a dielectric material. At the high voltage used in this work, discharge ignites when the powered electrode approaches the surface to be treated at a distance of less than about 3 mm. In this configuration, discharge can occur in various gases or gas mixtures (including noble gases like argon) without substantial heating of the gas. While in this work, air plasma treatment was applied for antitumor effect study, air-argon plasma characterization, using the same DBD setup, is proposed to emphasize the versatility of our system and its potential for future work dedicated to the discrimination between different plasma species action. U87-MG glioma cell line was chosen to perform *in vivo* antitumor studies. Heterotopically grafted, this cancer cell line presents a hemispherical growth that is a well suited configuration for treatment with plasma. A pulsed FE-DBD with μ s duration pulse delivering about 1 W, was used for

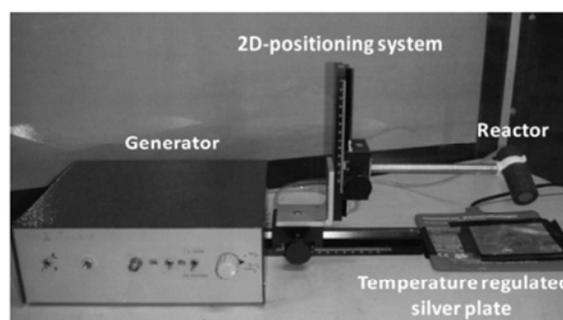
antitumor treatment. The compact generator allows plasma applications over a wide range of repetition rate extending from single shot up to 1 300 Hz. In this work, we first characterized the plasma generated by the developed FE-DBD system, through electrical and spectroscopic measurements. Then, we evaluated mouse whole organism and skin tolerances to long time plasma treatment (20 min, 3 consecutive d). Finally, we investigated whether plasma treatment induced an antitumor effect in an *in vivo* tumor model.

Experimental Part

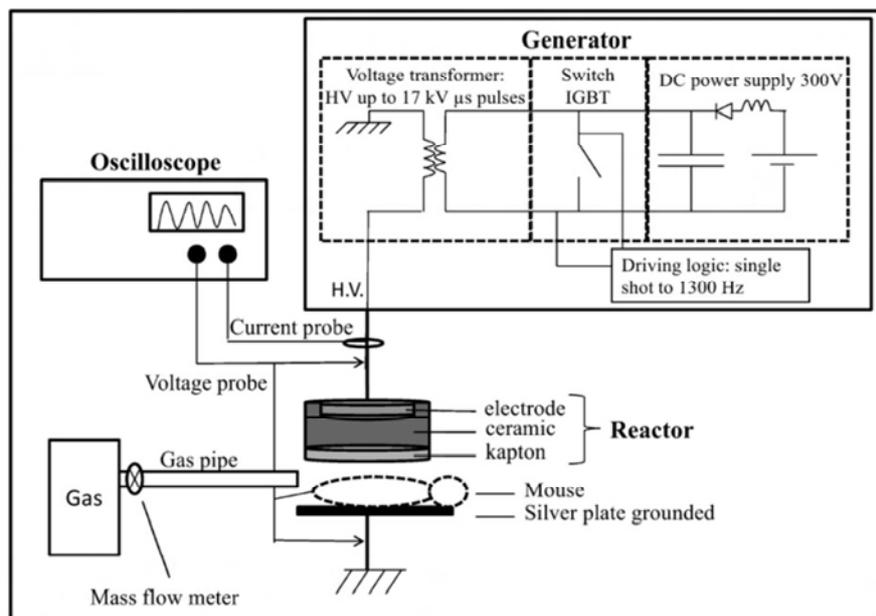
Experimental Set-up

Figure 1 presents the entire experimental equipment and Figure 2 represents the DBD power supply schematic. The electrical driver articulates around three main sub-assemblies: 1) DC power supply; 2) Switching system; 3) Pulse transformer. A 300 V DC power supply associated with a doubling inductance circuit is used to charge a 220 nF capacitor under 600 V. The fast discharge of this capacitor is triggered at a variable repetition rate through an IGBT switch in the primary coil of a transformer which allows to obtain voltage pulse reaching up to 17 kV in the present set-up. The high voltage pulse is applied on an HV voltage electrode embedded in a 8 mm thick barium titanate ceramic layer covered by a thin polyimide film (25 μ m thick Kapton). This system generates plasmas between the reactor and the skin of a mouse which is placed on a ground plate electrode. This DBD system can produce discharges whose frequency can vary from single shot to 1 300 Hz. The energy stored in the DC powered capacitor multiplied by the generator repetition rate provides the maximum available power. For a pulse repetition rate of 100 Hz, the maximum power available is 4 W, leading to a maximum power density of ≈ 1.6 W \cdot cm⁻², when considering a uniform distribution of the discharge over the 2.5 cm² surface of the reactor. This rough estimate indicates the maximum mean power density as it neither accounts for the random filamentary nature of the DBD discharge, nor for the power losses associated with the impedance mismatching between the driver output and the DBD reactor.

For all tests discussed in this paper, reactor surface was positioned 2 mm above the sample to be treated using a 2D positioning system. Non-thermal plasmas were generated in



■ Figure 1. Experimental equipment used to produce DBD plasmas.



■ Figure 2. Schematics of the DBD set-up and of the pulsed power supply.

atmospheric pressure gases, including ambient air or air-gas mixtures involving gases commonly found in biomedical and clinical environment (argon, helium, oxygen). For air gas mixture experiments, an additional 4 mm inner diameter plastic pipe was set in the vicinity of the plasma zone. The outlet of this pipe was located on the outer diameter of the dielectric wall of the DBD reactor, while the longitudinal axis of this pipe was aligned 1 mm below the dielectric wall surface, as depicted in Figure 2. Gas flow rate was monitored through a gas mass flow meter (5850TR, Brooks Instrument).

Diagnostics

As shown in Figure 2, a high voltage probe (Tektronix P6015A, 75 MHz bandwidth) and a current probe (Tektronix TCP202, 50 MHz bandwidth) were used to characterize the voltage and current waveforms delivered across the DBD reactor. Both probes were connected to an oscilloscope (Tektronix TDS510A). Spectroscopic analysis was performed with a spectrometer (SpectraPro VM-504, Acton Research Corp.) connected to an intensified CCD camera (PI-Max, Princeton Instruments) and a controller (ST-133, Princeton Instrument). The spectrometer had a focal length of 390 mm and was equipped with two gratings (300 and 1200 grooves mm^{-1} , respectively). Emission intensity was collected perpendicularly with respect to the discharge axis over a broad range of wavelengths (from 200 to 900 nm) at a distance between the plasma and the spectrometer entrance slit of 45 cm.

In vivo Studies

Athymic Balb/c nude and C57bl6 mice, 7–8 weeks of age, were purchased from Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France)

and acclimated for at least 1 week in laboratory before experimentation. Animals were housed in plastic cages inside a controlled ventilated rack (Allentown, USA) with free access to tap water and food ad libitum. Room temperature was set at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and animals were subjected to a 12-h light cycle. All experiments were performed in accordance with international animal care and use guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree no. 87-848). Tumor grafts, plasma treatment and bioluminescence imaging were performed under mouse general anesthesia obtained with 3% isoflurane (Aerrane, Baxter, Deerfield, IT, USA).

Plasma Treatment Procedure

Anesthetized mouse was placed on a humidified temperature regulated silver plate to improve conductance and prevent mouse hypothermia. This plate

was connected to the ground of the plasma generator and the plasma reactor was mounted on a 2D-positioning system allowing displacements in the millimetre range. Treatments on mice were performed in open air, reactor head being at a distance of two millimeters from the skin (Figure 1). This 2 mm separation was controlled through the 2D positioning system with a 0.25 mm accuracy. Due to the mouse breathing and the non purely flat geometry of the skin and tumor, variation of about 0.5 mm can be estimated to occur during plasma treatment. While the gap thickness is known to have dramatic influence on the plasma characteristics, no precise monitoring of this parameter appears likely to be achieved on a living animal. The application of a few tens of thousands discharges during treatment is thought to result in an average reproducible gap and allow for a randomization of the streamer paths over the skin surface.

Cardiac and Respiratory Frequencies

Respiratory cycle and cardiac rhythm were determined with a BioVet (USA) device, the respiratory sensor being positioned facing the diaphragm on the ventral face of the mouse. Data was recorded before and during plasma treatment (3 times 2 min at 100 Hz).

Temperature and pH Measurement Procedures

Temperature measurements were realized with a thermistance previously calibrated with an accuracy of 0.1°C (Ret-1, Physitemp Instruments, Inc.). We have verified that the electric fields generated by plasma have no influence on subcutaneous temperature measurement and that the device did not interfere with plasma generation. However, plasma disturbs the device

operation during surface skin temperature measurements, thereby precluding any accurate measurement on mice surface skin. We thus performed only subcutaneous temperature measurements. In anesthetized mice, a small incision was performed at the base of the tail and the thermistance was introduced subcutaneously and positioned under the irradiated zone. To perform pH measurements, a constant water drop volume of 10 μL was deposited with a pipette (Research 10 μL , Eppendorf) on the skin surface. After 10 s, we collected the drop and then put it down on pH test strip having an accuracy of 0.5 pH (Alkalit, Merck). To measure the subcutaneous pH, a small incision was realized in irradiated zone and pH was measured both on the inner face of the skin and on the subjacent tissues with the same method.

Grafts and Antitumor Effect

The U87-Luc is a human malignant glioma cell line (ATCC-HTB-14). This cell line purchased from Caliper (USA) is stably transfected with firefly luciferase gene. A suspension of U87-luc human malignant glioma cells (4×10^6 cells in 0.1 mL 0.9% NaCl) was injected subcutaneously into flanks of Balb/c nude female mice. To evaluate the tumor growth, tumor volume was determined during treatment course. Two perpendicular diameters were measured with a caliper and tumor volume (V in mm^3) was calculated as $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$. Treatment started when tumors reached a volume of $150 \pm 50 \text{ mm}^3$. In vivo bioluminescence imaging (BLI) was performed before, and then 24 h after plasma treatment completion. Mice were anesthetized to obtain a prolonged immobility. They were intraperitoneally injected with 2 mg beetle luciferin (potassium salt, Promega). Ten minutes later, bioluminescence analyses were carried out using an ORCA II BT C4742-98-26 LW (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Data acquisition was achieved using HiPic software (Hamamatsu Photonics). Merging of bioluminescence images and regions of interest quantification were obtained using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Bioluminescence allowed for the evaluation of very early stages of antitumor effect prior to physical reduction of the tumor and bioluminescence intensity is closely dependant on the tumor activity.^[16]

Results and Discussion

Plasma Characterization

Voltage and current signals recorded at 100 Hz are displayed in Figure 3. The DBD plasma discharge is ignited by the application of a μs duration high-voltage (17 kV) pulse. The rising edge of this voltage pulse is a critical parameter; the faster the rise is, the higher is the amplitude of the current pulse which develops in this early stage of the pulse application. With the pulsed driver used throughout this work, the voltage rise time is 1.5 μs , while the voltage damping lasts for about 30 μs . The current signal includes a 1.7 A peak amplitude pulse with a FWHM of 1 μs , and a smaller and longer negative component, designed as the second phase of the current waveform, starting simulta-

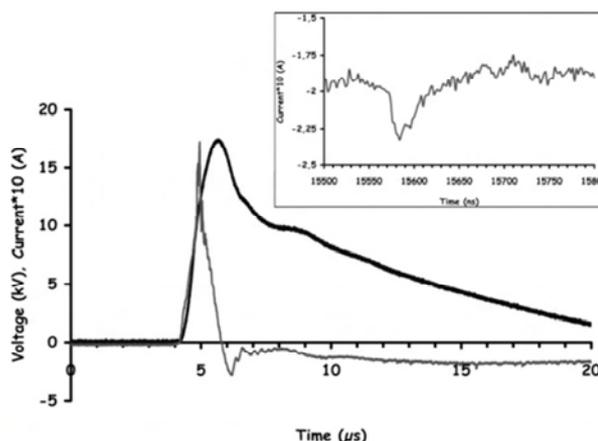


Figure 3. Voltage (dark line) and current (grey line) signals measured for a pulsed driver repetition rate of 100 Hz. The insert presents a temporal zoom of the current signal from 15.5 μs to 15.8 μs instants.

neously with the voltage peak and lasting to the end of the voltage pulse. The integration of the instantaneous power, inferred from the product of the voltage and current signals during the main discharge event about one microsecond in duration, indicates that 1.1 W of power should be coupled to the plasma discharge (corresponding to a power density of $\approx 0.4 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$). It has been measured, and it can be inferred from a careful observation of data in Figure 3, that the early current pulse includes many nanosecond duration current spikes, generally associated with the streamer nature of the DBD discharges, whose analysis would require a higher bandwidth detection system. The filamentary structure of the discharge is also confirmed by the visual observation of the air plasma. The generation of nanosecond spikes is also observed during the second phase of the current waveforms. The insert in Figure 3 presents a zoom on one of the nanosecond spikes observed during the second phase of the current pulse. The FWHM of this spike is of 20 ns; this value having no strong physical signification, as it corresponds to the current probe bandwidth limitation (50 MHz). The streamer associated spikes occur with time jitter of a few tens of nanoseconds with respect to the pulse onset from one shot to another. Besides this jitter, the overall temporal profiles of both the voltage and current waveforms presented in Figure 3, are very reproducible from one shot to another. It was verified that voltage and current waveforms, very similar to those presented in Figure 3 for 100 Hz repetition rate, were measured in our set-up up to 1 300 Hz. The lab developed pulsed generator thus allows for the attempt of therapeutic treatments with rather flexible protocols at least dealing with the dose rate value. As the instantaneous power delivered to the plasma appears almost constant during the voltage pulse from single shot to 1 300 Hz, indicating a very fast recovery of the

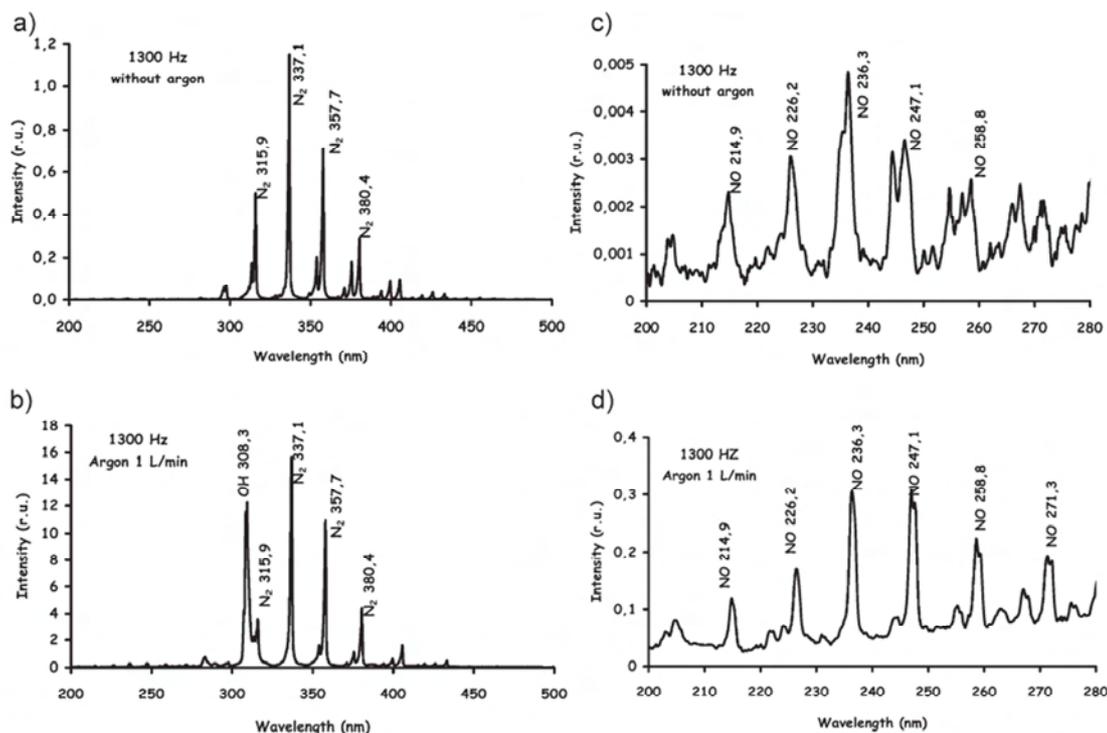


Figure 4. Emission spectra from DBD plasmas at 1300 Hz. a) In an air discharge; b) In an air-argon mixture (argon flow rate adjusted to $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$); c) Enlarged UVC spectrum in air; d) Enlarged UVC spectrum in air-argon mixture.

gas neutrality from one shot to another, the plasma dose delivered during a full treatment may be delivered at low repetition rate during periods of a few minutes or during much shorter exposure in high frequency regime. The influence of the plasma dose rate on the tumour treatment was not experienced in this preliminary study.

The emission spectrum from the DBD discharge in air is reported in Figure 4a. The most important contribution comes from the second positive system ($\text{C}^3\Pi_u - \text{B}^3\Pi_g$) of molecular nitrogen for the 0-0, 0-1, 0-2 and 1-0 bands observed from about 300 to 450 nm. A particular attention was drawn to ultraviolet (UV) radiation within the UV-C spectral bandwidth (from 200 to 280 nm). UV-C radiation from the plasma discharge in air appears very weak compare to UV-A and UV-B, but cannot be neglected.

To explore influence of DBD discharge frequencies on plasma properties, spectra were also recorded with different DBD discharge frequencies (100 Hz, 200 Hz, and 500 Hz). No significant differences with spectra recorded at 1300 Hz, presented in Figure 4, were measured. No noticeable variation of the spectra was also measured whether the plasma was produced from the reactor to the silver grounded plate in a 2 mm thick air gap, as illustrated in Figure 4, or within the same gap between the skin of the mouse set on this plate and the reactor. This observation evidences that the non thermal plasma application on the

living tissue probably, under conditions depicted in this paper, does not induce significant ablation of the surface to be treated. The presence of the living organism, the residual surface humidity do not proscribe the a priori generation and characterization of air plasma on test samples before being applied in the therapeutic protocol.

Experiments were realized using gas mixtures of air with argon to compare UV and radical excited level production with air plasma. Figure 4b represents the emission spectrum from the DBD discharge in air with an argon flow rate adjusted to $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. The second positive system ($\text{C}^3\Pi_u - \text{B}^3\Pi_g$) of molecular nitrogen remains the dominant contribution to the UV-A radiation (from 315 to 400 nm). The intensities of the nitrogen bands continuously increase with the argon flow rate from a few hundreds of $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ to $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. The nitrogen emission is for instance about four times larger with a $1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ argon flow than it is for argon less air plasma, which is mainly due to the efficient excitation transfer of Ar metastable to N_2 . On the other hand, the OH radiation which was hardly observed in air plasma, is efficiently produced with argon admixtures of a few hundreds of $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and tends to saturate for flow rate ranging from 1 to $3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. The precise description of the relevant argon flow rate for the production of OH excited level radiation would require the development of a new DBD reactor and gas flow assembly allowing

experiments with much more controlled binary mixtures. Additional LIF (Laser Induced Fluorescence) or absorption experiments would also be necessary to get a quantitative measurement of the OH radical concentration with the present setup. Nevertheless, the very significant increase of OH excited levels by argon admixture will probably result in a corresponding appreciable enhancement of radical concentrations. OH excited levels are formed from chemical reactions involving electrons, ions and excited species of the plasma and water molecules from the ambient air. In case of an air-argon mixture, as for N_2C state, the excitation transfer from Ar excited states plays a major role. Enlargement of Figure 4a and b in the UV-C bandwidth (from 200 nm to 280 nm) are respectively presented in Figure 4c and d. Figure 4c and d point out the fact that the UV-C contribution is due to the 0-1 and 0-2 bands of the NO_γ ($A^2\Sigma^+ - X^2\Pi_1$) system. The production of NO is attributed to the electron-impact dissociation of the O_2 and N_2 . While Ar admixture leads to a very significant increase of the NO_γ emission, the different NO_γ bands exhibit rather similar intensity ratios indicating that O_3 absorption (from 200 nm to 300 nm with a maximum at about 250 nm) is not the main factor explaining the NO excited level enhancement with Ar flow. An estimation of the relative contributions from UV-A, UV-B and UV-C, respectively, mainly attributed to the radiation of nitrogen, hydroxyl radical, and nitric oxide species, without any correction of the sensitivity wavelength dependence of the detection tools, has been performed by the integration of the intensity levels over the three wavelength domains.

The argon admixture to the air plasma induces both a four times multiplication of the whole UV, from 200 to 400 nm, flux and a strong modification of the UV-C and UV-B ratios to the whole UV flux. For an argon flow rate of $1\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, the UV-C proportion is 8 fold enhanced, while UV-B ratio increased by 3.5 fold. These very pronounced variations of the UV flux and UV distribution with gas mixture underline the necessity to perform more detailed measurements of UV fluxes to estimate their potential impact on living tissues. On the other hand, the control of UV and OH and NO excited levels production by easily implemented gas admixtures may offer potentialities for specific therapeutic treatments. The addition of argon to air is very interesting

because of the enhanced production of OH and NO excited levels, but leads in the same time to reinforced production of UV-C radiation which can cause long term skin damages.

Mouse Tolerance Study

To explore the impact of plasma treatment on mice, plasma was applied on non grafted mice for a long period of time (20 min at 100 Hz) to evidence potential undesirable effects. First, plasma effects were examined on whole organism. No systemic nor behavior modifications were observed during and after treatment. However, mice experienced muscular contractions during treatment, and it was decided to assess whether plasma induced any modifications in the respiratory cycle. Mouse anesthesia respiratory rhythm was compared before, during and after plasma treatment. As shown in Figure 5, plasma treatment induced a slight increase in respiration frequency ($\approx 8\%$) but this effect was transient and respiratory frequency returned to baseline as soon as treatment was stopped. Moreover, cardiac rhythm monitored during plasma treatment revealed the absence of any significant alteration. These data confirm that plasma treatment did not present any life-threatening effects associated to electrical stimulation in our experimental conditions.

The consequences of plasma treatment on mouse skin were also examined. Plasma treatment during 20 min at

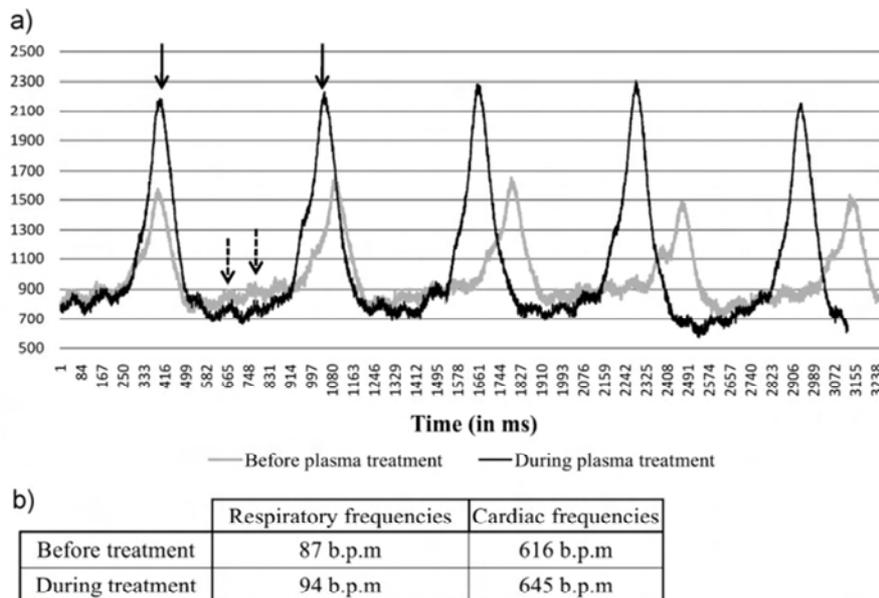


Figure 5. Comparison of respiratory and cardiac frequencies with and without plasma applied. a) Curves represent the intensity of thorax expansion, corresponding to inspiration (solid arrow) and cardiac pulsation (dotted arrow); b) Respiratory and cardiac frequencies values determined from graph a), b.p.m = beats per minute. Present results are representative of independent experiments conducted on 3 mice.



Figure 6. Representative photograph of superficial skin burns observed after 3 consecutive daily plasma treatments. In this experiment, treatment was performed during 20 min at 100 Hz on three mice.

100 Hz did not induce any immediate visible damage at the surface of the skin. However, as shown in Figure 6, the same treatment repeated 3 consecutive d promoted superficial burn resulting in subsequent desquamation. Burns were limited to the treatment zone and did not extend to nearby area. To explain these superficial burns and given that some studies have shown a dramatically reduction of pH during plasma treatment, we have explored treatment effects on both subcutaneous and skin pH. pH was evaluated using pH test strip immediately after plasma application. At the skin surface, we observed a dramatically reduction of pH as compared to untreated skin. Indeed, pH decreased from 7.0 to 2.0 (Table 1). In contrast, the subcutaneous pH remained stable or even slightly increased up to 8.5. The dielectric barrier discharge used in this experiment is supposed to

Table 1. Plasma treatment induced skin pH modifications. pH values were determined using pH test strip. Present results are representative of independent experiments conducted on 3 mice.

		pH
Before plasma		7.0 ± 0.5
After plasma treatment	Cutaneous pH	2.0 ± 0.5
	Subcutaneous pH	8.5 ± 0.5

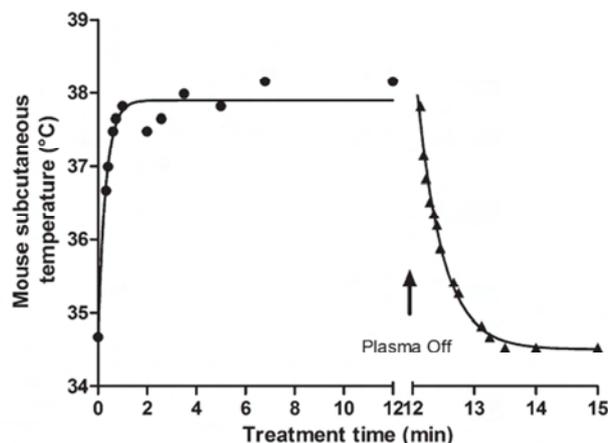


Figure 7. Evolution of mouse subcutaneous temperature during and after plasma treatment. Temperature was measured using a thermistance. Present results are representative of independent experiments conducted on 3 mice.

produce non thermal cold plasma but can, in some conditions, lead to the increase in temperature of the surrounding media. To assess whether cutaneous burns induced by plasma treatment were linked to thermal damage of the skin, we measured subcutaneous temperature during plasma treatment using a thermistance placed under the skin of the treatment zone. As presented in Figure 7, our results indicated that plasma produce a rapid $\approx 4 - 5^\circ\text{C}$ increase in subcutaneous temperature during the first two minutes of plasma treatment. Then, subcutaneous temperature stabilized at this high value during the remaining time of exposure and it returned to baseline at treatment arrest. It has also been observed that mice whole body temperature remained stable during all treatment course by recording their rectal temperature. To avoid undesirable effects and to minimize the increase in subcutaneous temperature, plasma treatment used for antitumor study was applied daily as 3 consecutive periods of 2 min separated by a 1 min pause. This protocol avoids superficial burn and no apparent skin damages were observed.

Antitumor Studies

U87-MG glioma cell line has been chosen to perform in vivo antitumor studies. Heterotopically grafted, this cancer cell line presents a hemispherical growth that is a well suited configuration for treatment with plasma. Preliminary experiments have been conducted onto three mice and showed that treatment during 3 times 2 min at 100 Hz induced an increase of BLI intensity, from 33% to 42% in comparison with non-treated mouse 24 h after the first day of treatment corresponding to an increase in tumor cells activity. This observation suggested that longer plasma

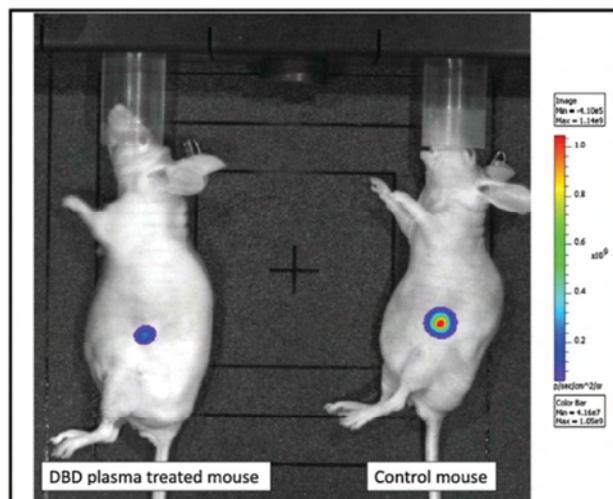


Figure 8. Antitumor effect of plasma treatment in U87 xenografted nude mice. The mouse on the right was not treated and mouse on the left was irradiated by plasma for 5 consecutive days at 100 Hz during 6 min. BLI intensity was closely dependant on tumor activity. A dramatically BLI decrease by 58%–84% was observed in U87 malignant glioma-bearing mice. Representative pictures are shown and similar results were obtained with other animals.

treatment was needed to obtain a significant antitumor effect. To this end, this treatment was administered on mice during five consecutive days. In that case, we obtained a decrease of BLI intensity of 54% to 84% associated with a $\approx 30\%$ reduction of tumor volume (Figure 8).

Discussion

Direct air plasma treatment is characterized by the existence of various species that reach the surface of treated living tissue. There are active uncharged species (NO, OH radicals...), electron, ions and UV photons generated by plasma that are also associated with rapid electric field variations. In this work, plasma is generated between the dielectric covered high-voltage electrode and the mouse, which serves as a second electrode. While the main goal was to search a potential antitumor effect on U87 glioma xenografts using non thermal DBD treatment, a preliminary tolerance study was required, and a spectroscopic analysis of both air and air-argon mixture was performed.

To evaluate mice tolerance during plasma exposure, a cardiac and pulmonary monitoring was performed. We showed that plasma treatment at 100 Hz induce transient very small modifications of cardiac ($\approx 4\%$) and pulmonary frequencies ($\approx 8\%$). These data highlight the safety of plasma treatment for the whole organism and the absence

of electrostimulation that would result in a potential risk on vital functions. Since that essential point was checked, we then performed spectroscopic measurement and antitumor study.

Spectroscopic measurements have shown that no significant contribution to the plasma composition resulting from the plasma-skin interaction occurs in our treatment protocol (i.e., 100 Hz, 3 times 2 min). Neither spectroscopically detectable, nor visible skin ablation, seem to take place; this is a first indication of applicability of plasma without severe skin damage. Indeed, this treatment protocol was selected after analysis of possible effects of long time exposure to plasma treatment (20 min at 100 Hz), for which no immediate damage appears after one single exposure, but which induces superficial burns after 3 consecutive days of such a long time exposure. The plasma generates essentially UV-A photons from N_2 second positive system and UV-C from NO_x system. While no quantitative measure of radical concentration has been performed yet, the spectroscopic measurement indicated that NO and OH radicals are generated, their concentration being probably enhanced through argon admixture which was not experienced for tumor treatment.

A safe treatment protocol (3 times 2 min daily) was applied to assess the potential antitumor effect of the plasma treatment. To this end, we first monitored BLI intensity and, surprisingly, we observed an increase of BLI, 24 h after the first day of treatment. This demonstrated an increase in tumor cell activity, since bioluminescence is a gene expression closely dependent upon proliferation and metabolism of tumor cells.^[16] This unexpected result might not necessarily reflect a deleterious effect of plasma treatment: in fact, this could be ascribed to the usual reoxygenation effect associated to free radicals production usually observed for low dose radiotherapy.^[17] This tumor reoxygenation could induce tumor cell sensitization and improve plasma antitumor effect at the next application of treatment. Indeed, after 5 d treatment, we observed a very strong BLI decrease by 58%–84% associated to $\approx 33\%$ reduction of tumor volume in U87 malignant glioma-bearing mice. This decrease of both tumor cells activity and volume of treated tumors clearly demonstrated an antitumor effect of plasma on U87 glioma xenografts after only 5 d of treatment.

To the best of our knowledge, only in vitro experiments have been conducted to study the antitumor effects of plasma. Plasma antitumor activity on an in vivo tumor model is reported here for the first time. Our results are in accordance with previously published in vitro data. Indeed, Kim et al. reported that the plasma treatment induced cell death in a melanoma cell line and this effect was potentiated by association of plasma with antibody-conjugated nanoparticles.^[15] Moreover, Fridman et al. have demonstrated that plasma treatment presented an

antitumor activity against a melanoma cell line, and that this effect was mediated by apoptosis induction.^[14] Though to be proven, apoptosis may participate in the tumor volume reduction observed in our study. To try a first approach of the mechanisms involved in the superficial burn skin and the observed tumor cytotoxic effect, we studied the effects of plasma on both skin pH and subcutaneous temperature. In the following paragraphs, we will discuss the potential contribution of each component (i.e. pH, temperature, UV and electric fields) to the antitumor effect of plasma.

Authors have described a pH reduction during plasma treatment.^[18,19] This acidification has been also described with a DBD system in water and phosphate buffered saline after 30 s of treatment.^[7,20] It is interesting to note that mouse skin pH was also dramatically reduced after our treatment. This reduction can be mediated by the production of a significant amount of ions and the presence of sweat on the mouse skin.^[7,21] Surprisingly, the subcutaneous pH was around 8.5 (higher than neutral), contrasting with the reduced pH value obtained at the surface of mouse skin. This result allows the emergence of two hypotheses. On one hand, the pH increase could be linked to the antitumor effect of plasma, through the release of cell species, thus inducing pH changes in tumor microenvironment. On the other hand, some plasma species may selectively penetrate through the mouse skin producing an increase of pH values. For example, it was demonstrated that NO applied to human skin is able to diffuse along 1 to 3 mm.^[22] NO is a potent vasodilator and has an important role in the local regulation of vascular dilatation and blood flow.^[23] This possible vasodilatation was in accordance with the increase of BLI intensity observed after the first plasma application. Further studies are needed to better understand the mechanisms involved in the observed results, in particular to verify the mouse skin and tissues penetration by the active species generated in the plasma. Moreover, synergetic effect of electric field and species penetration was also reported and may be relevant in a direct plasma treatment.^[24]

Antitumor effect of hyperthermia has already been observed and is currently used in clinical practice to improve cell killing effect of cytotoxic drugs and/or radiation.^[25,26] The effect of hyperthermia depends on the temperature and the exposure duration. In vitro and animal hyperthermic experiments exhibited a direct tumor cell killing effect at temperature ranging from 41 °C to 47 °C. Hyperthermic cell death has been shown to be markedly enhanced at temperature above 43 °C.^[27] Furthermore, moderate tumor hyperthermia (<42 °C) influences tumor blood flow, oxygen and nutrient supply,^[27] inducing a tissue reoxygenation, which increases cell sensitivity to ionizing radiations.^[28] In our study, a temperature increase up to 38 °C was observed during plasma treatment, this

increase being limited to few tens of seconds during each 2 min of treatment. Whereas this temperature was lower than 42 °C, effects of temperature on tumor blood flow and oxygen supply should be not neglected. Indeed, tumor reoxygenation observed after the first plasma treatment may be partly attributed to this phenomena.

Presence of UV in plasma might contribute to the tumor cytotoxic effect of plasma through ROS production and by helix distorting lesions in DNA formation.^[29,30] Some authors have demonstrated an UV-C induced apoptosis on in vitro U87 cell line.^[31] However UV penetration in skin is limited to about 2 μm around 250 nm wavelength up to 90 μm for 400 nm wavelengths.^[32] Mouse skin thickness varies from 700 to 750 μm for balb/c nude mouse and 800 to 850 for C57bl6 mouse. These data suggest that UV radiations are entirely stopped by mouse skin and could not reach a subcutaneous tumor. UV effect on tumor cells seems thus limited in our experiments.

As already suggested, electric fields could also participate to the antitumor observed effect. Electric fields have demonstrated their efficiency on tumor model in vivo (B16 mouse melanoma, U87 malignant glioma) and also on a pilot clinical study in patient with recurrent glioblastoma.^[33,34] Cytotoxic effects of electric fields involved two mechanisms: arrest of cell proliferation and destruction of cells while undergoing division.^[33,34] Even if the parameters of our treatment differ from the typical conditions reported in the literature (i.e., pulses, treatment duration, and intensity) electric field generated by plasma could act in the same manner on our U87 model.

Concerning mouse skin plasma tolerance, our results indicated that skin burns induced by long plasma treatment (20 min, 3 consecutive d) might be linked with the skin pH modifications observed, temperature increase, and UV exposure. Additional experiments will be needed to discriminate between the main mechanisms at the origin of these superficial burns.

Conclusion

In conclusion, our results show that the use of plasma for in vivo antitumor treatment is a new promising tool. Plasma treatment was well tolerated by mice and we established the maximum tolerated dose within our experimental conditions. We describe an antitumor activity of plasma treatment in an in vivo model on U87 glioma cells. This antitumor activity could be induced by different components of plasma. The three important parameters implicated in this effect could be the presence of electric field, the possible diffusion of species through the skin in connexion with the subcutaneous pH change, and to a less extent, the slight increase of temperature. The synergistic combination of each of these parameters could also participate to this

effect. As plasma treatment is part of a rapidly evolving field, many questions remain unanswered and further studies are required to elucidate mechanisms involved in the in vivo complex interactions between plasma and tumor cells. Though to be confirmed on larger studies, our preliminary data are very promising and new experiments are presently ongoing.

Acknowledgements: This work was supported by *Région Centre* through the APR program "PlasMed". The authors thank *PlasMed* medical advisory board of *Tours University Hospital* and *Orleans Regional Hospital*.

Received: May 29, 2009; Revised: November 9, 2009; Accepted: November 11, 2009; DOI: 10.1002/ppap.200900080

Keywords: cancer therapy; dielectric barrier discharges (DBD); non-thermal plasmas; plasma medicine; xenograft model anti-tumor assay

- [1] J. Ferlay, P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, P. Boyle, *Ann. Oncol.* **2007**, *18*, 581.
- [2] Special issue. *Plasma Processes Polym.* **2006**, *3*, 383.
- [3] M. Laroussi, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2002**, *30*, 1409.
- [4] M. Laroussi, D. A. Mendis, M. Rosenberg, *New J. Phys.* **2003**, *5*, 10.
- [5] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian, L. H. Yahia, *Int. J. Pharm.* **2001**, *226*, 1.
- [6] I. A. Soloshenko, V. V. Tsiolko, V. A. Khomich, A. I. Shchedrin, A. V. Ryabtsev, V. Y. Bazhenov, I. L. Mikhno, *Plasma Phys. Rep.* **2000**, *26*, 792.
- [7] G. Fridman, M. Peddinghaus, H. Ayan, A. Fridman, M. Balasubramanian, A. Gutsol, A. Brooks, G. Friedman, *Plasma Chem. Plasma Process.* **2006**, *26*, 425.
- [8] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, A. Fridman, *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 503.
- [9] I. E. Kieft, J. L. V. Broers, V. Caubet-Hilloutou, D. W. Slaaf, F. C. S. Ramaekers, E. Stoffels, *Bioelectromagnetics.* **2004**, *25*, 362.
- [10] I. E. Kieft, N. A. Dvinskikh, J. L. V. Broers, D. W. Slaaf, E. Stoffels, *Proc. SPIE.* **2004**, *5483*, 247.
- [11] I. E. Kieft, M. Kurdi, E. Stoffels, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2006**, *34*, 1331.
- [12] K. M. Anderson, T. Seed, D. Ou, J. E. Harris, *Med. Hypotheses* **1999**, *52*, 451.
- [13] H. U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer, *Apoptosis* **2000**, *5*, 415.
- [14] G. Fridman, A. Shereshevsky, M. M. Jost, A. D. Brooks, A. Fridman, A. Gutsol, V. Vasilets, G. Friedman, *Plasma Chem. Plasma Process.* **2007**, *27*, 163.
- [15] G. C. Kim, G. J. Kim, S. R. Park, S. M. Jeon, H. J. Seo, F. Iza, J. K. Lee, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2009**, *42*, 5.
- [16] D. E. Jenkins, Y. Oei, Y. S. Hornig, S. F. Yu, J. Dusich, T. Purchio, P. R. Contag, *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, *20*, 733.
- [17] P. Wachsberger, R. Burd, A. P. Dicker, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1957.
- [18] K. R. Foster, "Thermal and nonthermal mechanisms of interaction of radio-frequency energy with biological systems", *1st First Int. Symp. Nonthermal Medical/Biological Treat. Electromagn. Fields Ionized Gases (ElectroMed99)*, Norfolk, Virginia 1999.
- [19] B. Sun, M. Sato, J. S. Clements, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **1999**, *32*, 1908.
- [20] S. U. Kalghatgi, G. Fridman, M. Cooper, G. Nagaraj, M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, V. N. Vasilets, A. F. Gutsol, A. Fridman, G. Friedman, *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2007**, *35*, 1559.
- [21] D. Moussa, F. Abdelmalek, B. Benstaali, A. Addou, E. Hnatiuc, J. L. Brisset, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **2005**, *29*, 189.
- [22] A. T. Tucker, R. M. Pearson, E. D. Cooke, N. Benjamin, *Lancet* **1999**, *354*, 1670.
- [23] R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada, *Nature* **1987**, *327*, 524.
- [24] P. G. Johnson, S. W. Hui, A. R. Oseroff, *Photochem. Photobiol.* **2002**, *75*, 534.
- [25] J. van der Zee, *Ann. Oncol.* **2002**, *13*, 1173.
- [26] P. Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, P. M. Schlag, *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 487.
- [27] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess, *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* **2002**, *43*, 33.
- [28] C. W. Song, A. Shakil, R. J. Griffin, K. Okajima, *Semin. Oncol.* **1997**, *24*, 626.
- [29] L. F. Z. Batista, B. Kaina, R. Meneghini, C. F. M. Menck, *Mutat. Res. -Rev. Mutat. Res.* **2009**, *681*, 197.
- [30] S. Lippens, E. Hoste, P. Vandenabeele, P. Agostinis, W. Declercq, *Apoptosis* **2009**, *14*, 549.
- [31] L. F. Z. Batista, W. P. Roos, B. Kaina, C. F. M. Menck, *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7*, 237.
- [32] R. R. Anderson, J. A. Parrish, *J. Invest. Dermatol.* **1981**, *77*, 13.
- [33] E. D. Kirson, V. Dbaly, F. Tovarys, J. Vymazal, J. F. Soustiel, A. Itzhaki, D. Mordechovich, S. Steinberg-Shapira, Z. Gurvich, R. Schneiderman, Y. Wasserman, M. Salzberg, B. Ryffel, D. Goldsher, E. Dekel, Y. Palti, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 10152.
- [34] E. D. Kirson, Z. Gurvich, R. Schneiderman, E. Dekel, A. Itzhaki, Y. Wasserman, R. Schatzberger, Y. Palti, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3288.

II. Résultats complémentaires

A. Évaluation de l'inflammation induite au niveau cutané

Afin de compléter l'étude de tolérance du plasma au niveau cutané, une étude de l'inflammation induite par le plasma a été réalisée en collaboration avec le laboratoire « Immunologie et Embryologie moléculaire » IEM UMR-6218 CNRS, en particulier les équipes de B. Ryffel et V. Quesniaux, avec l'aide technique indispensable de L. Fauconnier.

L'objectif de cette étude est d'évaluer de manière précise l'impact de différentes doses de plasma sur la peau. Pour cela, des doses croissantes de plasma ont été appliquées sur la peau de souris avec le générateur DBD. Les doses choisies vont de 2 min à 12 min et sont comparées à l'injection intradermique de 1 μ g et 10 μ g de LPS (LipoPolySaccharide). La fréquence utilisée a été doublée par rapport à l'étude initiale afin d'augmenter la dose délivrée, l'ensemble des traitements ayant été réalisés à 200Hz. Théoriquement, une dose de 20 min à 100Hz correspondant à une dose de 10 min à 100 Hz.

24h après le traitement, les souris sont sacrifiées et la zone de peau traitée par plasma est excisée et la moitié est fixée pour une analyse histologique avec un marquage H&E (Hématoxilin Eosine) et l'autre moitié est conservée pour dosage de l'activité MPO (Myéloperoxydase) reflétant le recrutement des neutrophiles dans le tissu et le dosage du taux de la chemokine KC (par ELISA).

La figure 54 présente les résultats histologiques du marquage H&E. Une dose de 2 min de plasma ne provoque aucun dommage microscopiquement visible par rapport au CTRL. Dès 6 min d'exposition au plasma, une infiltration de cellules inflammatoires est observée avec une légère désorganisation tissulaire. Les doses de 8 et 12 min induisent un recrutement très important de cellules inflammatoires avec une désorganisation tissulaire très marquée. Ces doses élevées induisent une réponse inflammatoire proche de celle observée avec les endotoxines de LPS.

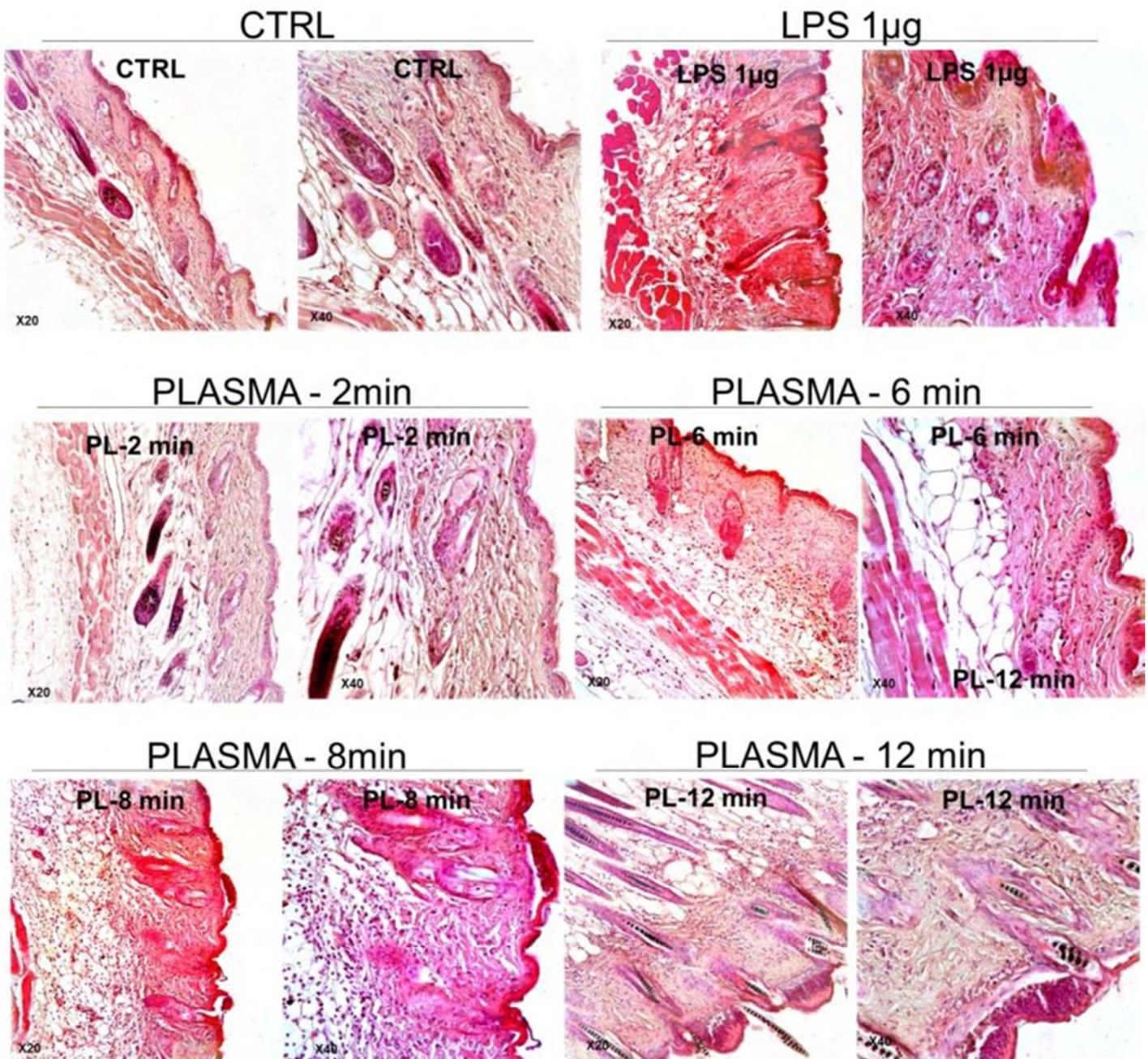


Figure 54 : Étude de l'effet de doses croissantes de plasma sur l'intégrité tissulaire de la peau par histologie H&E. 24h après le traitement, grossissement x10 etx40.

L'activité MPO dans le tissu a ensuite été évaluée (figure 55). La MPO est une enzyme qui se situe principalement dans les neutrophiles. L'évaluation de l'activité MPO permet ainsi de déterminer le recrutement des neutrophiles sur le site d'inflammation. Le dosage repose sur un test colorimétrique qui quantifie l'activité enzymatique de la MPO en utilisant un substrat, la dianisidine dihydrochloride.

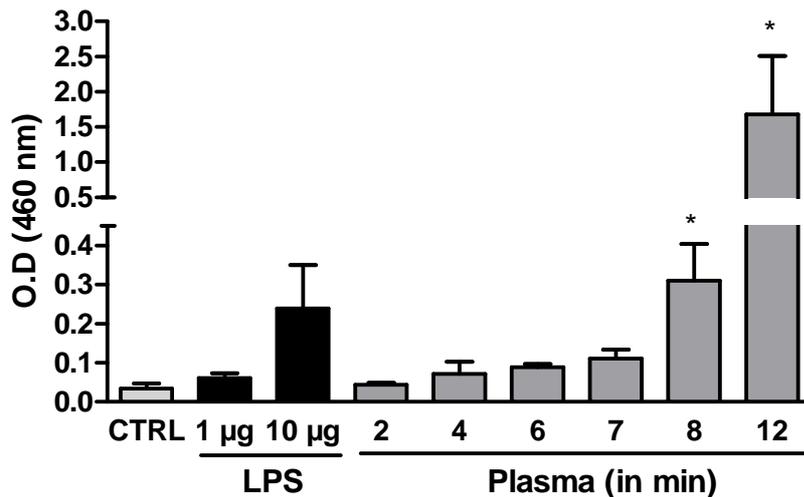


Figure 55 : Évaluation du recrutement des neutrophiles au site de traitement par dosage MPO. n=6, Moyenne+/- SEM, *<0.05.

Aucune différence d'activité MPO n'est observée entre les groupes CTRL et le plasma appliqué pendant 2 min. De légères augmentations sont observées pour les temps 4, 6 et 7 min de traitement. Au-delà de 7 min de traitement, une augmentation significative de l'activité MPO est induite, 8 min de traitement induisant une activité équivalente à 10µg de LPS en intradermique.

Après 7 min de traitement, il y a un recrutement important de neutrophiles au niveau du site de traitement confirmant les données histologiques et confirmant également l'importance de l'inflammation induite.

Pour finir, une évaluation du taux de chimiokines KC, présent dans la peau 24h après traitement, a été effectué par dosage ELISA (figure 56). KC est impliqué dans le chimiotactisme et l'activation des neutrophiles sur le site d'inflammation.

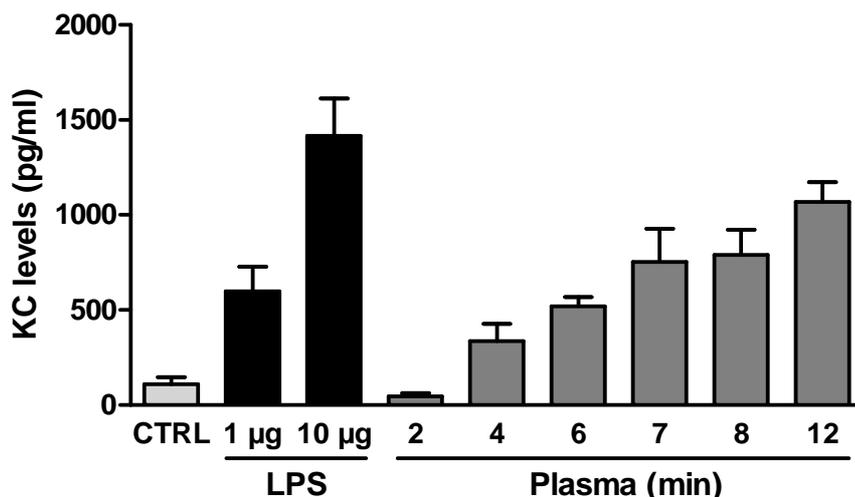


Figure 56 : Niveau de sécrétion de la chimiokine KC dans la peau en fonction de différentes doses de plasma. n=6, Moyenne+/- SEM.

Le niveau de sécrétion de KC est similaire au CTRL pour une dose faible de plasma (2min). Le taux de KC présent dans le tissu augmente avec les doses de plasma mais l'effet est moins marqué par rapport au dosage de l'activité MPO. Le taux de 1500 pg/ml obtenu avec 10 µg de LPS n'étant pas atteint avec les doses les plus fortes de plasma.

L'ensemble de ces données permet d'affirmer qu'une dose de plasma inférieure ou égale à 2 min ne provoque pas de phénomène d'inflammation. La dose de 6 min utilisée pour les traitements antitumoraux induit une inflammation avec un recrutement de neutrophiles dans le tissu mais sans désorganisation tissulaire. Une dose supérieure à 8 min induit une inflammation majeure du tissu bien que peu visible macroscopiquement, une désorganisation du tissu avec un recrutement important de neutrophile est observée. Les mécanismes d'induction de l'inflammation par le plasma sont en cours d'étude.

B. Évaluation de l'activation de NF-κB

Le plasma induisant une inflammation au niveau de la zone de traitement, le suivi non invasif de l'inflammation a été réalisé en suivant l'activation du facteur de transcription NF-κB par imagerie de BLI. Pour cela, des souris LPTA® NFκB-RE luc, mâles et femelles (Caliper, Etats Unis) ont été utilisées. Dans l'ensemble des cellules de ces souris transgéniques, le gène de la luciférase est sous la dépendance d'un promoteur κB qui est le site de fixation du facteur de transcription NF-κB. Dans le cadre de processus inflammatoire,

il y a aura activation du facteur de transcription NF- κ B qui est un phénomène précoce de la réponse. Puis une fois activé, il subira une translocation nucléaire pour induire l'expression de ces gènes cibles dont le gène de la luciférase. La luminescence émise sera alors principalement dépendante de l'activité de NF- κ B. Cela permet le suivi du déroulement des processus inflammatoires de manière non invasive.

Pour évaluer la cinétique d'inflammation induite par le plasma, 8 souris NF- κ B-luc âgées de 26 semaines ont été utilisées et traitées au niveau du dos pour éviter les interférences liées à l'activation basale de NF- κ B. La zone de traitement a préalablement été tondu puis épilée à la crème dépilatoire trois jours avant le début de l'étude. Ce délai est nécessaire pour que l'éventuelle inflammation induite par l'épilation n'interfère pas avec l'étude. Le jour du traitement, les souris sont imagées afin de mesurer l'inflammation basale puis elles sont traitées par DBD durant 6 min à 200Hz, cette dose étant celle utilisée pour l'activité anti-tumorale (figure 57).

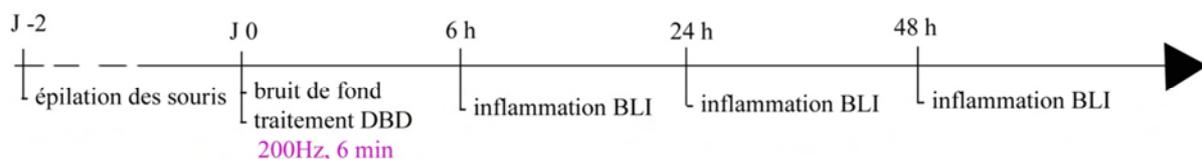


Figure 57 : Déroulement de l'étude sur l'activation de NF- κ B induite par le plasma

Pour le traitement, l'animal anesthésié à l'isoflurane est placé sur le ventre entre la plaque de masse et l'électrode. Avant le traitement, la zone traitée est délimitée afin de mesurer l'inflammation de cette zone spécifique par BLI (Figure 58). Les animaux sont ensuite imagés par imagerie de BLI aux temps 6, 24, 48 et 72 heures.

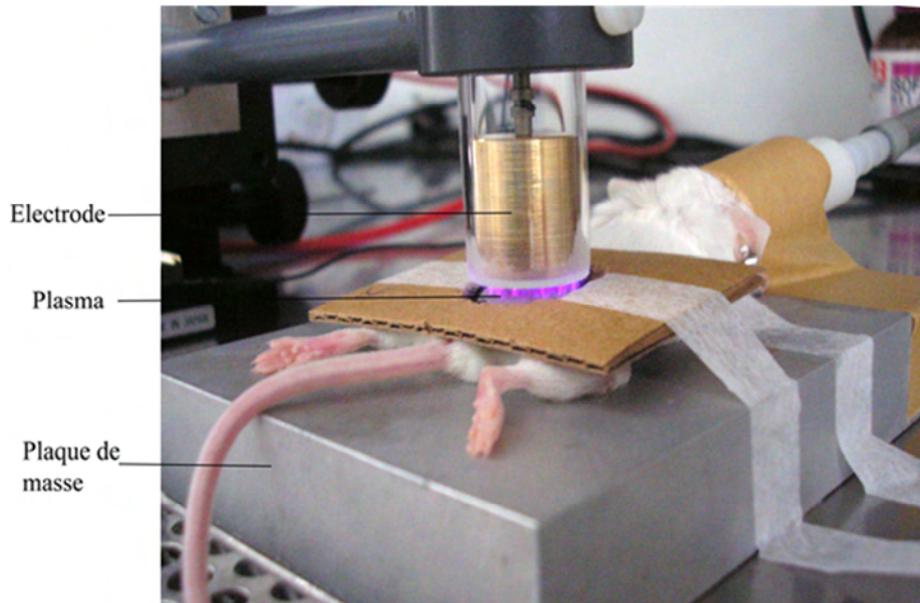


Figure 58 : Traitement par DBD d'une souris NF- κ B-luc

Tout d'abord, il est à noter que le plasma induit une activation de NF- κ B dans la zone de traitement et l'inflammation reste strictement localisée à cette zone (figure 59).

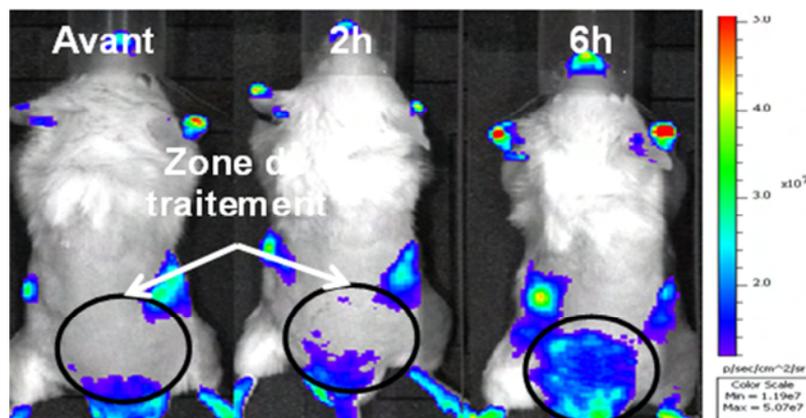


Figure 59 : Images de BLI représentatives de l'inflammation chez la souris avant, 2h et 6h après traitement par plasma.

La cinétique d'évolution de l'activation de NF- κ B montre une augmentation significative de la bioluminescence au cours du temps avec un maximum à 6h post traitement. Ces résultats mettent en évidence que le plasma induit une inflammation rapide dépendante de NF- κ B et que l'activation de NF- κ B retourne quasiment à son état basal 24h après le traitement (figure 60) soulignant une inflammation transitoire induite par le plasma.

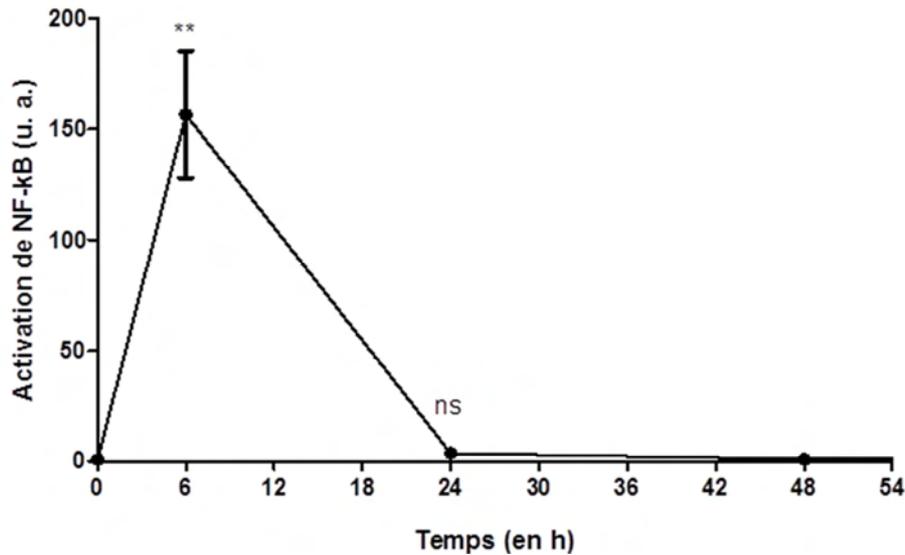


Figure 6o : Évolution de l'activation de NF-κB après traitement plasma déterminé par BLI. N=8, moyenne +/-SEM, **p<0.01.

C. Influence du débit de doses

L'ensemble des études de tolérance a été réalisé avec la source DBD à une fréquence de 200Hz. Nous avons observé qu'une dose supérieure à 8 min induit une inflammation majeure. Le traitement d'une durée de 6 min, permet d'obtenir une tolérance satisfaisante tout en induisant une réponse biologique.

Ces temps de traitement étant relativement longs, il est possible d'envisager de réduire la durée de traitement en modifiant les paramètres de fréquence. 6 min à 200 Hz correspond à un total de 72000 impulsions. En utilisant une fréquence de traitement de 2000Hz, pour un nombre d'impulsions identique, le temps de traitement n'est plus que de 36s. Cette fréquence de traitement peut être assimilée à un « débit de dose ».

Une nouvelle évaluation de la tolérance en utilisant cette fréquence de 2000hz a été effectuée pour comparer l'inflammation induite par une même dose de plasma mais déposée avec un débit de dose différent. Pour cela, l'inflammation induite a été évaluée par imagerie de BLI des souris NF-κB luc.

La procédure de préparation des animaux (épilation et bruit de fond) est identique à l'étude de l'inflammation précédente, seules les caractéristiques de traitement ont changé. Un

groupe de souris a reçu 72 000 pulses en 6 minutes (200Hz), et l'autre 72 000 pulses en 36 secondes seulement (2KHz). Sur la base du bruit de fond naturel des animaux, ceux-ci ont été répartis en deux lots homogènes. Ils ont ensuite été imagés 6, 24, 48 et 72 heures après le traitement.

Les souris NF- κ B Luc ont reçu la dose de 72 000 pulses sur la peau du dos, en 36sec (2kHz) ou en 6 min (200Hz). A la fin du traitement, le lot traité à 2kHz présentait des rougeurs importantes correspondant à la taille et à la forme de l'électrode. Les jours suivants une brûlure importante s'est développée dans la zone de traitement, nécessitant le sacrifice des animaux (figure 61).

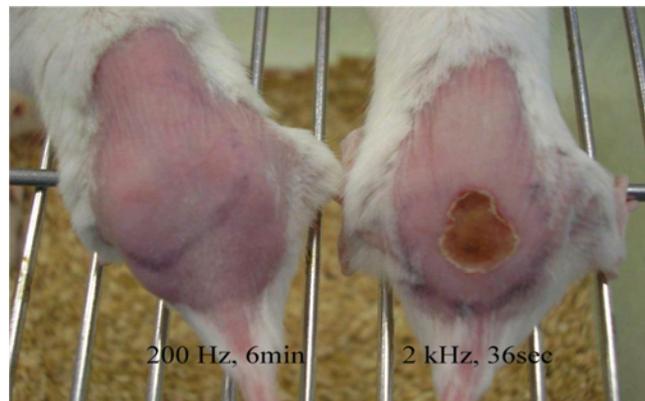


Figure 61 : Brûlure causée par le plasma au débit de dose 2kHz 36sec, 1 semaine post traitement.

D'après la figure 62, l'activation maximale de NF- κ B a lieu à 6h (valeurs basales multipliées par ~50 et ~140 selon le débit de dose). En revanche, le traitement à 200Hz 6min a induit une inflammation significativement supérieure à celle induite par le débit de dose de 2kHz 36sec ($p < 0.045$). Ces données semblent contradictoires avec les brûlures observées à la suite du traitement, en effet la dose de 1200 pulses électriques générés en 36 sec (2kHz) semble plus agressive que si l'on applique cette dose en 6 min (200Hz), celle-ci devrait donner le plus d'inflammation. Un effet lié à une augmentation importante de la température n'est pas à exclure. L'activation de NF- κ B est suivie par imagerie de BLI, or cette imagerie de BLI repose sur l'activité métabolique des cellules. Il est envisageable que face à l'agressivité du traitement et les dommages cellulaires potentiels engendrés (nécrose), les cellules ne seraient plus dans la capacité d'émettre des photons.

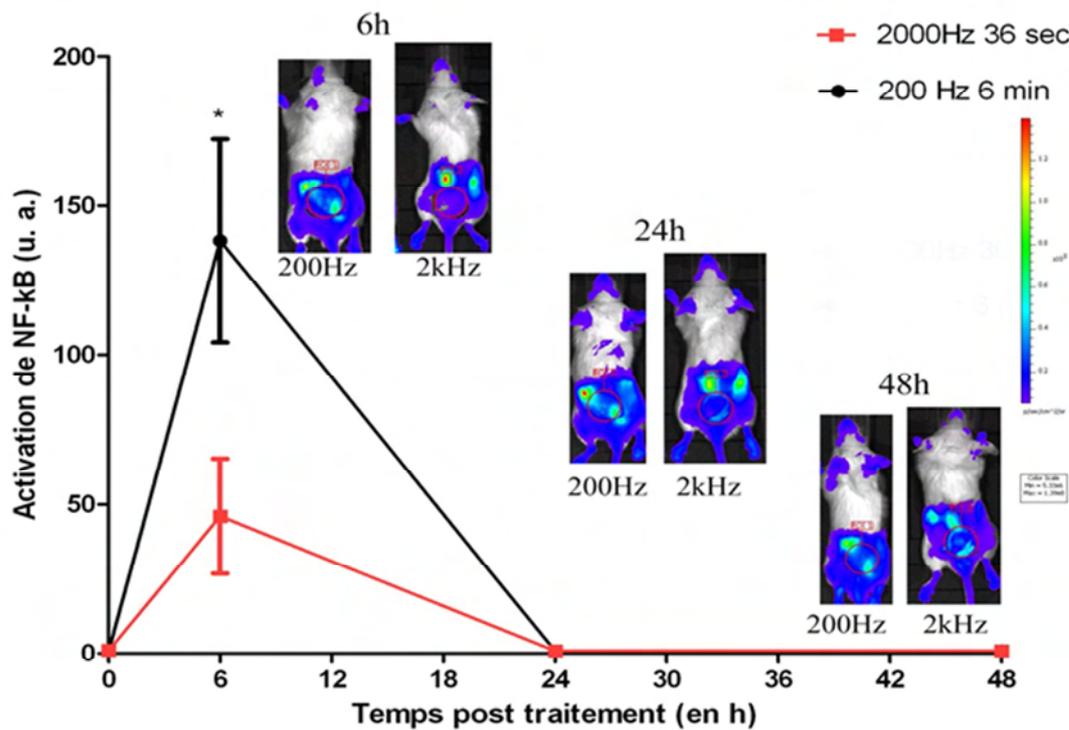


Figure 62 : Suivi de l'activation de NF-κB par BLI après un traitement au plasma avec deux débits de dose différent (n=8, moyenne +/-SEM, p* < 0.05).

D. Évaluation de la tolérance du plasma au niveau pulmonaire

Le développement des plasma jets et en particulier du plasma gun au sein du laboratoire permet d'envisager l'application *in situ* du plasma. L'évaluation de l'activité antitumorale du plasma froids sur des tumeurs exclusivement sous cutanée ne sera pas suffisant pour obtenir une réponse prédictive de la situation clinique. Il est important d'évaluer l'activité anti-tumorale du plasma froid sur des tumeurs greffées en orthotopique. Les tumeurs cibles retenues sont les tumeurs du colon, du pancréas et du poumon. Nous avons précédemment démontré que l'utilisation de la souris NF-κB-Luc était pertinente pour le suivi de l'inflammation induite par le plasma froid. En utilisant ce modèle, les doses de plasma pouvant être utilisées pour le traitement pulmonaire ont été déterminées. Le traitement du poumon avec le plasma présente des contraintes majeures à surmonter pour un organe sensible impliqué dans une fonction vitale:

- Le diamètre et la longueur du cathéter
- Le gaz et le flux de gaz utilisé pour générer le plasma
- La présence d'un champ électrique à proximité du cœur

- L'impossibilité de contrôler visuellement l'exposition effectuée (présence du plasma)
- La durée du traitement

En étudiant les paramètres d'inflammation intrapulmonaire, il va être possible de déterminer les doses tolérées par la souris mais également de visualiser l'effet du traitement (localisé, diffus...). En première approche, la pertinence du modèle a tout d'abord été évaluée. Nous avons utilisés un inducteur d'inflammation (le LPS - LipoPolySaccharides) pour vérifier qu'il était possible de visualiser l'inflammation par bioluminescence dans ces conditions. Pour avoir un repère anatomique du poumon traité, l'injection de LPS est couplée à l'injection d'un fluorochrome (DiD : sel de 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzènesulfonate, Ex 650nm, Em 700nm, Life Technologie®) qui permet ainsi de visualiser le site de dépôt par imagerie de fluorescence et le site d'inflammation par BLI.

La souris est tout d'abord profondément anesthésiée par une injection de kétamine/xylazine puis une trachéotomie est réalisée. Un cathéter radioopaque de 460µm de diamètre est insérée jusqu'au niveau basal du poumon gauche ou droit. Le positionnement du cathéter est contrôlé par une imagerie radiologique (MX-20, Faxitron X-Ray®). 10µg de LPS avec du DID est lentement injecté puis le cathéter est retiré et la souris recousue. La souris supporte très bien l'ensemble de la procédure sans difficulté respiratoire particulière.

6h après l'induction de l'inflammation, une imagerie de fluorescence (FLI) et une imagerie de BLI est réalisé. La souris reçoit 100mg/kg de luciférine en IP 4 minutes avant l'acquisition des images puis est anesthésiée avec de l'isoflurane. La durée et la sensibilité de l'acquisition ont été choisies en fonction de la quantité de signal lumineux émis. Aussi bien pour la fluorescence que pour la bioluminescence, aucun signal spécifique n'a été détecté. La luminescence basale de la peau étant non négligeable, il n'est pas possible de visualiser un foyer se situant profondément dans la souris. Celle-ci a donc été sacrifiée, les poumons ont été excisés puis imagés *ex vivo* par FLI et BLI. Dans cette situation, un signal de FLI et de BLI a pu être obtenu et la quantification de l'émission des photons a été réalisée avec le logiciel Living image (Caliper, Etats Unis, v.3.2).

La figure 63 présente l'imagerie radiologique obtenue avec le cathéter radioopaque présent dans le poumon droit. 6h après l'imagerie de fluorescence permet de visualiser précisément le site de dépôt du liquide contenant le LPS dans le poumon droit. Puis l'imagerie de bioluminescence permet de visualiser une inflammation localisée induite par le LPS. Il existe une bonne corrélation entre le site de dépôt du LPS et le site d'inflammation.

L'ensemble de ces données nous permet d'envisager l'utilisation de cette technique pour visualiser l'inflammation induite par le plasma au niveau pulmonaire.

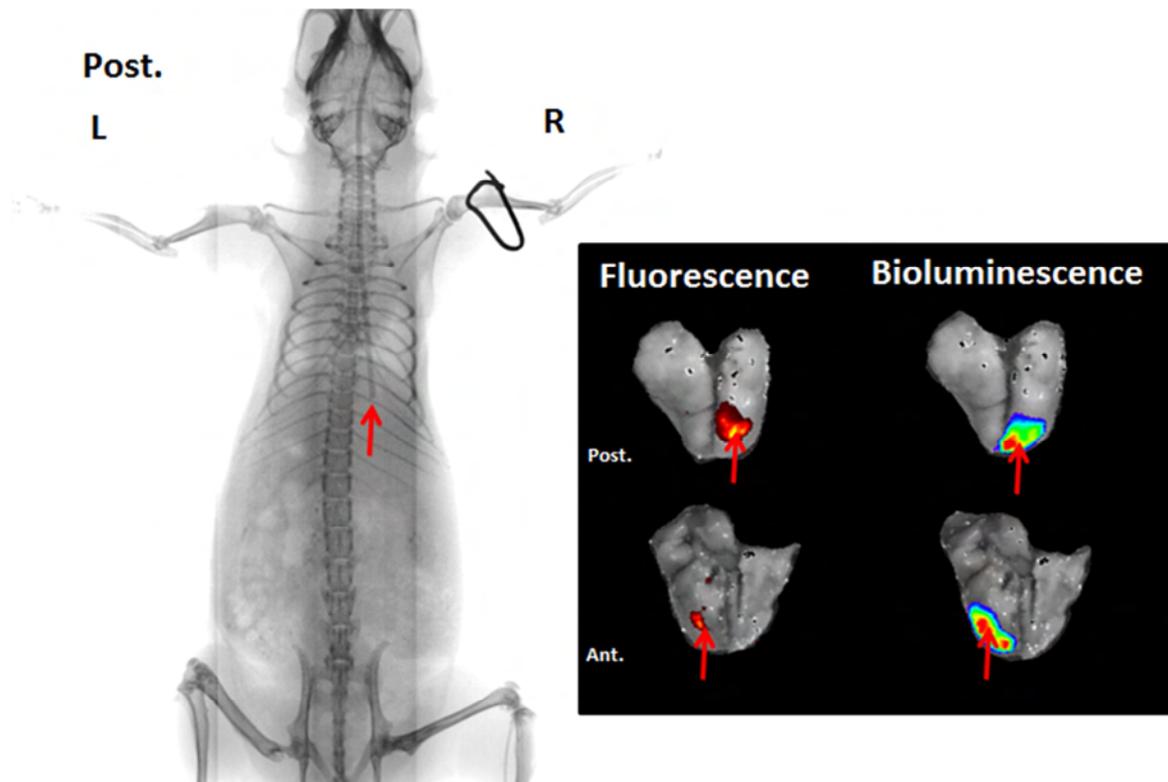


Figure 63 : Imagerie radiologique de positionnement du cathéter et imagerie *ex vivo* des poumons par BLI et FLI.

Par rapport aux contraintes liées au plasma évoquées auparavant, il faut tout d'abord vérifier la tolérance de la souris vis-à-vis du cathéter, du gaz et du flux de gaz. Pour cela, un cathéter identique au précédant est utilisé et la souris subit exactement la même procédure opératoire. Deux gaz différents ont été évalués : le néon et l'hélium, un flux de 80 scm (*Standard Cubic Centimeters per Minute*) est utilisé dans les deux cas.

L'utilisation de l'hélium (gaz seul, sans plasma) est difficilement supportée par la souris, celle-ci se met à suffoquer dès la première minute empêchant la poursuite de l'exposition. Un flux de gaz inférieur ne permettant pas en revanche de propager le plasma, il n'est pas possible de réduire le débit. L'utilisation de l'hélium n'est pas envisageable dans le cadre du traitement pulmonaire chez la souris.

Le néon est, en revanche, convenablement supporté par la souris. Une exposition supérieure à 12 min a été réalisée sans que la souris ne présente de difficultés respiratoires trop importantes. Aucun effet indésirable n'a été observé les jours suivant la procédure. L'étude de l'inflammation par imagerie de BLI a été réalisée 6h après le traitement.

Le positionnement du cathéter a été contrôlé par imagerie radiologique pour déterminer le poumon traité par le flux de gaz. L'imagerie de BLI ne révèle aucune zone d'inflammation que ce soit au niveau du poumon traité ou du poumon controlatéral (figure 64).

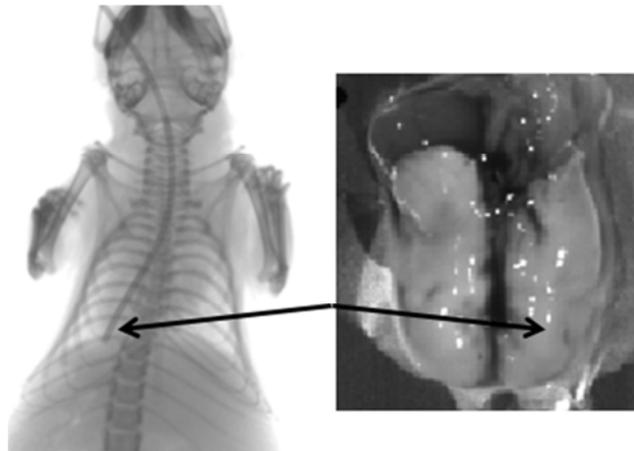


Figure 64 : Imagerie radiologique du positionnement du cathéter (à gauche) et imagerie de BLI des poumons ex vivo (à droite).

Les photons émis par le poumon ayant été soumis au flux de gaz ont été quantifiés et comparé aux résultats de quantification obtenus avec l'inflammation pulmonaire induite par le LPS (figure 65).

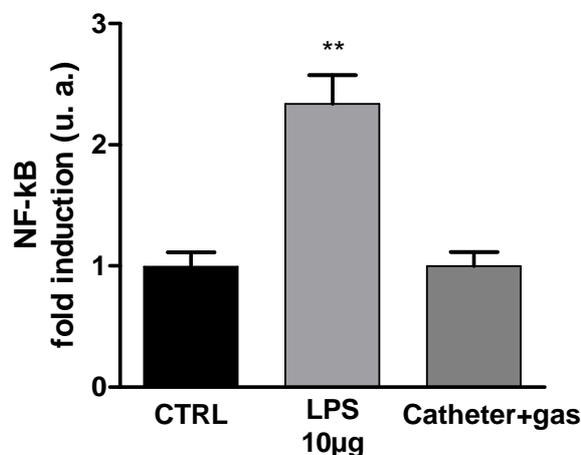


Figure 65 : Induction de NF-κB au niveau pulmonaire 6h après traitement au LPS ou exposé à un flux de néon de 80 sccm. (Moyenne+/- SEM, n=5, p**<0.01)

Le LPS provoque une augmentation significative de l'induction de NF- κ B de l'ordre de 2,3 fois. La présence du cathéter et du flux de néon ne provoque aucune augmentation de l'activation de NF- κ B, le taux restant à un niveau basal proche de celui des poumons des souris CTRL. L'utilisation d'un flux de gaz de 80 sccm de néon est donc d'une part bien tolérée par la souris et d'autre part n'induit pas d'inflammation au niveau pulmonaire.

L'évaluation de la tolérance vis-à-vis du plasma lui-même a été conduite. Le traitement plasma a été réalisé pendant une durée de 6 ou 12 min avec le plasma gun (figure 66). Aucun effet indésirable n'a été observé durant ou les jours suivant le traitement.



Figure 66 : Traitement s'une souris au niveau pulmonaire avec le plasma Gun.

L'imagerie de BLI met en évidence un foyer de luminescence au niveau du poumon traité pendant 12 min avec le plasma gun. Cette induction de NF- κ B reste localisée dans la zone de traitement où se situe le cathéter et ne s'étend pas à l'ensemble du poumon (figure 67). Cette induction permet d'affirmer que le plasma est bien généré dans le poumon et induit un phénomène inflammatoire strictement local.

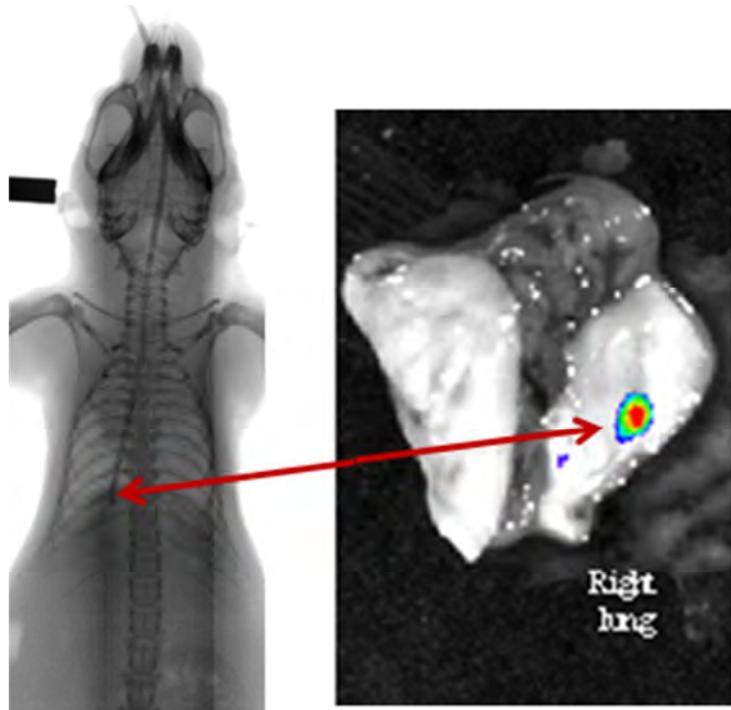


Figure 67 : Imagerie radiologique du positionnement du cathéter (à gauche) et imagerie de BLI des poumons *ex vivo* après traitement plasma de 12 minutes (à droite).

Les deux doses de plasma froid induisent une augmentation de l'activation de NF- κ B au niveau pulmonaire. Cette augmentation bien que visible pour un traitement de 6 min, n'est significative que pour un traitement de 12 min avec une augmentation d'environ 1,8 fois. Ces deux temps de traitement induisent cependant une augmentation de NF- κ B inférieure à l'augmentation observée avec une dose de 10 μ g de LPS qui est connu pour induire une inflammation très importante [289].

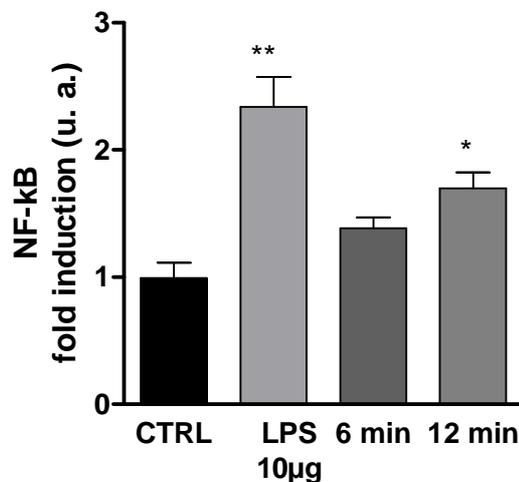


Figure 68 : Induction de NF- κ B au niveau pulmonaire 6h après traitement au LPS ou exposé au plasma pendant 6 ou 12 min. (Moyenne \pm SEM, n=5, p**<0.01).

Concernant la durée du traitement, un traitement de 6 à 12 min induit une inflammation modérée au niveau pulmonaire qui reste inférieure à ce que l'on peut retrouver avec 10µg de LPS. Un traitement d'une durée de 6 à 10 min devrait donc pouvoir être envisagé. Pour compléter l'ensemble des résultats obtenus, une étude histopathologique devrait être menée pour évaluer avec précision les dommages et l'inflammation engendrés.

L'ensemble de ces résultats met en lumière la possibilité d'effectuer des traitements par plasma froid au niveau pulmonaire. Une induction d'inflammation localisée permet d'affirmer qu'il s'agit bien d'un traitement localisé qui devrait permettre de traiter de manière précise des foyers tumoraux profond du poumon.

En conclusion, le plasma froid (DBD) appliqué à faibles doses (<2min) n'induit pas de dommages et d'inflammation majeure sur les tissus traités. Ces données sont compatibles avec une application des plasmas froids *in vivo* dans des domaines tels que la décontamination cutanée ou la dermato cosmétologie.

Des doses élevées (entre 5 et 8 min) peuvent conduire à une inflammation localisée modérée accompagnée d'un recrutement de neutrophiles. Les mécanismes d'induction de cette inflammation ne sont à ce jour pas encore identifiés. Cette tolérance cutanée relativement correcte permet d'envisager des traitements à doses élevées sans induire de toxicité majeure aux tissus adjacents. Ces données laissent présager la possibilité d'induire des effets biologiques importants dans la zone traitée, par exemple dans le cadre du traitement de tumeurs localisées.

Les doses supérieures à 10 min induisent une inflammation massive avec une désorganisation tissulaire et un recrutement très important de neutrophiles. Par ailleurs, la dose n'est pas le seul paramètre à considérer, le débit de doses ayant un effet majeur. Les débits de doses élevés induisent des dommages importants même dans le cadre d'un traitement de courte durée. Les doses très élevées (ou débit de dose) sont incompatibles dans le cadre d'un traitement *in vivo* exposant particulièrement un tissu sain.

Chapitre 5 : Évaluation de l'activité anti-tumorale des plasmas froids

Le plasma froid présentant un potentiel d'application important dans des domaines tels que la stérilisation ou encore la coagulation, une évaluation de l'activité antitumorale a été réalisée avec les deux différentes sources développées au sein du laboratoire. La source DBD permet le traitement de tumeurs de surface ou encore *in situ* au cours d'un geste chirurgical. Le plasma gun permet le traitement de tumeurs localisées par voie endoscopique grâce à sa capacité de propagation dans des capillaires de différents diamètres.

Dans le cadre du développement de cette nouvelle stratégie, des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées, et ce sur différents modèles tumoraux, afin d'éviter un biais de sélection vis-à-vis du type tumoral. En première approche, une tumeur particulièrement résistante faisant partie du panel de tumeurs du NCI a été sélectionnée. Il s'agit de la U87-MG (HTB-14TM) qui est un modèle de glioblastome (grade 4). Cette lignée a été greffée en sous cutané chez la souris *nude*. L'efficacité du plasma froid a ensuite été évaluée sur un modèle plus pertinent vis-à-vis de sa représentativité clinique en termes de localisation mais également de cible potentielle pour le traitement par plasma. Ainsi, un modèle de carcinome colorectal (HCT-116 – CCL-247TM) a été greffé en orthotopique chez la souris *nude* et nous avons également utilisé un modèle de carcinome pancréatique (MIA PaCa – CRL-1420TM) également greffé en situation orthotopique. L'évaluation de l'activité anti-tumorale a d'abord été conduite avec la DBD puis avec le plasma Gun.

En parallèle de ces études d'efficacité antitumorale *in vivo*, des expérimentations ont été menées *in vitro* pour la compréhension des mécanismes d'action du plasma froid sur les cellules tumorales.

I. Activité antitumorale de la DBD

A. Étude d'efficacité du plasma froid sur la lignée U87-MG

Les résultats de cette étude ont été publiés en 2010 dans le premier numéro du journal *Plasma Medicine*. Il est présenté ci-dessous.

Cet article complète les résultats publiés dans l'article précédent qui concernait plus particulièrement la tolérance. Dans ce nouvel article, l'efficacité du plasma en tant qu'agent antitumoral a été évaluée sur des tumeurs xénogreffées en sous cutané chez la souris *nude*. Le modèle de tumeur choisi est la lignée U87-MG afin de mettre en oeuvre un type tumoral particulièrement résistant aux différentes thérapies actuelles.

Dans un premier temps, la source plasma a été caractérisée, celle-ci ayant connu des modifications par rapport à celle de l'article précédent. La tension utilisée est désormais de 23kV et la fréquence de traitement a été augmentée à 200Hz afin d'administrer des doses de plasma plus importantes sur une même durée de temps (3 fois 2 minutes). Ces nouvelles conditions, dont la tolérance a précédemment été décrite dans le chapitre 4, induit une inflammation modérée au niveau cutané.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus pour déterminer les doses de plasma administrées. Cette détermination reste complexe puisque le type de gaz, la tension... sont des paramètres pouvant influencer la dose reçue. De plus, comme cela a été démontré dans le chapitre précédent, une même dose peut induire des effets différents en fonction de la fréquence (du débit de dose) à laquelle elle est administrée. C'est dans ce contexte qu'une évaluation de la dose par la méthode développée par Laroussi *et coll.* a été conduite. Celle-ci repose sur la mesure du courant de décharge. Une première mesure de courant est réalisée lorsqu'il n'y a pas de décharge plasma, c'est-à-dire quand la distance entre la zone de traitement et l'électrode est supérieure à 5 mm. La seconde est réalisée pendant la décharge plasma. Le courant sans décharge est alors soustrait du courant total, ce qui permet d'éliminer les pertes d'énergie éventuelles et ainsi d'obtenir le courant effectivement reçu. L'intégration du courant en fonction du temps permet ainsi de déterminer l'énergie déposée qui est de l'ordre de 0,33 W/cm².

La DBD permet des traitements sur une surface relativement importante, dans notre cas, la surface concernée est 2,3 cm² ce qui permet le traitement de tumeurs sous cutanées de

volume important. Cependant, nous avons vérifié que le traitement était homogène sur la surface de traitement et que chaque point de la zone traitée recevait effectivement la même quantité de plasma. Pour cela, un enregistrement de la décharge avec une caméra ICCD (*Intensified Charge-Coupled Device*) a été réalisé pendant la durée du traitement. Sur un nombre limité de décharges (10 décharges – 50ms), le traitement est peu homogène, le plasma s'établissant préférentiellement dans certaines zones de la surface traitée. En revanche sur un temps de traitement plus long avec un nombre de décharges supérieur à 5000 (un traitement de 6 min à 200Hz représente 72 000 décharges), les mouvements respiratoires de la souris ainsi que la répartition aléatoire des décharges rendent le traitement très homogène signifiant que la dose reçue par la tumeur sera équivalente sur l'ensemble de la surface.

Le plasma a été appliqué sur les tumeurs en sous cutanée à une distance de 2 mm. Le traitement de 6 min (3x 2min) a été réalisé pendant 5 jours consécutifs. Les souris ont été aléatoirement réparties en deux groupes, CTRL et PLASMA. Le volume tumoral d'inclusion est en moyenne de 125 mm³, ce qui est un volume relativement important permettant de s'assurer que le traitement a été appliqué sur une tumeur complètement établie. L'efficacité du traitement a été évaluée par un suivi du volume par mesure au pied à coulisse mais également par imagerie de BLI.

Dès la fin du traitement, 24h après la dernière exposition, les tumeurs traitées avec le plasma présentent un volume significativement inférieur aux tumeurs CTRL. L'évolution de la BLI entre le début et la fin du traitement montre une augmentation relativement faible de l'activité tumorale. Il y a donc une stabilisation du volume tumoral pendant toute la durée du traitement.

Pour les effets à plus long terme, le délai de croissance tumorale a été déterminé en définissant un volume cible à 1000 mm³. Le délai de croissance tumorale est de l'ordre de 6 jours soulignant un effet anti-tumoral du plasma froid non négligeable. De plus, l'étude de survie des souris montre une augmentation significative de la survie des animaux de l'ordre de 60%. En comparaison, une étude de survie sur la même lignée tumorale mais traitée par radiothérapie 5 jours par semaines pendant 2 semaines permet un gain de survie de l'ordre de 200% [290].

Response of Human Glioma U87 Xenografted on Mice to Non Thermal Plasma Treatment

Marc Vandamme,^{1,2,*} Eric Robert,¹ Sébastien Dozias,¹ Julien Sobilo,² Stéphanie Lerondel,² Alain Le Pape,² & Jean-Michel Pouvesle¹

¹GREMI UMR-6606 CNRS, Université d'Orléans, ²TAAM-CIPA, UPS44 CNRS

*Address all correspondence to: Marc Vandamme, GREMI UMR-6606 CNRS, Université d'Orléans, 14 rue d'Issoudun, BP 6744, 45067 Orleans cedex 2, France; Fax: 33 (0) 2 38.41.71.54; marc.vandamme@cns-orleans.fr

ABSTRACT: Non thermal atmospheric plasma is a new promising candidate in anticancer therapy. We have already reported the absence of skin damage induced by our plasma treatment. Preliminary results suggested that this treatment could also induce an antitumor effect on U87 malignant glioma xenografts, and we conducted this work to evaluate the antitumor efficacy of plasma in this model. Antitumor effects were assessed by tumor volume measurement and bioluminescence imaging (BLI). Plasma treatment was applied during five consecutive days in open air with a μ s-duration pulsed floating electrode dielectric barrier discharge (FE-DBD), which delivered about 0.75 W at 200 Hz on the mouse skin. Our results showed a significant tumor volume decrease of 56% for treated mice at the end of the treatment, with a concomitant decrease of BLI intensity. Moreover, this tumor volume reduction translated into an increase of mouse life span of 60%, median survival being 9.5 and 15.0 days for control and plasma-treated mice, respectively. In conclusion, our study demonstrates a marked antitumor effect of plasma treatment in U87 glioma xenografts. These results, obtained in both a radio and chemoresistant model, are very promising and highlight the potential of plasma treatment as an anticancer treatment with little or no toxic side effects.

KEY WORDS: cancer therapy, dielectric barrier discharge (DBD), non thermal plasma, glioma, xenograft model antitumor assay

I. INTRODUCTION

In Europe, estimated new cancer cases in 2006 were about 3.2 million and represented 1.7 millions of deaths.¹ In many tumor types, survival has not significantly increased in the past decades, despite the emergence of new targeted chemotherapy. New treatment concepts or cytotoxic drugs are urgently needed to improve cancer patient outcome. In this context, we evaluated the interest of a local treatment with non thermal atmospheric pressure plasma as a new antitumor treatment. We choose to perform this evaluation on U87-MG, a high-grade glioma model, which is a representative model of brain tumor typically used for treatment efficacy screening. Malignant gliomas are the most common primitive human brain tumors and represent one of the most aggressive tumor types.^{2,3} Indeed, despite aggressive treatment including chemo- and radiotherapy, the median survival for patients of newly diagnosed malignant glioma is restricted to 8–15 months.^{2,3}

Over the past few years, non thermal atmospheric pressure plasma has emerged as a novel promising tool in medicine.⁴ Non thermal plasma is a partially ionized gas, containing electrons, positive/negative ions, radicals, various excited molecules, energetic photons (UV), and generating transient electric field. Electrons present in non thermal plasma are highly energetic, with a typical temperature above 10,000 K, while ions and neutral species remain at room temperature.

Numerous applications of plasma have been investigated, including sterilization and bacterial decontamination.^{5,6} Chemically reactive species and especially short-lived radicals such reactive oxygen species (ROS) are of major importance for bacterial decontamination.⁷ Atmospheric plasmas have also proved their efficacy in blood coagulation by catalyzing the natural blood coagulation processes.⁸ Moreover, treatment of biological tissue and cells has been investigated. Pioneer studies exploring plasma effects on cells have shown an instantaneous detachment of Chinese hamster ovarian (CHO-K1) cultured cells from the surface for low doses of plasma (<0.2 W), while higher doses induce severe damage and necrosis.⁹⁻¹¹ Cell detachment after plasma treatment was also observed in other models.^{12,13}

An induction of apoptosis on 3T3 mouse fibroblast was observed 24 hr after plasma needle treatment,¹⁰ and induction of in vitro tumor cells death was reported by several authors.^{14,15} For example, Fridman et al. have shown an apoptosis induction of the melanoma cancer cell line with the use of an FE-DBD plasma.¹⁴ Kim et al. have also reported that plasma treatments induce cell death in a melanoma cell line, and that this effect was potentiated by association of plasma with antibody-conjugated nanoparticles.¹⁵ DNA damages, cytoskeletal damages, membrane cell charging, and permeation have been proposed to participate in apoptosis induction.^{14,16} However, apoptotic processes involved remain rather unclear and need further investigations.

These encouraging results dealing with in vitro induction of apoptosis on different cell lines led us to explore effects of plasma treatment on xenograft tumor, the first in vivo approach on potential antitumor effect of non thermal treatment. Results of this treatment were unpredictable due to the fact that interaction between plasma and tumor cell might be quite different in in vitro and in vivo experiments. In particular, the presence of the skin and the use of a 3D tumor model might introduce crucial changes and modify the in vivo antitumor effects of plasma.

To develop plasma for in fine clinical applications, plasma tolerance and effects on organisms have to be determined. Fridman et al. have shown that plasma can be applied directly to a living tissue, and have determined the maximum tolerated dose of plasma DBD on mouse skin by histology analysis.⁸ We have previously shown the safety of our plasma treatment protocol for the whole mouse organism and the absence of skin damages of the treated zone.¹⁷ Moreover, an in vivo antitumor effect of plasma treatment was also observed in a small cohort of mice.¹⁷

The U87-MG glioma cell line was chosen to perform this in vivo antitumor efficacy study. This cell line is characterized by a high radio and chemoresistance, and is an adequate model to explore a significant antitumor effect. Moreover, heterotopically

grafted, this cancer cell line presents a hemispherical growth that is a well-suited configuration for treatment with plasma and allows an accurate following of tumor growth by caliper measurement. This plasma treatment was performed in open air with a μ -duration pulsed FE-DBD that delivered less than 0.75 W on the mouse skin at 200 Hz. In this configuration, discharge ignites when the powered electrode approaches the tumor surface at a distance of less than ~ 3 mm.

In this work, we first characterized the plasma generated by the developed FE-DBD system through electrical measurements. Plasma homogeneity during tumor treatment was analyzed with an ICCD camera. Then, we investigate whether five consecutive days of plasma treatment during 6 min per day induced an antitumor effect on U87 glioma-bearing mice by tumor volume measurement and bioluminescence imaging.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Experimental Setup

For all experiments, we used a dielectric barrier discharge (DBD) plasma. Figure 1 presents the whole experimental equipment, and Figure 2 represents the DBD power supply schematic.

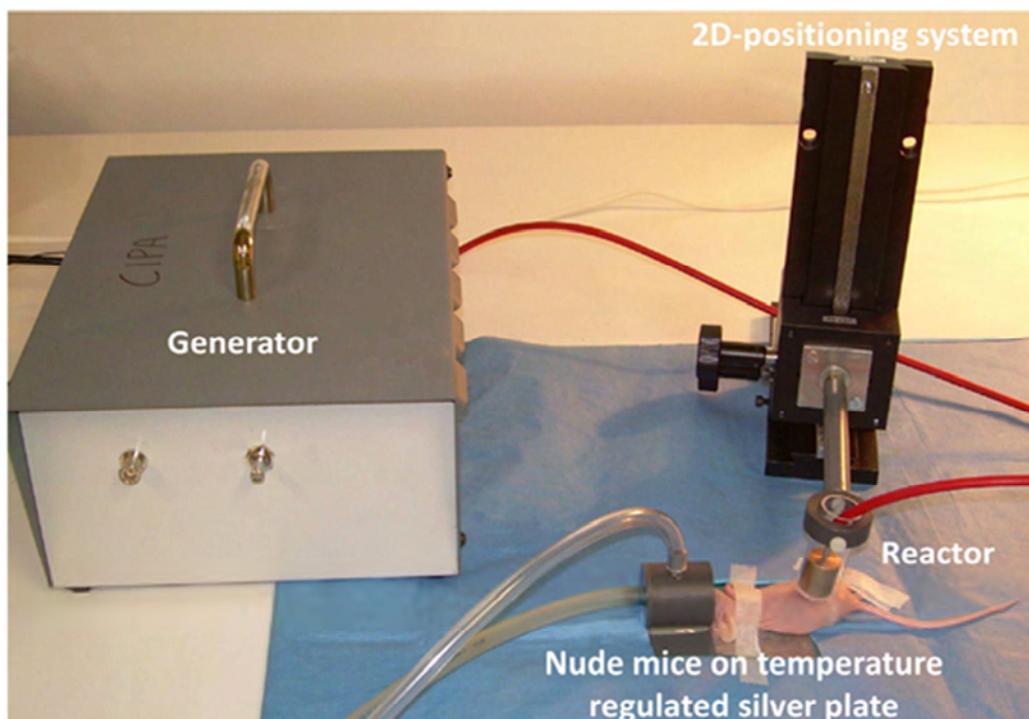


FIGURE 1. Picture representing the whole experimental equipment used to produce DBD plasma. To perform plasma treatment, mice were placed on a temperature-regulated silver plate.

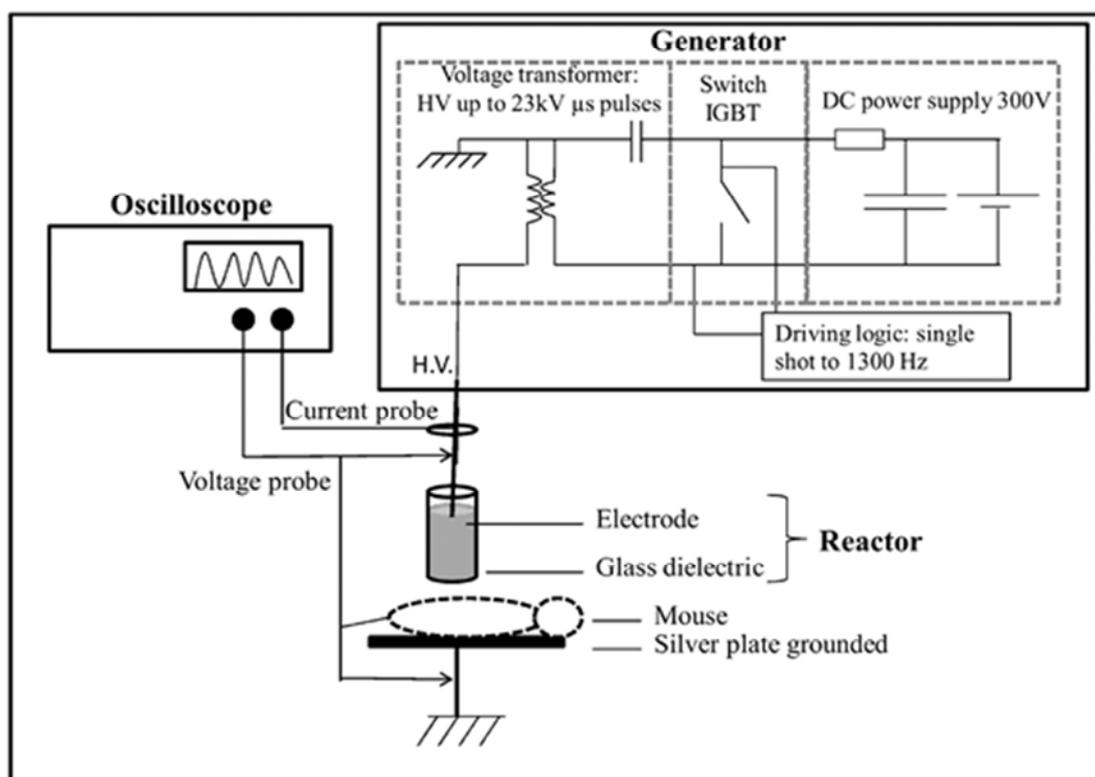


FIGURE 2. Schematics of the DBD setup and of the pulsed power supply.

The electrical driver articulates around three main subassemblies, namely, a DC power supply, a solid state switch, and a voltage pulse transformer. The 300 V amplitude DC power supply is used to store energy in a 700 nF capacitor. The fast discharge of this capacitor is triggered at a variable repetition rate through an IGBT switch in the primary coil of a transformer that allows to produce a voltage pulse amplitude reaching up to 23 kV in the present setup. The high-voltage (HV) pulse is applied on an HV voltage electrode consisting of a 10 mm high, 17 mm diameter aluminium cylinder. This HV electrode is inserted inside a 1 mm thick, 60 mm high, and 19 mm outer diameter borosilicate glass tube. The bottom base of this glass tube is glued with a 1 mm thick borosilicate disk, 19 mm in diameter, which acts as the dielectric wall of the DBD reactor. This system generates air plasma from the external surface of the dielectric barrier disk and a living organism that is placed on a ground plate electrode. This DBD system can produce discharges with frequency that can vary from a single shot to 1300 Hz. The energy stored in the DC powered capacitor multiplied by the generator repetition rate provides the maximum available power.

For a pulse repetition rate of 200 Hz, the maximum power available is ~ 6.3 W, leading to a maximum power density of 2.7 W/cm², when considering a uniform distribution of the discharge over the 2.3 cm² surface of the glass disk. This rough estimate indicates

the maximum mean power density, since it neither accounts for the random filamentary nature of the DBD discharge nor for the power losses associated with the impedance mismatching between the driver output and the DBD reactor. For all tests discussed in this paper, non thermal plasmas were generated in ambient air at atmospheric pressure.

B. Diagnostics

A HV probe (Tektronix P6015A, 75 MHz bandwidth) and a current probe (Tektronix TCP202, 50 MHz bandwidth) were used to characterize the voltage and current waveforms delivered across the DBD reactor. Both probes were connected to an oscilloscope (Tektronix TDS510A).

Discharge homogeneity was analyzed with the use of an ICCD camera (PI-Max, Princeton Instruments) equipped with a 60 mm lens. Experiments were performed both in single-shot or multishot acquisition mode on few discharges, and by image accumulation over a few thousands of discharges, this latter measurement being much more representative of the mouse plasma treatment.

C. Animals and Tumors

Female athymic NCr/Sed nude (nu/nu) mice, five to six weeks of age, were purchased from Charles River (St. Germain sur l'Arbresle, France) and housed for one week before experimentation. For all experiments, animals were housed in plastic cages inside a controlled ventilated rack and had access to food and water ad libitum. Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree No. 87-848). Tumor grafts, plasma irradiation, and bioluminescence imaging were carried out under general gaseous anesthesia obtained with 3% isoflurane (Aerrane, Baxter, Deerfield, Connecticut) in air.

Tumor xenografts were originally obtained by subcutaneous injection of a suspension of U87-Luc human malignant glioma cells (10^6 cells in 0.1 mL 0.9% NaCl) into the hind legs of mice. This cell line purchased from Caliper is stably transfected with firefly luciferase gene. U87 xenografts were then maintained in vivo by sequential passages of tumor fragments in nude mice grafted in the inguinal pit.

D. Treatment Procedures

Treatment started when tumors reached a volume of $150 \pm 50 \text{ mm}^3$ (D_0). Mice were randomly assigned into two groups. In the control group, mice were not treated. In the plasma group, mice received plasma treatment for five consecutive days. Tumor treatments on mice were performed at 200 Hz in open air each day during 6 min (three periods of 2 min separated by 1 min). To perform plasma treatment, anesthetized mice were placed on a humidified, temperature-regulated silver plate, and the plasma reactor was positioned at a distance of 2 mm from the tumor (Fig. 1). These treatment parameters and procedure ensure reproducibility of plasma treatment and limit side effects on mice.

E. Antitumor Effect of Plasma Treatment

To follow tumor growth, tumor volume was determined every day with the international current standard technique for tumor volume measurement.^{18,19} Two perpendicular diameters were measured with a caliper. Tumor volume (V in cubic millimeters) was calculated as $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$.^{18,19} Mice were anesthetized and killed by cervical dislocation when a tumor reached 1000 mm³, thus defining the “survival times.” The percentage of increase in the life span was calculated as $(T-C)/C \times 100$, where T and C are the survival times of the treated and control animals.

Tumor response to plasma treatment was also assessed by BLI before D_0 and 48 hr after treatment completion (D_6). Bioluminescence allows the evaluation of very early stages of antitumor effect prior to physical reduction of tumor volume since bioluminescence intensity is closely dependant on tumor activity.²⁰ Mice were intraperitoneally injected with 2 mg beetle luciferin (potassium salt, Promega) and were then anesthetized. Ten minutes later, bioluminescence imagings were carried out using an ORCA II BT C4742-98-26 LW (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Data acquisition was achieved using HiPic software (Hamamatsu Photonics). Merging of bioluminescence images and regions of interest quantification were obtained using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

F. Statistical Analysis

Unless otherwise noted, data were reported as mean \pm SEM (standard error of the mean). Statistical analysis was performed using GraphPad 5.0 software (GraphPad Prism 5.0 Software MacKiev GraphPad Software, Inc. 1994–2005). For each parameter analyzed, treated and nontreated tumors were compared using the nonparametric Mann-Whitney U test. Kaplan-Meier curve analysis was performed using the log-rank test. Differences were considered significant at p values <0.05 .

III. RESULTS

A. Plasma Characterization

Figure 3 presents the voltage and discharge current signals measured for a 200 Hz repetition rate operation. The voltage waveform exhibits a 4.5 μs rising front up to a 23 kV amplitude, and a damped oscillation vanishing over about 25 μs . This voltage waveform was measured to be constant whatever the pulse repetition rate is up to 1300 Hz, and also for gap thicknesses ranging from 0.5 mm to a few millimeters; this latter condition corresponding to the absence of the DBD plasma associated with streamer formation across the air gap. The current probe, surrounding the cable connected to the HV electrode, measures the total current, which is the sum of the displacement current across the dielectric barrier and the actual discharge current flowing across the air plasma. The discharge current presented in Figure 3 is thus inferred from the probe measurement

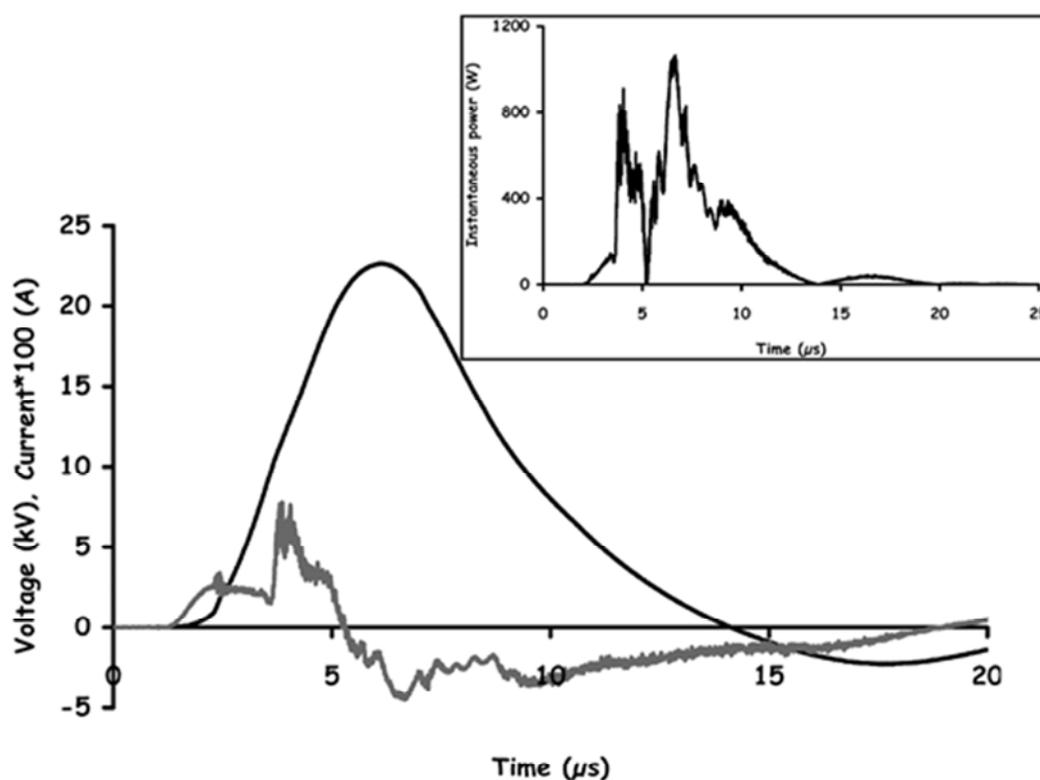


FIGURE 3. Voltage (dark line) and current (gray line) measured during a treatment with the discharge repetition rate at 200 Hz.

by subtracting to the total current waveform, the displacement current signal measured when no plasma is produced, which is for an air gap larger than 5 mm in our experimental conditions. This method for actual plasma discharge current measurement was inspired by the results published by Lu and Laroussi.²¹ With the relatively slow rise time of the voltage pulse delivered by our electronic driver, the discharge current consists of a superposition of current spikes having duration of a few nanoseconds; the limited bandwidth of the probe used in this work results in the temporal integration of these spikes, which are measured as 20 ns long current pulses. Time-resolved ICCD imaging experiments, not presented in this paper, have shown that streamer production in the air gap is observed during about 20 μ s after the current signal onset. The insert in Figure 3 presents the evolution of the instantaneous power delivered across the plasma during the whole voltage pulse application. Peak power reaches about 1 kW while the whole temporal integration of the power signal indicates that, for a 200 Hz repetition rate, 0.75 W are coupled to the DBD plasma. This corresponds to a maximum power density applied on the mouse skin of 0.33 W/cm². This value is below that required for a safe treatment without any significant damage on the skin for a three times 2 min exposure.¹⁷

Figure 4 presents two ICCD images recorded during application of the air plasma on the mouse skin at a 200 Hz repetition rate and for a gap of about 2 mm. Figure 4A and the corresponding radial profile Figure 4C are obtained for a 10-discharge averaging, while Figures 4B and 4D correspond to an average over 5000 discharge events. The radial profiles, extracted from the ICCD images, are averaged along the vertical axis over a distance of 0.5 mm above the mouse skin, and correspond to the same space location. Each profile was then normalized to allow for a more straightforward comparison of their radial shape along the 14 mm wide zone, corresponding to the visible light air plasma emission region observed by the ICCD camera, in the horizontal axis direction. Both for 10 and 5000 discharge accumulations, the images and the corresponding profiles exhibit some rather flat background intensity level over which narrow and intense channels superimpose. Nevertheless, the calculations performed from the image profiles indicate that a significant reduction of about 40% of the standard deviation of the mean intensity value, from pixel position 50 to pixel position 200 in Figures 4C and 4D, is achieved for the 5000-accumulation recording in comparison with the 10-discharge averaging measurement. It must be remembered that plasma treatment of tumor is performed during 6 min at 200 Hz, thus involving the accumulation of 72000 discharges. The mouse's breathing and the accumulation of such a large number of discharge result in the averaging of the gap thickness and the homogenization of the plasma action over the mouse skin.

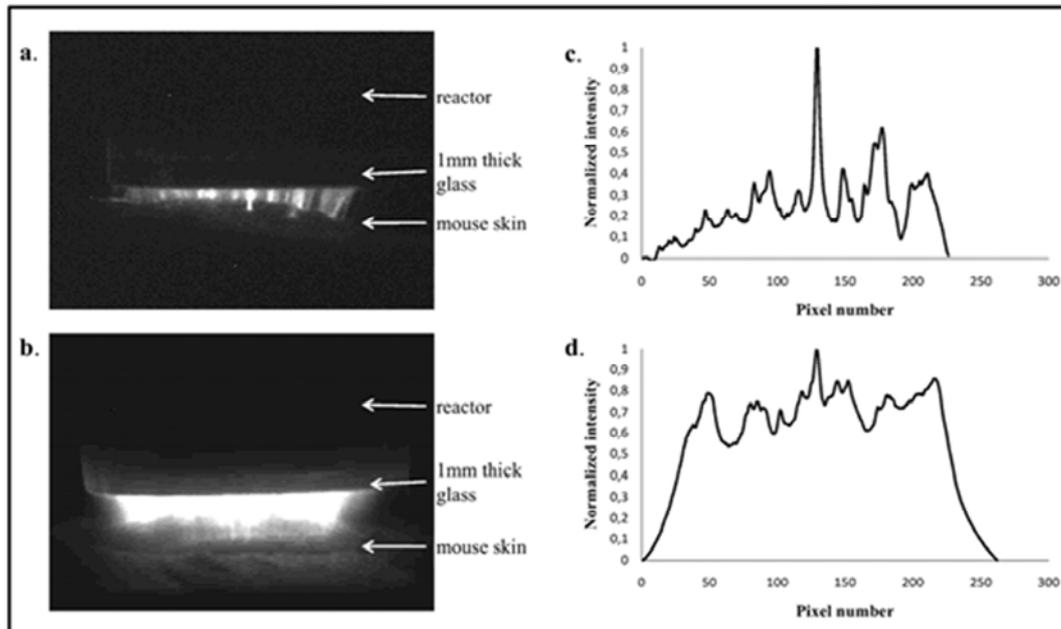


FIGURE 4. ICCD images recorded during application of the air plasma on the mouse skin at a 200 Hz repetition rate and for a gap of about 2 mm. Image in (A) and the corresponding radial profile (C) are obtained for a 10-discharge averaging, while (B) and (D) correspond to an average over 5000 discharge events.

B. Plasma Induces Short-Term Antitumor Effects

To explore the antitumor effect of plasma, treatment was applied every day for five consecutive days. We explored plasma treatment efficacy by tumor volume determination and by bioluminescence assay.

We first evaluated plasma antitumor activity after plasma treatment completion. To this end, treatment started when tumors reached a volume of $150 \pm 50 \text{ mm}^3$, corresponding to D_0 . Mice were randomly assigned into two groups, namely, the control (CTRL) and plasma (PLASMA) groups. Tumor volume was measured at day six (D_6), corresponding to 48 hr after the last plasma treatment. As shown in Figure 5, at the beginning of treatment, mean tumor volumes of CTRL and PLASMA groups were similar ($p = 1.0$). At D_6 , mean tumor volume was $585 \pm 101 \text{ mm}^3$ in CTRL group, whereas the mean volume of plasma-treated tumors only reached $259 \pm 45 \text{ mm}^3$. This significant reduction of tumor growth ($\sim 56\%$, $p = 0.03$) showed a marked plasma antitumor effect as early as the end of our treatment protocol (Fig. 6). However, tumor volume determination by caliper reflects total tumor tissue mass including areas of necrosis and edema, and so does not necessarily assess the effect of a treatment on the number of viable tumor cells.

Therefore, bioluminescence imagings were performed at D_0 and D_6 . Figure 7 represents the ratio D_6/D_0 of BLI intensity, corresponding to the evolution of tumor activity between the beginning and the end of the treatment. As expected, plasma treatment induced a lower increase of BLI ratio than the increase obtained in the CTRL group. Indeed, in the CTRL group, we observed a 24-fold BLI intensity increase during the

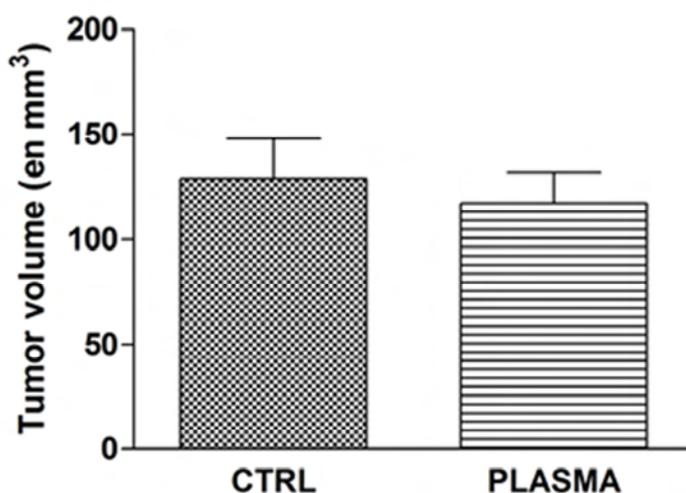


FIGURE 5. Tumor volume at the beginning of plasma treatment. Tumor volumes were measured with a caliper at the beginning of plasma treatment (D_0). The column represents the mean (\pm SEM) of tumor volume. $*p < 0.05$, $n = 8$ for each group.

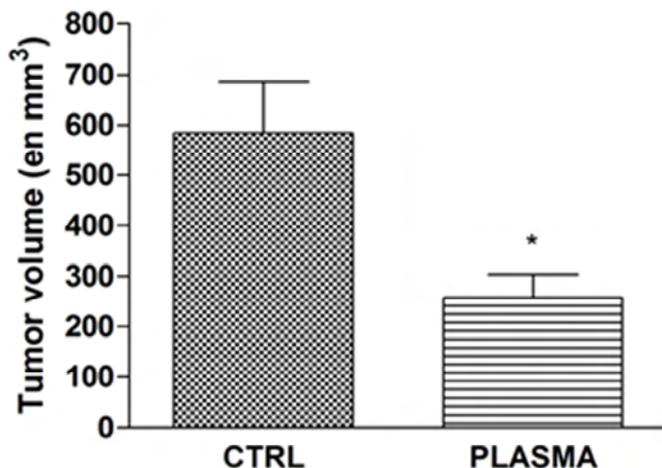


FIGURE 6. Effect of five consecutive plasma treatments on tumor volume. Plasma was administered when tumor reached $150 \pm 50 \text{ mm}^3$ and consisted of five daily fractions (6 min, 200 Hz). Tumor volumes were measured with a caliper on the sixth day. The column represents the mean (\pm SEM) of tumor volume. * $p < 0.05$, $n = 8$ for each group.

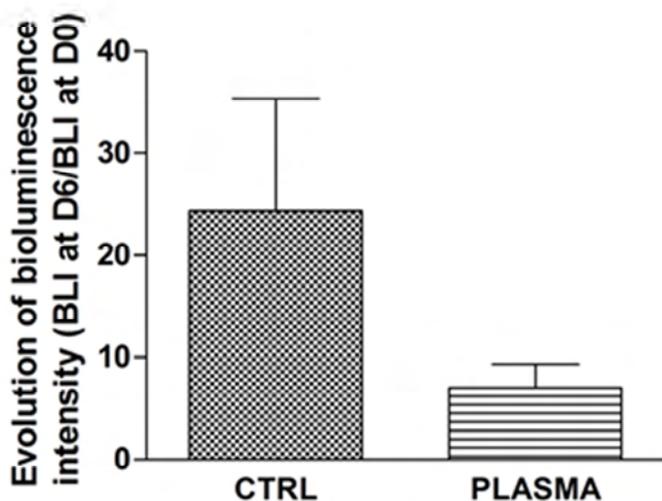


FIGURE 7. Tumor bioluminescence intensity at the end of plasma treatment. Plasma was administered when tumor reached $150 \pm 50 \text{ mm}^3$ and consisted of five daily fractions (6 min, 200 Hz). In vivo bioluminescence imaging were performed before and then 24h after five consecutive days of treatments. Columns represent the mean (\pm SEM) of tumor bioluminescence intensity at day six normalized to tumor bioluminescence intensity before treatment. $n = 8$ for each group.

treatment period, while in the PLASMA group, BLI intensity only increased sevenfold during the same treatment course. This reduction of BLI ratio (~70%) is consistent with the effect of plasma treatment on tumor volume at D_6 described above.

C. Plasma Induces Long-Term Antitumor Effects

To evaluate long-term treatment effects, tumor growth was followed every day until the tumors reached 1000 mm³ (Fig. 8). In the CTRL group, tumors grew exponentially and the mean time to reach 1000 mm³ was 9.6 ± 0.9 days. Plasma treatment was administered for five consecutive days from D_0 to D_4 . During the treatment course, tumors did not significantly grow, mean tumor volume remaining stable between D_0 and D_4 (Fig. 8). After treatment completion, we observed a raise of tumor growth in plasma-treated mice, but tumor growth seemed less rapid than in the CTRL group. The mean time to reach 1000 mm³ was 15.0 ± 0.8 days. Tumor growth delay, corresponding to the difference of times needed to reach 1000 mm³ between CTRL and PLASMA groups, was 5.4 days for plasma-treated tumors, illustrating a significant antitumor effect of plasma. Moreover, we have included in our study a few mice bearing two xenografts (in each inguinal pit), the first one receiving plasma treatment, and the second one being used as a control, to determine whether plasma effects are localized. We have observed that kinetic growths of CTRL and plasma-treated tumors were similar to those of mice bearing only one tumor, highlighting a plasma effect limited to the treated zone.

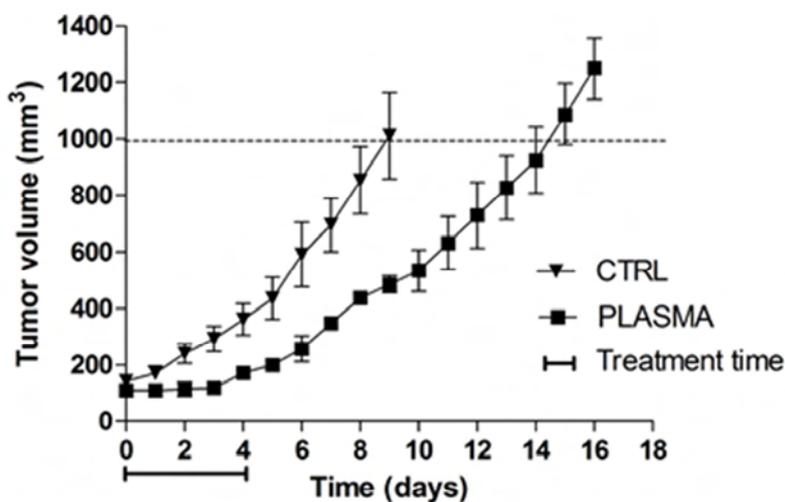


FIGURE 8. In vivo antitumor efficacy of plasma treatment. Plasma was administered when tumor reached 150 ± 50 mm³ and consisted of five daily fractions (6 min, 200 Hz). Tumor volumes were measured every day with a caliper until tumor reached a volume of 1000 mm³. Each point represents the mean (\pm SEM) of tumor volume. $n = 8$ for each group.

The plasma effect was also evaluated using Kaplan-Meier curve analysis (Fig. 9), considering the percentage of tumor not having reached 1000 mm³ as the survival endpoint. Median survival was 9.5 days in the CTRL group. When mice received plasma treatment, the survival curve clearly shifted to the right, and the median survival was 15.0 days in the PLASMA group (versus CTRL $p = 0.002$). This translates into an increase of life span of mice of ~58%.

IV. DISCUSSION

Non thermal atmospheric plasma has emerged as a novel, promising tool in medicine. Indeed, the existence of various components in plasma such as electric field, UV radiation, uncharged species, electrons, and ions, which could interact with the treated tissue, makes plasma a good candidate for cancer treatment. Our preliminary data showed the safety of plasma treatment for the whole mouse organism and the absence of skin damages with our treatment parameters.¹⁷ An antitumor effect of plasma treatment was also observed using a small cohort of mice.¹⁷ To confirm these promising results, we performed this study on a larger number of U87-bearing mice.

In our experiments, we treated mice during five consecutive days for 6 min each day at 200 Hz. This treatment protocol did not show any life-threatening effects on mice. We

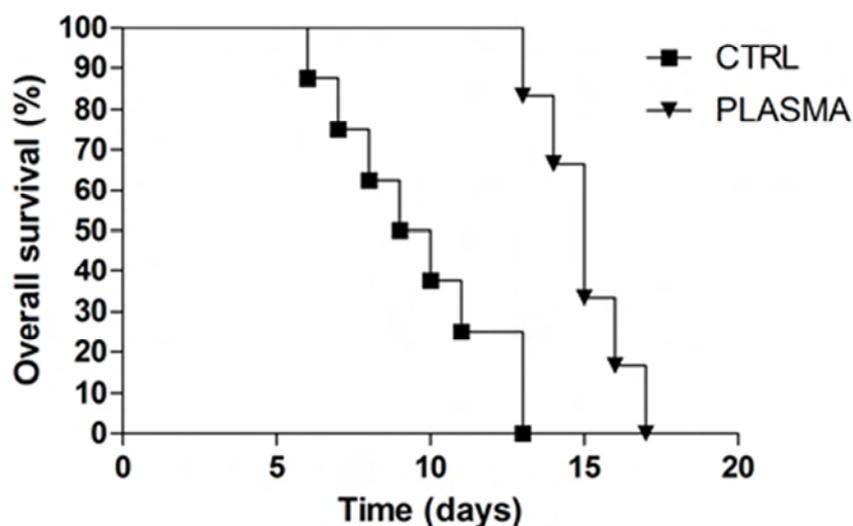


FIGURE 9. Response of subcutaneous glioma xenografts to plasma antitumoral treatments. When tumor reached 150 ± 50 mm³, mice were randomly assigned into two groups, namely, CTRL and PLASMA, eight mice per group. Plasma treatments were delivered for five consecutive days (6 min, 200 Hz). Results are expressed as Kaplan-Meier plots, considering the percentage of tumor not having reached 1000 mm³ as the survival endpoint.

evaluated plasma discharge homogeneity during mice treatment with an ICCD camera. It has been shown that the accumulation of a few thousands of discharges result in a significant homogenization of the plasma treatment over the mouse skin, while single-shot or a reduced number of discharge event operations would result in a very inhomogeneous skin surface treatment, inherent with the microsecond-duration DBD plasma including very narrow streamer channels. One promising issue to achieve a much higher spatial homogeneity, which may be required if the plasma treatment is fractionated in a great number of short duration exposures, each involving a reduced number of discharge accumulation, being to develop nanosecond DBD plasmas.²²

In this study, we chose to evaluate the potential antitumor effect of plasma on U87 high-grade glioma. Malignant brain tumors remain a therapeutic challenge, i.e., despite aggressive surgery, radiotherapy, and chemotherapy, prognosis of patients with high-grade glioma remains poor and their life expectancy is reduced to few months.^{2,3} In the U87 model, our plasma treatment showed a significant reduction of tumor volume (~56%) at the end of the treatment period, as compared to nontreated mice. This result was confirmed by BLI imaging, which exhibited a lower increase of BLI intensity for treated tumor as compared to CTRL, with a reduction of BLI ratio of ~70%. This demonstrates an important effect of plasma on tumor activity, since BLI represents a gene expression closely dependent on proliferation and metabolism of all tumor cells. This result also showed that plasma treatment on a tumor of 200–300 mm³ (corresponding to a tumor length of ~10–11 mm and thickness of ~7–8 mm) induces an effect on the majority of tumor cells, reflecting a high penetration depth of plasma effect. All of these illustrate a marked plasma antitumor effect as early as five days after treatment onset. To the best of our knowledge, plasma has already shown an antitumor activity, but only in *in vitro* experiments. Here, we described an *in vivo* antitumor activity of plasma, which is in accordance with previously published data reporting an apoptosis induction on the CHO cell line and the melanoma cancer cell line.^{10,14,15}

Several reports have demonstrated the high resistance of U87-bearing mice to the cytotoxic effect of radiation therapy. The tumor control dose 50% or TCD₅₀ (the radiation dose necessary to locally control 50% of the tumor) of U87 malignant glioma *in vivo* was as high as 75.2 Gy for single-dose radiotherapy treatment,^{23,24} and this TCD₅₀ was even higher when radiation treatment was daily fractionated and applied at low dose (2 Gy per day).²⁵ This treatment schedule of 2 Gy per day during two weeks has been reported to produce an increase in life span of about 200% in U87-bearing mice.²⁶ In our study, plasma showed an increase of 60% of mice life span, which reflects a high cytotoxic effect of plasma treatment. Even if this increase in life span was smaller for plasma treatment than for radiotherapy, our treatment was applied during only five consecutive days at three times 2 min at 200 Hz. Given the very good tolerability of plasma, frequencies and treatment protocol duration could be increased to improve plasma efficacy. Indeed, we observed a stabilization of tumor volumes during treatment course, suggesting that a more prolonged treatment should be of valuable interest.

The high cytotoxic effect observed in this study could be mediated by several com-

ponents of plasma and involved different mechanisms. We have previously shown an increase of BLI intensity after the first day of plasma treatment,¹⁷ reflecting a possible tumor reoxygenation. This increase of oxygen supply and tumor reoxygenation could be linked to tumor temperature increase²⁷ and the diffusion through the skin of NO, a potent vasodilator.^{28,29} This tumor reoxygenation generally observed after radiotherapy induced a tumor cell sensitization to chemo-/radiotherapy, and such an effect could be transposed in our case.³⁰ Moreover, the authors have demonstrated a cytotoxic effect of UV-C radiation on *in vitro* U87 cell lines.³¹ However, UV-C penetration through the skin was limited (2 μm),³² and cannot reach the subcutaneous tumor in our model considering mouse skin thickness. Furthermore, electric fields are an important component of plasma and have also shown to induce an antitumor effect on U87 *in vivo* xenografts. This new antitumor strategy is currently evaluated in clinical trial for patients with recurrent glioblastoma.^{33,34} The presence of nanosecond electric pulse in plasma could induce an arrest of cell proliferation and contribute to the observed antitumor effect.

All these parameters (i.e., species, temperature, electric fields, etc.) could be toxic to cells, inducing membrane damages and changes in intracellular signaling pathways, finally leading to cell death. It is rather probable that, as observed for radiotherapy, efficacy of plasma treatment was tumor cell type dependent, and different parameters could be implicated in this effect as tumor hypoxia, cell cycle phase, and DNA repair capacities.^{35,36} Specific plasma can be created to produce either neutrals or charged particles: in particular, with the adjunction of gas mixtures such air/argon to raise up long-lived (O_3 , NO) and short-lived (OH, O) particles. This will help us to elucidate the critical mechanism(s) involved in plasma cytotoxic effects and thereafter to increase plasma treatment efficacy.

In the future, to improve plasma antitumor efficacy, it should be kept in mind that plasma treatment presents a broad range of effects. In particular, it has been shown that cells become transiently permeable during plasma exposure.^{37,38} This property could be of valuable interest to increase intracellular chemotherapy penetration and/or transfect therapeutic DNA into cancer cells. A concomitant administration of targeted chemotherapy with plasma treatment could improve efficacy of chemotherapy and plasma alone.

V. CONCLUSIONS

In conclusion, our study demonstrates a marked antitumor effect of plasma treatment in U87 glioma xenografts with a significant decrease of tumor volume at the end of treatment and an increase of mouse life span of 60%, thus confirming our previous data. These results, obtained in a radio and chemoresistant model, are very promising and highlight the potential of plasma treatment as an anticancer treatment with little or no toxic side effects. However, many questions remain unanswered, and further studies are required to elucidate mechanisms involved in this decrease of tumor volume; in particular, by apoptosis and cell cycle analysis. Moreover, studies to identify the main components of plasma implicated in the cytotoxic effect will allow us to develop plasma types with a greater efficacy. Indeed, our lab developed a pulsed plasma gun delivering

a very fast moving plasma bullet in a 200 μm inner diameter flexible dielectric capillary a few tens of centimeters long.³⁹ In the future, this plasma gun could be used for in situ cancer treatment by endoscopic application.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Region Centre through the APR program "PlasMed." The authors thank the PlasMed medical advisory board of University Hospital in Tours and Regional Hospital in Orleans. M.V. is supported by a Germitec doctoral fellowship.

REFERENCES

1. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 2007;18:581–92.
2. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 2007;21:2683–710.
3. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005;109:93–108.
4. Favia P. Special Issue: Biomedical Applications of Plasma Processes. *Plasma Process Polym.* 2006;3:383–561
5. Laroussi M. Non thermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Trans Plasma Sci.* 2002;30:1409–15.
6. Weltmann KD, Brandenburg R, von Woedtke T, Ehlbeck J, Foest R, Stieber M, Kindel E. Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized atmospheric pressure plasma jets (APPJs). *J Phys D.* 2008;41:194008-194014.
7. Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm.* 2001;226:1–21.
8. Fridman G, Peddinghaus M, Ayan H, Fridman A, Balasubramanian M, Gutsol A, Brooks A, Friedman G. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process.* 2006;26:425–42.
9. Kieft IE, Broers JLV, Caubet-Hilloutou V, Slaaf DW, Ramaekers FCS, Stoffels E. Electric discharge plasmas influence attachment of cultured CHO k1 cells. *Bioelectromagnetics.* 2004;25:362–8.
10. Kieft IE, Kurdi M, Stoffels E, editors. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. 4th International Symposium on Non thermal Medical/Biological Treatments Using Electromagnetic Fields and Ionized Gases; 2005 May; Portland, OR: IEEE-Inst Electrical Electronics Engineers Inc.; 2005.
11. Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van den Bedem LJM, van der Laan EP, Steinbuch M, editors. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. European Summer School on Low Temperature Plasma Physics; 2004 Sep 26–Oct 8; Bad Honnef, Germany: IOP Publishing Ltd.; 2006;15:169-180.

12. Yonson S, Coulombe S, Leveille V, Leask RL. Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch. *J Phys D*. 2006;39:3508–13.
13. Shashurin A, Keidar M, Bronnikov S, Jurjus RA, Stepp MA. Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet. *Appl Phys Lett*. 2008;93:181501-181503.
14. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, Vasilets V, Friedman G. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process*. 2007;27:163–76.
15. Kim GC, Kim GJ, Park SR, Jeon SM, Seo HJ, Iza F, Lee JK. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer. *J Phys D*. 2009;42:032005-032010.
16. Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Trans Plasma Sci*. 2008;36:1441–57.
17. Vandamme M, Robert E, Pesnel S, Barbosa E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A, Pouvesle J-M. Antitumor effect of plasma treatment on U87 glioma xenografts: preliminary results. *Plasma Process Polym*. 2010;7 :264-273.
18. Euhus DM, Hudd C, Laregina M, Johnson FE. Tumor measurement in the nude-mouse. *J Surg Oncol*. 1986;31:229–34.
19. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24:148–54.
20. Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, Yu SF, Dusich J, Purchio T, Contag PR. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2003;20:733–44.
21. Lu X, Laroussi M. Dynamics of an atmospheric pressure plasma plume generated by submicrosecond voltage pulses. *J Appl Phys*. 2006;100:063302-063308.
22. Ayan H, Staack D, Fridman G, Gutsol A, Mukhin Y, Starikovskii A, Fridman A, Friedman G. Application of nanosecond-pulsed dielectric barrier discharge for biomedical treatment of topographically non-uniform surfaces. *J Phys D: Appl Phys*. 2009;42:125002-125007.
23. Suit HD, Zietman A, Tomkinson K, Ramsay J, Gerweck L, Sedlacek R. Radiation response of xenografts of a human squamous cell carcinoma and a glioblastoma multiforme: a progress report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1990;18:365–73.
24. Taghian A, DuBois W, Budach W, Baumann M, Freeman J, Suit H. In vivo radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;32:99–104.
25. Baumann M, DuBois W, Pu A, Freeman J, Suit HD. Response of xenografts of human malignant gliomas and squamous cell carcinomas to fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992;23:803–9.
26. Labussiere M, Aarnink A, Pinel S, Taillandier L, Escanye JM, Barberi-Heyob M, Bernier-Chastagner V, Plenat F, Chastagner P. Interest of liposomal doxorubicin as a radiosensitizer in malignant glioma xenografts. *Anticancer Drugs*. 2008;19:991–8.
27. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 2002;43:33–56.
28. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric-oxide release accounts for the biological-activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524–6.

29. Tucker AT, Pearson RM, Cooke ED, Benjamin N. Effect of nitric-oxide-generating system on microcirculatory blood flow in skin of patients with severe Raynaud's syndrome: a randomised trial. *Lancet*. 1999;354:1670–5.
30. Song CW, Shakil A, Griffin RJ, Okajima K. Improvement of tumor oxygenation status by mild temperature hyperthermia alone or in combination with carbogen. *Semin Oncol*. 1997;24:626–32.
31. Batista LFZ, Roos WP, Kaina B, Menck CFM. p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res*. 2009;7:237–46.
32. Anderson RR, Parrish JA. The optics of human-skin. *J Invest Dermatol*. 1981;77:13–9.
33. Kirson ED, Dbaly V, Tovarys F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, Mordechovich D, Steinberg-Shapira S, Gurvich Z, Schneiderman R, Wasserman Y, Salzberg M, Ryffel B, Goldsher D, Dekel E, Palti Y. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:10152–7.
34. Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res*. 2004;64:3288–95.
35. Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:241–8.
36. Seiwert TY, Salama JK, Vokes EE. The concurrent chemoradiation paradigm—general principles. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007;4:86–100.
37. Ogawa Y, Morikawa N, Ohkubo-Suzuki A, Miyoshi S, Arakawa H, Kita Y, Nishimura S. An epoch-making application of discharge plasma phenomenon to gene-transfer. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92:865–70.
38. Sakai Y, Khajoev V, Ogawa Y, Kusuhara K, Katayama Y, Hara T. A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma. *J Biotechnol*. 2006;121:299–308.
39. Robert E, Barbosa E, Dozias S, Vandamme M, Cachoncinlle C, Viladrosa R, Pouvesle J-M. Experimental study of a nanosecond plasma gun. *Plasma Process Polym*. 2009;6:795–802.

B. Mécanismes d'action de l'activité antitumorale des plasmas froids

1. Publication « Implication des ROS dans l'effet antitumoral du plasma »

Après avoir démontré l'efficacité antitumorale de la DBD sur la lignée U87-MG xénogreffés chez la souris *nude*, nous avons exploré les mécanismes d'action associés à cet effet à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les résultats ont conduit à la publication de l'article présenté ci-dessous dans *l'International Journal of Cancer*.

En utilisant le même générateur plasma que celui de la publication précédente, l'étude de l'efficacité antitumorale du plasma a été déterminée *in vitro* sur deux lignées différentes (HCT-116 et U87-MG). Les doses de plasma administrées sont exprimées en J/cm² dans cette publication, une dose de 10J/cm² correspondant à un traitement de 15s à 200Hz et 20J/cm² pour 30s à 200Hz. L'efficacité antitumorale a été déterminée par comptage cellulaire, par test de viabilité MTT et par BLI. Quel que soit le test utilisé, le plasma présente une activité antitumorale importante sur les deux lignées cellulaires avec une DL₅₀ à 24h de 9J/cm² pour la lignée U87-MG et de 8J/cm² pour la lignée HCT-116.

Pour identifier les composants du plasma impliqués dans cet effet, des traitements directs et indirects des cellules ont été réalisés. Dans le cadre du traitement direct, le plasma est en contact direct avec le milieu et les cellules, alors que dans le cadre du traitement indirect, du milieu est traité séparément puis déposé délicatement sur les cellules. Ces deux types de traitement induisent une diminution similaire de la viabilité cellulaire ce qui suggère un rôle prépondérant du milieu dans l'effet observé. L'importance des ROS dans cet effet a été confirmé en utilisant un inhibiteur de ROS (la NAC – *N-Acétyl Cystéine*). En sa présence, le plasma n'induit plus aucun effet sur les cellules tumorales.

En utilisant des sondes fluorescentes sensibles aux ROS, il a été possible de déterminer la quantité de ROS générée dans le milieu de culture par le plasma. Une concentration de H₂O₂ dans le milieu équivalente à 600µM pour 10J/cm² et 900µM pour 20J/cm² ont été mesurées. Il y a également une augmentation significative de O₂^{•-} dans le milieu après le traitement.

L'impact du plasma sur le cycle cellulaire a ensuite été déterminé et a montré que le plasma induit des arrêts dans différentes phases du cycle cellulaire, et en particulier dans la

phase S. Pour confirmer que cette augmentation de cellules en phase S n'était pas liée à une augmentation de la prolifération des cellules, un test de prolifération par incorporation du BrdU a été conduit et montre un arrêt très important de la prolifération cellulaire pour les deux doses considérées.

Ces arrêts dans le cycle cellulaire sont en partie liés à la génération de dommage de l'ADN par le plasma. En effet, une augmentation significative du nombre de cassures de l'ADN est retrouvée dans les heures suivant le traitement avec un marquage γ -H2Ax. Pour finir, le plasma induit une augmentation du nombre de cellules en apoptose et en nécrose 24h après traitement. Ces données suggèrent que le plasma génère des ROS dans le milieu qui vont ensuite attaquer les cellules tumorales, en formant des cassures dans la double hélice d'ADN qui conduit à un arrêt de la prolifération et pour finir à un déclenchement d'apoptose.

L'étude de l'effet du plasma a ensuite été réalisée *in vivo* sur la lignée U87-MG greffée en sous cutané. Le traitement a été administré pendant 5 jours consécutifs pendant 6 minutes à 200Hz. Dans ces conditions de traitement, le plasma induit une stabilisation du volume tumoral confirmé par l'imagerie de BLI. Le volume tumoral des souris CTRL atteignait 400 mm³ alors que celui des souris était de 233 mm³.

24h après le dernier jour de traitement, les tumeurs sont récupérées et sont analysés pour analyser les paramètres d'apoptose et de cycle cellulaire. Une augmentation significative et homogène dans l'ensemble de la tumeur du taux d'apoptose est observée. L'étude du cycle cellulaire montre une augmentation du nombre de cellules en phase S après le traitement. Ces résultats semblent concordants avec ceux retrouvés *in vitro* suggérant un mécanisme d'action similaire.

Cette publication démontre pour la première fois l'importance des ROS dans l'effet anti-tumoral du plasma froid et soulève des questions sur la pénétration du plasma dans les tissus.

ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma

Marc Vandamme^{1,2,3}, Eric Robert², Stéphanie Lerondel³, Vanessa Sarron², Delphine Ries², Sébastien Dozias², Julien Sobilo³, David Gosset⁴, Claudine Kieda⁴, Brigitte Legrain⁵, Jean-Michel Pouvesle² and Alain Le Pape^{3,6}

¹GERMITEC SAS, 30 rue Mozart, 92110 CLICHY, France

²GREMI UMR-6606 CNRS, Université d'Orléans, 14 rue d'Issoudun - BP 6744, 45067 ORLEANS cedex 2, France

³TAAM-CIPA, UPS44 CNRS, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 ORLEANS cedex 2, France

⁴Plateforme de Cytométrie et d'imagerie cellulaire, Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 CNRS, rue Charles Sadron, 45071 ORLEANS cedex 2, France

⁵NOVAXIA, ZA Petit Four, 41220 Saint Laurent Nouan

⁶Inserm U618, Université François Rabelais, Tours, France

Non-thermal plasma (NTP) is generated by ionizing neutral gas molecules/atoms leading to a highly reactive gas at ambient temperature containing excited molecules, reactive species and generating transient electric fields. Given its potential to interact with tissue or cells without a significant temperature increase, NTP appears as a promising approach for the treatment of various diseases including cancer. The aim of our study was to evaluate the interest of NTP both *in vitro* and *in vivo*. To this end, we evaluated the antitumor activity of NTP *in vitro* on two human cancer cell lines (glioblastoma U87MG and colorectal carcinoma HCT-116). Our data showed that NTP generated a large amount of reactive oxygen species (ROS), leading to the formation of DNA damages. This resulted in a multiphase cell cycle arrest and a subsequent apoptosis induction. In addition, *in vivo* experiments on U87MG bearing mice showed that NTP induced a reduction of bioluminescence and tumor volume as compared to nontreated mice. An induction of apoptosis was also observed together with an accumulation of cells in S phase of the cell cycle suggesting an arrest of tumor proliferation. In conclusion, we demonstrated here that the potential of NTP to generate ROS renders this strategy particularly promising in the context of tumor treatment.

Plasma, considered as the fourth state of the matter, has already a broad range of applications in industry¹ and in medicine.^{2,3} Recently, the development of a new kind of plasma devices generating non-thermal plasma (NTP) has extended their potential applications especially in biology and medicine.⁴⁻⁶ NTP with a temperature less than 40°C at the point of treatment is a partially ionized media generated by excita-

Key words: ROS, DNA damages, cancer therapy, non-thermal plasma, xenograft model

Abbreviations: BLI: bioluminescence imaging; BrdU:

bromodeoxyuridine; DHE: dihydroethidium; DNA: deoxyribonucleic acid; FE-DBD: floating electrode dielectric barrier discharge; FITC: fluorescein isothiocyanate; FLI: fluorescence imaging; H2DCFDA: 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAC: N-Acetyl-L-cysteine; NTP: non-thermal plasma; ROS: reactive oxygen species; RS: reactive species
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

DOI: 10.1002/ijc.26252

History: Received 26 Feb 2011; Accepted 30 May 2011; Online 23 Jun 2011

Correspondence to: Marc Vandamme, GREMI UMR 6606, 14 rue d'Issoudun - BP6744, 45067 ORLEANS cedex 2, France, Tel.: +332-3849-4531, Fax: +3-323-841-7154, E-mail: marc.vandamme@cnrs-orleans.fr

tion of a gas mixture in a discharge reactor. It contains electrons, positive/negative ions, radicals, various excited molecules, energetic photons (UV) and generates transient electric field. Given these interesting properties, potential applications are blood coagulation,⁷ skin decontamination without significant skin damages,⁸ wound healing,⁹ and tumor treatment.¹⁰

The dose of NTP delivered is an important parameter to induce biological responses in tissue and cells.⁸ Indeed, low dose of plasma (<1 J cm⁻²) is able to induce inactivation of bacteria and proliferation of cells,^{11,12} while higher dose (>7 J cm⁻²) can induce apoptosis of tumor cells including melanoma, breast cancer cells and hepatocellular carcinoma.¹³⁻¹⁷ Sensenig *et al.* and Kim *et al.* have suggested that DNA damages and reactive species generated by plasma could be the main causes of this effect.^{14,18} In a recent work, Kalghatgi *et al.* showed that a low dose of NTP enhances endothelial cell proliferation due to the reactive oxygen species (ROS) generated by NTP mediated FGF-2 release.¹¹ On non-tumorigenic breast epithelial cell line, NTP was also recently described to induce DNA damage leading to apoptosis due to the formation of intracellular ROS.¹⁹ ROS are potentially harmful on cellular metabolism by affecting cell functions with a direct effect on cell development, growth, survival as well as tumorigenesis.²⁰ As described for NTP, the effect of ROS on cells is dose-dependent. While low doses of ROS induce mutagenesis and cell proliferation, high levels not

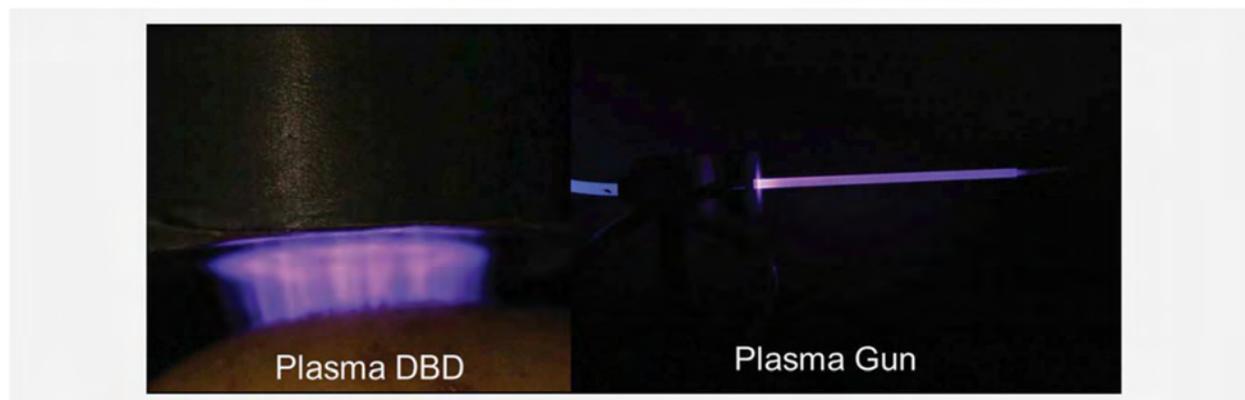


Figure 1. Non-thermal plasmas. NTP generated with DBD system (left panel). NTP generated at the extremity of a very small capillary so called "plasma gun" (right panel), plasma expands over 12 cm in a 4 mm inner diameter glass capillary and then in ambient air along about 2 cm.

only inhibit cell proliferation, but also induce a high cytotoxic effect to the cell and can lead to apoptosis of a wide range of tumors.^{20–22}

Radiotherapy mechanisms are also based on the formation in targeted cells of ROS including superoxide, hydrogen peroxide and free hydroxyl, that are able to induce lethal DNA damages which activate cell cycle checkpoints and initiate signaling cascades leading to cell death.^{23,24} NTP, thanks to its ability to generate *in situ* ROS at the vicinity of the tumor, appears thus as a good candidate for cancer treatment. Indeed, recent development in plasma sources allows the propagation of cold plasma in small capillary as plasma jet,²⁵ so opening perspective to treat such tumor types as colorectal, lung or pancreas tumor with a flexible micro plasma endoscope (Fig. 1). A preliminary survival study has shown an antitumor activity of plasma floating electrode dielectric barrier discharge (FE-DBD) *in vivo* with a significant lifespan increase in mice bearing U87MG malignant glioma.²⁶ This plasma is generated in the gap between an insulated high voltage electrode and the skin or the tissue (floating electrode) (Fig. 1). Very few studies have described mechanisms implied in the effect of NTP on tumor cells and further characterization of global effect of plasma on cells is needed.

The aim of this work was to evaluate antitumor effect of NTP *in vitro* along with mechanisms underlying massive cell death induction. We first documented the *in vitro* antitumor activity of plasma using MTT and bioluminescence assay. Then, we considered the role of ROS in this antitumor activity as well as formation of DNA strand breaks, cell cycle modifications and apoptosis induction.

On U87MG glioma bearing mice, we evaluated effect of NTP on tumor volume and the consequences of treatment on cell proliferation, cell cycle and apoptosis induction. For such a goal, bioluminescence imaging (BLI), an imaging modality dependent on cell metabolism and proliferation, is a unique resource when exploited in association with cellular biomarkers.

Material and Methods

Cell culture

U87MG-Luc2 and HCT-116-Luc2 Bioware Ultra cell lines were purchased from Caliper® (Caliper Life Sciences, Roissy, France) and maintained in a humidified incubator containing 5% CO₂ at 37°C. Cells were cultured in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine and 1% penicillin-streptomycin (10,000 U/mL). Both cell lines are stably transfected with firefly luciferase gene, thus allowing BLI.

Animals and tumors

Swiss nude female mice, 4 weeks of age, were purchased from Charles River® (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) and acclimated for 1 week in the laboratory before experimentation. Animals were housed in plastic cages inside a controlled ventilated rack with free access to water and food *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with national animal care guidelines (EC directive 86/609/CEE, French decree no 87-848). Tumor xenografts, plasma treatment and BLI were carried out under general anesthesia obtained with 2% isoflurane in air (Aerrane®, Maurepas, France). Tumor xenografts were achieved by subcutaneous injection of tumor cells suspension (10⁶ cells in 0.1 mL 0.9% NaCl) into the hind legs. To follow tumor growth, tumor volume (*V* in mm³) was measured with a caliper and was calculated as $V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$.

Plasma treatment

Plasma was generated with a FE-DBD by applying a micro-second pulse voltage of 23 kV. Plasma is generated in open air in the gap fixed at 2 mm between the insulated electrode (one mm thick glass) and the sample. Discharge power density of our DBD was 0.52 watts at 2000 Hz, thus a 15s treatment using the 0.78 cm² insulated reactor lead to a dose of 10 J/cm². More detailed characteristics of plasma sources are presented in Supporting Information.

In *in vitro* experiments, U87MG and HCT-116 cells (1×10^5) were seeded in 24-well plates 24 hr before plasma treatment. Direct plasma treatment of cells seeded in 24-well plates was performed in open air, 2 mm upper the medium of each well containing adherent cells and 500 μ L of medium (Supporting Information Fig. S1). For indirect treatment, plasma was applied in a well containing 500 μ L medium only (without cells). Then, treated medium was immediately and carefully dropped in wells containing cells. During these two exposure conditions, the increase in temperature of the medium was observed to be less than 1°C and no significant pH modification was observed (data not shown).

For *in vivo* studies, when tumors reached a volume of 125 ± 50 mm³ (D0), mice were randomly assigned into two groups. In the CTRL group, mice were not treated while in NTP group, mice received plasma treatment. Each group of treatment included 16 mice. Tumor treatment was performed daily at 200 Hz during 6 min for five consecutive days (corresponding to 120 J/cm²/day), this treatment dose was previously determined with a tolerance study.²⁶ During all treatment procedure anesthetized mice were placed on a temperature regulated silver plate and plasma reactor was positioned at a distance of two millimeters above the tumor (Supporting Information Fig. S1). After 24 hr of the last day treatment, all tumors were excised and half of them were used for cytometry analyses (eight tumors per group) and the others tumors were used for histology analyses (eight tumors per group).

Bioluminescence

Tumor growth of treated and nontreated mice was monitored by tumor volume measurement and BLI. BLI is an imaging modality allowing the evaluation of very early stages of antitumor effect prior to physical reduction of the tumor and bioluminescence intensity is closely dependent on the tumor activity.

In vivo BLI: BLI imaging of mice was performed before the first treatment (D0) then during treatment course (at D3) and 24 hr after the end of treatment (at D5) using IVIS Lumina and analyzed with Living Image software (Caliper Life Sciences, Roissy, France). To this end, animals were intraperitoneally injected with 100 mg/kg luciferin potassium salt (Promega, Paris, France) and imaging was acquired 6 min after substrate injection under general anesthesia in the dark box of a high sensitivity CCD camera cooled to -90°C (IVIS Lumina II, Caliper Life Sciences, Roissy, France). Acquisition settings (binning and duration) were set up depending upon tumor activity at the time of the acquisition and images were acquired and analyzed using Living Image software (Caliper Life Sciences, Roissy, France).

Cell growth assay

HCT-116 and U87 cell number and cell growth inhibition by NTP were determined by trypan blue exclusion assay, by BLI and by measuring 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) dye absorbance by living cells. Cells were treated as described and incubated for additional

24 hr. *In vitro* BLI: 300 μ g/mL luciferin potassium salt (Promega, Paris, France) was added in the well plate and the BLI was recorded after 5 min incubation at 37°C using IVIS Lumina (Caliper). BLI intensity of each well in photon/sec was normalized to nontreated cells. Concerning MTT assay, MTT solution (2.5 mg/mL in PBS) was added to each well and cells were incubated for 4 hr. Formazan crystals resulting from MTT reduction were dissolved by the addition of 10% SDS in DMSO/acetic acid solution per well. The relative quantity of formazan products formed in each well was detected by reading absorbance at 570 nm.

ROS inhibition

To inhibit ROS, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma-Aldrich, Lyon, France), an intracellular ROS scavenger, was used. Cells were pretreated with 4 mM NAC for 30 min prior treatment by NTP.

Detection of ROS levels in the medium

ROS such as H₂O₂, \bullet OH and ONOO \bullet were detected using an oxidation-sensitive fluorescent probe dye 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Sigma-Aldrich, Lyon, France, Ex/Em = 495/529 nm). As H₂DCFDA is poorly selective for O₂ \bullet , dihydroethidium (DHE, Sigma-Aldrich, Lyon, France, Ex/Em = 518/605 nm), which is highly selective for O₂ \bullet , was used for its detection (detailed in Supporting Information). Fluorescence was acquired using IVIS Lumina with the suitable filters and analyzed with Living Image software (Caliper Life Sciences, Roissy, France).

Apoptosis detection

In vitro, cell apoptosis was measured 24 hr after NTP by flow cytometry using an annexin V-FITC apoptosis detection kit (R&D Systems, Lille, France). Non adherent and adherent cells were collected 24 hr after treatment. Using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, Lille, France), cells were stained with Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) according to the manufacturer's instructions. For each measurement, at least 20,000 cells were analyzed by flow cytometry using a FACSsort (Becton and Dickinson, Le pont de Claix, France).

In vivo, 24 hr after the end of the treatment, tumors were excised and apoptosis indexes were determined by immunohistochemistry detection of cleaved caspase 3 with SignalStain Cleaved Caspase-3 IHC kit (Cell Signaling, Saint Quentin Yvelines, France) according to the manufacturer. These experiments were realized under double blind analysis in collaboration with Novaxia, Saint Laurent Nouan, France, a company specialized in histology-pathology. The percentage of labeled tumor cells was evaluated in adjacent areas of the tumor mass free from necrosis. Additional details are given in Supporting Information.

Cell cycle analysis and cell proliferation

Cell cycle analysis was performed 24 hr after NTP by combined propidium iodide and bromodeoxyuridine (BrdU,

Table 1. Cell number after NTP treatment

Groups	U87		HCT-116	
	Living cells	Dead cells	Living cells	Dead cells
CTRL	81,000 ± 5,300	6,250 ± 144	118,000 ± 6,831	17,000 ± 1,915
10 J/cm ²	44,000 ± 2,000 *	19,500 ± 3,700 *	56,333 ± 4,240 **	26,000 ± 2,582 *
20 J/cm ²	3,000 ± 1,700 *	34,000 ± 3,200 *	12,222 ± 1,899 **	57,111 ± 3,068 *

Data are presented as mean ± SEM.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. CTRL.

Sigma-Aldrich, Lyon, France). Briefly, after methanol fixation and Triton X-100 permeabilization, cells were incubated for 30 min with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-BrdU antibody (7 µg/mL, Millipore, Molsheim, France). An IgG1 mouse secondary FITC-conjugated (Millipore, Molsheim, France) was used as negative control for non-specific fluorescence. As a positive control, we used cells treated by topotecan (0.2 µM). Cells were finally incubated with 5 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich, Lyon, France) prior to analysis using a FACSsort (Becton and Dickinson, Le pont de Claix, France). Additional details are given in Supporting Information.

Cell cycle distribution *in vivo* was determined by DNA content analysis after propidium iodide staining as described earlier.^{27,28} Briefly, tumor samples were incubated with trypsin (0.03 mg/mL) and were dissociated using a Potter pestle. Samples were then treated with RNase A (0.1 mg/mL) and incubated with propidium iodide (0.4 mg/mL) for 30 min in the dark. Then samples were filtered on a nylon mesh prior to analysis using a FACSsort (Becton and Dickinson, Le pont de Claix, France).

DNA damages

To detect DNA damages after NTP treatment, assessment of γ H2AX immunofluorescence (IF) by flow cytometry was performed 1 hr after treatment using γ H2AX phosphorylation Assay Kit (Millipore, Molsheim, France) in accordance with manufacturer protocol. Briefly, after ethanol fixation and saponin cell permeabilization, histone H2AX phosphorylated at serine 139 was detected by the addition of the antiphospho-Histone γ H2AX, FITC conjugate. As a negative control for nonspecific binding an IgG1 mouse secondary FITC-conjugated (Millipore, Molsheim, France) was used. As a positive control, we used cells treated by topotecan (0.2 µM). The degree of γ H2AX phosphorylation was analysis using a FACSsort (Becton and Dickinson, Le pont de Claix, France).

Statistical analysis

Unless otherwise noted, data were reported as a mean ± SEM. Mann-Whitney test was used to evaluate the statistical significance of the results. DL50 were determined according to the Hill slope method (GraphPad Prism 5.0, La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant at p values < 0.05. For all cytometry analyses, RAW data are presented in Supporting Information Figure S2.

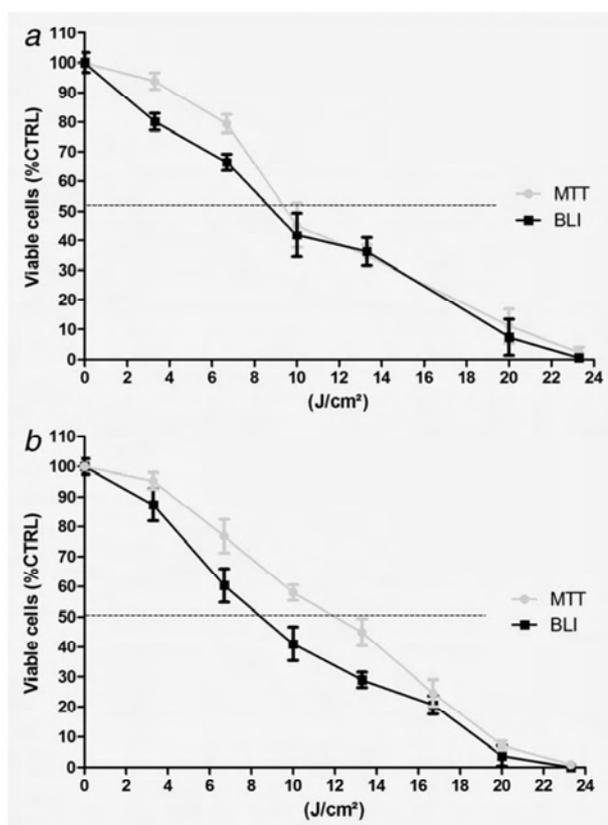


Figure 2. Antitumor responses to NTP treatments. U87MG (a) and HCT-116 (b) cells were treated by increasing doses of NTP. Cell viability was determined 24 hr after treatment by both MTT (●) and BLI (■) assays. Cell viability of NTP treated cells was normalized to untreated cells.

Results

NTP presents a major antitumor effect *in vitro*

We first evaluated the antitumor potential of NTP on two different cell lines *in vitro* using cell viability (cell counts) and metabolism assays (MTT and BLI). As described in Table 1, 24 hr after treatment, NTP induced a major decrease in cell number as compared to CTRL. In U87MG cell line, a 10 J/cm² treatment induced a 46% significant decrease in living cells ($p = 0.04$) associated to 312% significant increase in dead cells ($p = 0.02$). Using 20 J/cm², almost all cells were dead after 24 hr. These results are in accordance with

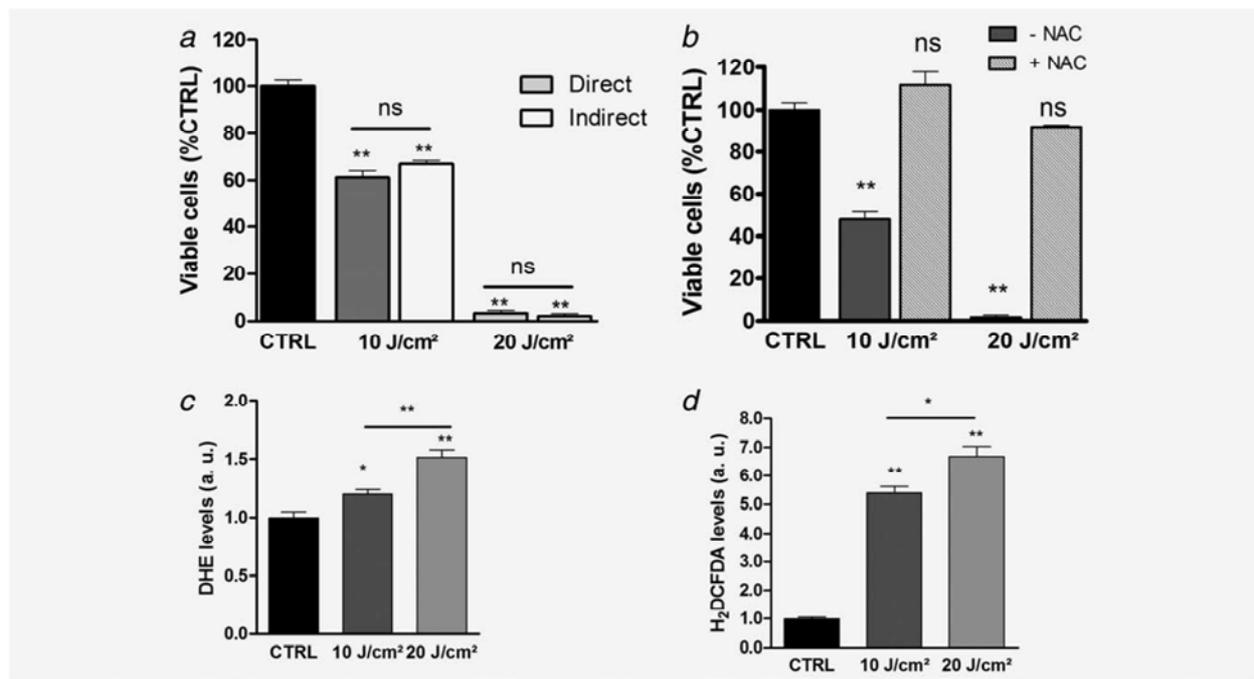


Figure 3. ROS implication in the antitumor effect of NTP. (a) A direct and indirect treatment was performed on U87MG and cell viability was determined by BLI imaging and was normalized to non-treated cells (CTRL). (b) U87MG cells were pretreated with NAC (4 mM), a ROS scavenger. Cells with or without NAC were directly treated by plasma and viability was determined by BLI. (c) ROS such as H₂O₂, was detected using an oxidation-sensitive fluorescent probe dye 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), fluorescence levels were expressed as normalized fluorescence intensity. (d) A second dye Dihydroethidium (DHE), which is highly selective for O₂[•] was used, fluorescence levels were expressed as normalized fluorescence intensity. **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

metabolism assays, which showed a similar decrease in cell viability for the two cell lines with both MTT and BLI (Figs. 2a, 2b and Supporting Information Fig. S3). The DL₅₀ was ~9 J/cm² in U87MG and ~8 J/cm² in HCT-116, respectively. To understand which components of plasma are involved in this effect, further investigations were realized using both MTT and BLI. Considering the concordance between these two tests, only BLI data are presented.

Plasma generated species in the culture medium are the main cause of cell death

To identify plasma components implicated in cell death, direct and indirect treatments were performed. For U87MG, 10 and 20 J/cm² direct plasma treatment induced a 40% and 96% decrease in cell viability, respectively (*p* = 0.009 and *p* = 0.01). As shown in Figure 3a, a similar decrease was observed for both direct and indirect treatment. The same results were observed using HCT-116 cells (Supporting Information Fig. S4a). To confirm the implication of the NTP treated culture medium in this effect, a quantification of ROS production was performed with an oxidation-sensitive fluorescent probe dye. In Figure 3d, using H₂O₂ specific dye (H₂DCFDA), 10 or 20 J/cm² NTP induced a 5 fold and a 7 fold increase in levels in the medium, respectively (*p* = 0.002 and *p* = 0.002). Normalization with H₂O₂ standard concen-

trations revealed that plasma generated an equivalent concentration of 600 μM H₂O₂ for 10 J/cm² and 900 μM H₂O₂ for 20 J/cm² treatments.

A second dye with a high specificity for O₂[•] (DHE) showed an increase in ROS in the both group of treatment (Fig. 3c); 20% for 10 J/cm² (*p* = 0.02) and 52% for 20 J/cm² (*p* = 0.002). To confirm the implication of ROS, cells were pre incubated with intracellular ROS scavenger NAC, followed by NTP treatment (Fig. 3b). After 24 hr, CTRL cells and CTRL cells with NAC alone did not evidence any cell viability modification (data not shown). In NAC pretreated groups, no significant decrease in cell viability was observed for both NTP doses, as compared to CTRL. Similar results were observed in HCT-116 cell line (Supporting Information Fig. S4b).

NTP induces a cell cycle arrest and an apoptosis induction

To determine the effect of plasma on cell cycle distribution, an iodide propidium staining was performed 24 hr after plasma treatment. In U87MG cells, plasma induced a significant decrease of cells in G₀/G₁ phase with a significant increase in cells in S-phase for 10 and 20 J/cm² groups as compared to CTRL (Fig. 4a). Concerning G₂/M phase, a significant increase was observed only with 10 J/cm² of plasma (*p* = 0.005).

In HCT-116 cells, plasma induced also a significant decrease in G₀/G₁ cells for both doses (*p* = 0.002) while a

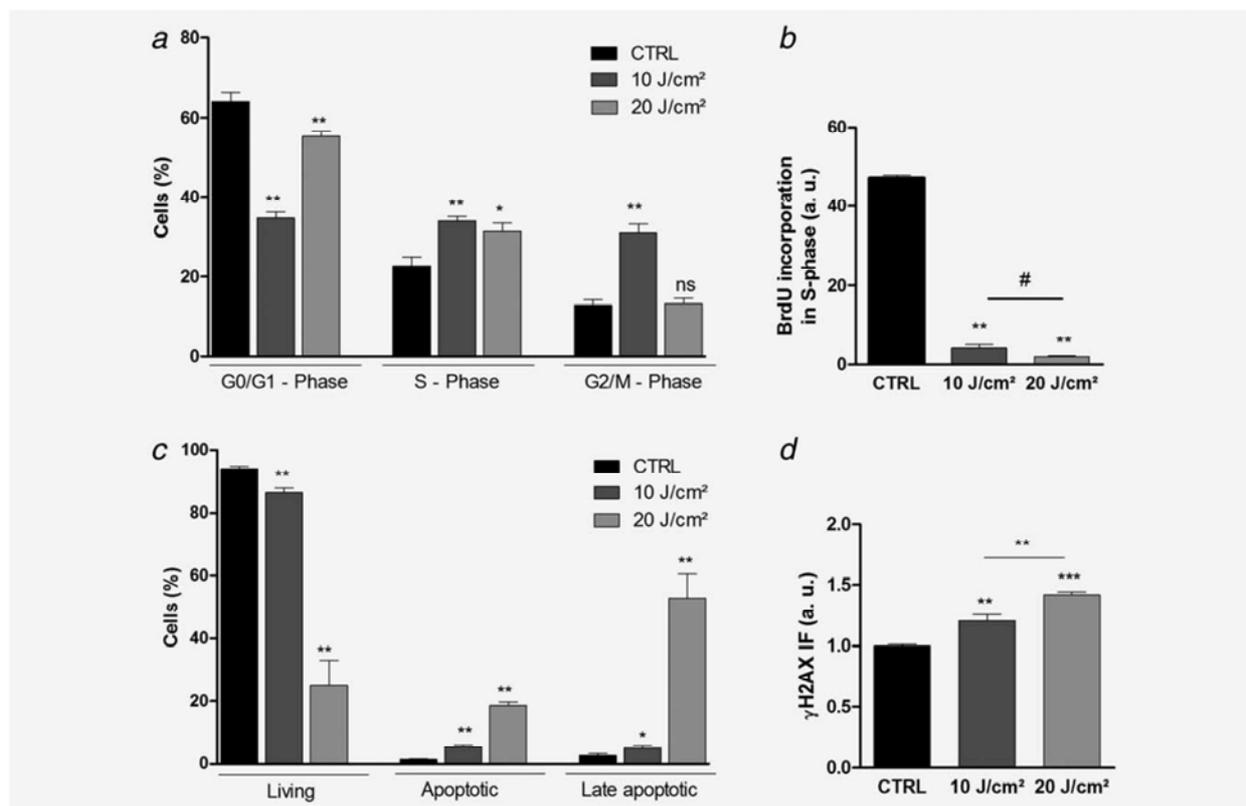


Figure 4. Cellular effects of NTP on U87MG cells. U87MG cells were NTP treated using two different doses (10 J/cm² and 20 J/cm²). (a) Cell cycle distribution: 24 hr after treatment, cell cycle distribution was assessed by flow cytometry after propidium iodide staining. (b) Cell proliferation was evaluated by incorporation of BrdU into S phase by flow cytometry. (c) Cell apoptosis was measured 24 hr after NTP treatment by annexin V-propidium iodide labeling. (d) DNA damages induction: assessment of γ H2AX immunofluorescence (IF) by flow cytometry was performed 1 hr after treatment. γ H2AX IF was normalized to nontreated cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

significant increase in cells in S phase was observed for 20 J/cm² only ($p = 0.002$; Supporting Information Fig. S5a).

A significant increase in cells in G2/M phase was observed for both treated groups as compared to CTRL ($p = 0.005$). These results suggested an accumulation of cells resulting from a cell cycle arrest, so a cell proliferation assay with BrdU incorporation was performed.

In U87MG (Fig. 4b), NTP induced a 92% and 97% decrease in BrdU incorporation for 10 and 20 J/cm², respectively ($p = 0.005$). Similar results were observed in HCT-116 cell line (Supporting Information Fig. S5b).

To determine whether the decrease in cell proliferation and the cell cycle arrest lead to apoptosis induction, an annexin V staining was performed 24 hr after the treatment. As presented in Figure 4c, plasma treatment induced apoptosis induction in both cell lines. In U87MG cells, both doses resulted in 3 and 12 fold increase as compared to CTRL group, respectively ($p = 0.002$). In HCT-116, this apoptosis induction was observed for both treated groups (Supporting Information Fig. S6a). For both cell lines, a significant increase in late apoptosis (Annexin V⁺/PI⁺) was also

observed. Moreover, the presence of cells in late apoptosis was further confirmed by the observed induction of caspase3/caspase 7 activity 24 hr after plasma application (Supporting Information Fig. S7).

NTP induces DNA damages

To determine whether plasma treatment induced DNA damages, assessment of γ H2AX IF by flow cytometry was performed 1 hr after treatment. In both cell lines, a major increase in γ H2AX IF was observed after 10 or 20 J/cm² of NTP. For U87MG (Fig. 4d), NTP induced a significant increase of 20 and 40% of γ H2AX IF in 10 or 20 J/cm² group, respectively ($p = 0.002$; $p = 0.0007$). In HCT-116 (Supporting Information Fig. S6b), this increase was 41 and 91% for 10 and 20 J/cm² of NTP, respectively ($p = 0.004$; $p = 0.0007$).

NTP exhibits a significant antitumor effect in vivo

Plasma was applied each day during 5 consecutive days on subcutaneously U87MG-Luc grafted tumors. Tumors were included in treatment groups when they reached 125 ± 50

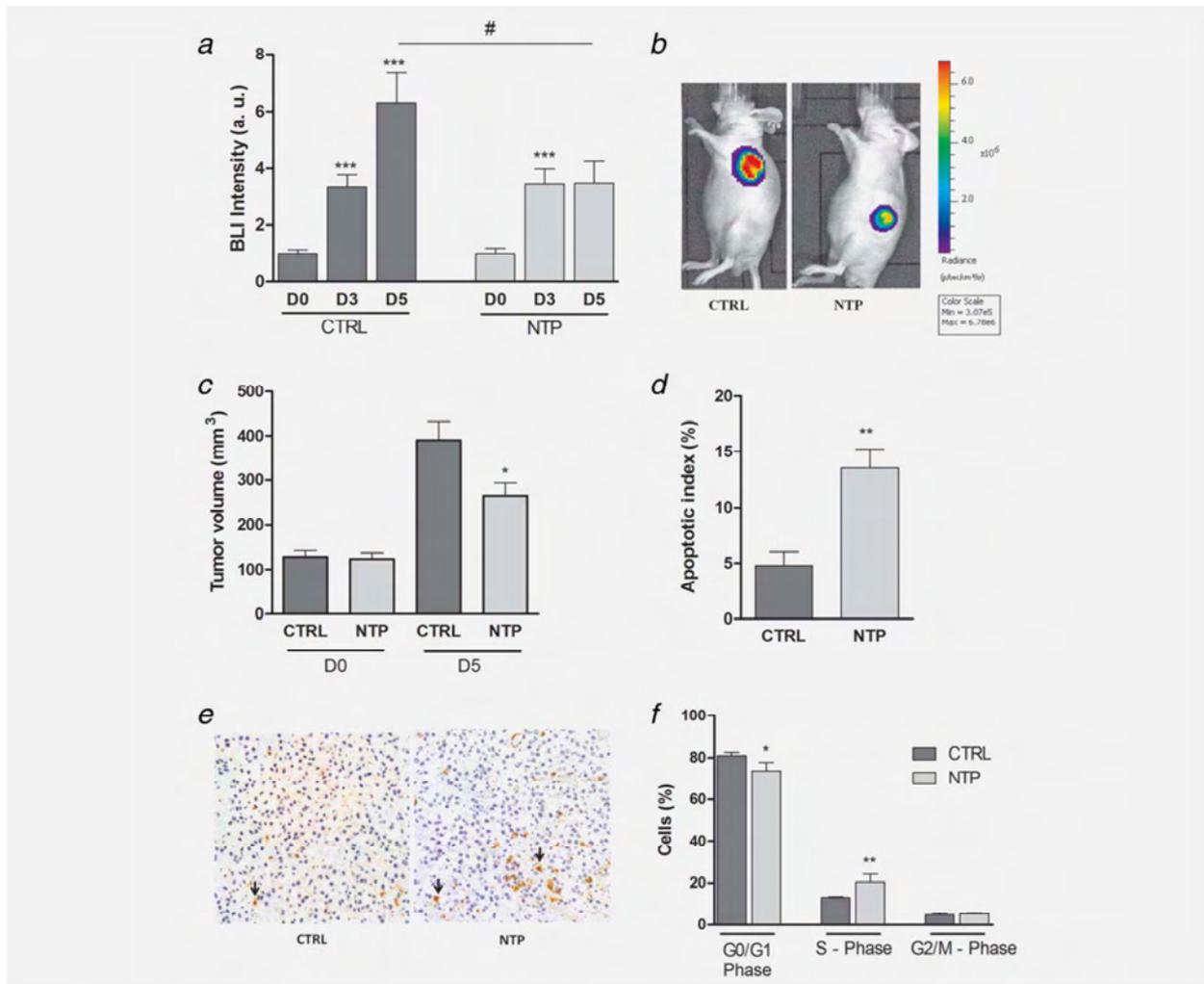


Figure 5. *In vivo* evaluation of NTP antitumor activity. When tumor reached $150 \pm 50 \text{ mm}^3$, mice were randomly assigned into two groups: control (CTRL) and plasma, eight mice per group. Plasma treatment was delivered each day for five consecutive days (6 min, 200 Hz). Mice in both groups were sacrificed 24 hr after the last treatment. (a) BLI imaging was performed before the first treatment (D0), during treatment course (D3) and 24h after the end of treatment protocol (D5). Tumor BLI was normalized to signal at D0. (b) Representative BLI imaging of CTRL and NTP treated mice at D5. (c) Tumor volume was determined using a caliper 24h after the last day of treatment (D5). (d) Apoptosis indexes were determined by immunohistochemical detection of cleaved caspase 3. (e) Representative cleaved caspase 3 immunostaining obtained in CTRL and NTP-treated tumors. Magnification $\times 400$. (f) Cell cycle distribution was assessed by flow cytometry after propidium iodide staining. *# $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

mm^3 . Mean tumor volumes were similar between the two groups: at D0, mean tumor volumes \pm standard error in CTRL and treated mice were $129 \pm 13 \text{ mm}^3$ and $124 \pm 14 \text{ mm}^3$, respectively. To determined effect of NTP on tumor cell proliferation and metabolism, BLI was performed before (D0), during (D3) and after (D5) treatment course (Figs. 5a and 5b). In non-treated and treated mice groups, BLI activity showed 3 fold increase between D0 and D3 ($p < 0.0001$). From D3 to D5 a twofold increase was observed for the CTRL group only ($p = 0.02$), while in plasma treated tumors, BLI intensity remained stable over the D3-D5 period.

Tumor volume measurements performed 24 hr after the end of the treatment course (Fig. 5c) revealed a significant lower tumor volume in the treated group (233 mm^3) as compared to CTRL (400 mm^3), ($p = 0.008$).

NTP induces a cell cycle arrest and apoptosis in tumor

To determine whether plasma induced apoptosis in these tumors, a caspase 3 immunostaining was performed 24 hr after the last day of treatment (Figs. 5d and 5e) resulting in a significant 3 fold increase in caspase-3 positive cells ($p = 0.008$). Positive cells for caspase 3 immunostaining

represented 4.5 and 13.5% of tumor cells for CTRL and treated tumors, respectively. Moreover, caspase 3 positive cells were homogeneously distributed in sagittal sections from treated tumors.

Consequences of plasma on cell cycle distribution were determined 24 hr after the last day of treatment (Fig. 5f). As observed *in vitro*, propidium iodide staining showed a significant decrease in G0/G1 cells in tumor after treatment as compared to CTRL ($p = 0.022$). Cells in G0/G1 phase decrease from 81% to 73% after NTP and this effect was associated with a significant 1.5 fold increase in cells in S phase ($p = 0.002$) from 13 to 20% in CTRL and Plasma groups, respectively.

Discussion

In this study, we evaluated the antitumor potential of NTP on two different cell lines and determined some of the underlying biological mechanisms. Metabolism assays showed that NTP had a significant antitumor activity on U87MG and HCT-116 cell lines with an IC50 of ~ 9 J/cm² and ~ 8 J/cm², respectively, corresponding to ~ 12 s and ~ 13.5 s exposure duration. In these two cell lines, a dose >20 J/cm² led to about 100% cell death. These results were in accordance with previous published studies which showed an antitumor activity of NTP on various cell lines including melanoma, colorectal and hepatocellular carcinoma.^{13–19} In our conditions, plasma is generated in ambient air and main active species in the gas are reactive species (RS) such as OH[•], H₂O₂, N₂^{*}, NO and O₂^{•-}. To identify components involved in the *in vitro* antitumor effect, direct and indirect modalities of treatment were performed. In the indirect configuration, cells were exposed to the NTP treated medium only and not to the other plasma components such as UV and electric field. These results and the use of NAC suggest that RS were the main agent involved in this effect. Using H₂O₂ standard concentrations and an oxidant probe dye, an equivalent maximum concentration of 600 μ M H₂O₂ after 10 J/cm² of NTP was observed. This dye is not specific for H₂O₂ only and DL₅₀ of U87MG after H₂O₂ determined by BLI and MTT was 350 μ M (data not shown) suggesting that equivalent concentration of H₂O₂ was overestimated and other RS are present in the medium.

After NTP treatment, a cell cycle arrest in S and G2/M phase was observed, confirmed with BrdU incorporation which showed a very low proliferation rate. These data are consistent with those of Yan et al. reporting an *in vitro* cell cycle arrest associated to a modification of cyclin levels with a plasma jet treatment.¹⁶ This cell cycle arrest was similar to the multiphase cell cycle arrest observed after ROS exposure with high doses of H₂O₂.^{29,30} Dose dependent exposure of ROS leads to cell death,^{20–22} as observed with NTP. Our data are in strong correlation with those from others studies which reported the effects of NTP on various tumorigenic and non-tumorigenic mammalian cell lines,^{13–19} thus suggest-

ing a common mechanism of action of NTP, whatever cell type considered.

Radiation therapy, a major antitumor modality that also implies ROS, is able to induce lethal DNA damages which activate cell cycle checkpoints and initiate signaling cascades leading to cell death by generating ROS in cell's DNA vicinity. With NTP, we observed a similar result with the formation of DNA damages in treated cells, leading to cell cycle arrest and finally to cell death with both early and late apoptosis. DNA damages are observed as soon as 1 hr after the treatment, whereas a minimal 3 hr delay is required for phosphorylation of γ H2AX histone triggered by apoptosis associated DNA fragmentation.³¹ This suggests that the signal detected was a direct consequence of the treatment and did not correspond to strand breaks associated with apoptosis induction and subsequent DNA fragmentation. Phosphorylation of γ H2AX on Ser139 after DNA damage can be mediated by ATM, ATR and DNA-PK. In a recent work on MCF10A cell line, an induction of γ H2AX-phosphorylation was observed after plasma treatment and the authors showed that ATM is not the primary mediator of H2AX phosphorylation on Ser139 as observed after ionizing radiation.¹⁹ After NTP treatment, phosphorylation of H2AX occurs primarily through ATR and authors suggest that this activation is the consequences of stalled replication forks formation after NTP. Interaction of plasma with DNA needs further investigation to understand which kind of DNA damage was preferentially induced after treatment.

Given these encouraging results *in vitro*, we further investigated the potential antitumor properties of NTP treatment in human malignant glioma xenografted onto nude mice. In the present study, as compared to nontreated mice, plasma exposure induced a significant inhibition of tumor growth ($\sim 40\%$) at the end of the treatment. This effect is confirmed by BLI, a gene expression imaging modality closely dependent upon aerobic metabolism, which showed a stabilization of tumor activity during treatment course (D3-D5). These findings are consistent with a previous work from our lab, showing a 60% lifespan increase in mice bearing U87MG xenografts.¹⁰ Given the high chemo and radioresistance of the model used here, a significant antitumor effect on such an aggressive tumor model suggests a high efficacy of our approach and evidences the interest of this strategy for cancer therapy. Higher treatment doses should be of valuable interest to enhance this effect more especially that a recent *in vitro* study has also shown an important discrepancy of cell sensitivity between tumor and non-tumor cells.³²

The *in vivo* tumor volume and proliferation stabilization obtained could be linked to changes in cell cycle distribution with a decrease in G0/G1 phase and an increase in cells in S phase. Accumulation of tumor cells in S phase caused by plasma may be mediated by DNA strand break formation, even if this point remains to be proven *in vivo*. Moreover, as histologically evidenced, apoptosis induction occurs in the whole tumor. Even if there is no direct evidence that plasma

penetrate skin, these data suggest that plasma components act either by penetrating in the tissue either by inducing ROS releases in the tumor. We can also hypothesize that, as described after ionizing radiation treatment, a cell death induced by bystander effect could explain the effect of plasma inside the tumor.³³ Even if free radicals only penetrate to a reduced extent into the tissues, this property is of particular interest in the perspective of a direct *in situ* application of NTP for antitumor treatment, avoiding severe systemic side effects. The other components of plasma, such as UV or heat generation, might also play a role in plasma antitumor effect, even if the available data seem only reflect a minor contribution in this effect. Indeed UV penetration in the skin is limited to a few μm and our treatment conditions only generate a temperature increase of about to 3–4°C during a few minutes.²⁶ However, the combination of effects of the different plasma components might result in a synergistic global effect. Indeed, mechanisms of interaction between plasma and cells and plasma

skin penetration remain to be further documented since all plasma components could induce membrane damages, changes in intracellular signaling pathways and exhibit cytotoxic properties.

Taken together, our results suggest that NTP could be a new strategy against cancer cells, more especially when used in combination with new generation antitumor drugs. Indeed, recently, Kim et al have demonstrated that association of NTP to EGF-R targeted therapy resulted in a synergistic effect.¹⁵ The *in vivo* good tolerability and the effectiveness of NTP towards tumor cells together with the ability to deliver NTP *via* a small capillary open new interesting perspectives for loco-regional or *in situ* applications. Lung and colorectal tumors or dysplasia using plasma endoscopic applications are currently our first therapeutic targets.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Region Centre (APR "PlasMed"), Germitec, Conseil Regional du Centre, CNRS and CG45.

References

- Bogaerts A, Neyts E, Gijbels R, van der Mullen J. Gas discharge plasmas and their applications. *Spectrochim Acta Part B* 2002; 57:609–58.
- Zenker M. Argon plasma coagulation. *GMS Krankenhhyg Interdiszip* 2008;3:Doc15.
- Moisan M, Barbeau J, Moreau S, Pelletier J, Tabrizian M, Yahia LH. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int J Pharm* 2001;226:1–21.
- Kong MG, Kroesen G, Morfill G, Nosenko T, Shimizu T, van Dijk J, Zimmermann JL. Plasma medicine: an introductory review. *New J Phys* 2009;11:1–35.
- Laroussi M. Low-temperature plasmas for medicine? *IEEE Trans Plasma Sci* 2009;37: 714–25.
- Stoffels E, Sakiyama Y, Graves DB. Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Trans Plasma Sci* 2008;36:1441–57.
- Kalghatgi SU, Fridman G, Cooper M, Nagaraj G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Vasilets VN, Gutsol AF, Fridman A, Friedman G. Mechanism of blood coagulation by nonthermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *IEEE Trans Plasma Sci* 2007;35:1559–66.
- Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym* 2008;5:503–33.
- Isbary G, Morfill G, Schmidt HU, Georgi M, Ramrath K, Heinlin J, Karrer S, Landthaler M, Shimizu T, Steffes B, Bunk W, Monetti R, et al. A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *Br J Dermatol* 2010;163:78–82.
- Vandamme M, Robert E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A, Pouvesle JM. Response of human glioma U87 Xenografted on mice to non thermal plasma treatment. *Plasma Med* 2011;1:27–43.
- Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A, Clyne AM. Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng* 2010;38:748–57.
- Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process* 2005;2:391–400.
- Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, Brooks AD, Fridman A, Gutsol A, Vasilets V, Friedman G. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process* 2007;27:163–76.
- Kim CH, Bahn JH, Lee SH, Kim GY, Jun SI, Lee K, Baek SJ. Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells. *J Biotechnol* 2010; 150:530–38.
- Kim GC, Kim GJ, Park SR, Jeon SM, Seo HJ, Iza F, Lee JK. Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer. *J Phys D: Appl Phys* 2009;42:5.
- Yan X, Zou F, Zhao S, Lu X, He G, Xiong Z, Xiong Q, Zhao Q, Deng P, Hunag J, Yang G. On the mechanism of plasma inducing cell apoptosis. *IEEE Trans Plasma Sci* 2010;38:2451–7.
- Zhang XH, Li MJ, Zhou RL, Feng KC, Yang SZ. Ablation of liver cancer cells *in vitro* by a plasma needle. *Appl Phys Lett* 2008;93:1–3.
- Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, Fridman G, Shereshevsky A, Torabi B, Arjunan KP, Podolsky E, Fridman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J, Brooks AD. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species. *Ann Biomed Eng* 2011;39:674–87.
- Kalghatgi S, Kelly CM, Cerchar E, Torabi B, Alekseev O, Fridman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J. Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PLoS One* 2011;6:e16270.
- Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 1996;32A:30–8.
- Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target* 2007;15:475–86.
- Simizu S, Takada M, Umezawa K, Imoto M. Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J Biol Chem* 1998; 273:26900–7.
- Fei P, El-Deiry WS. P53 and radiation responses. *Oncogene* 2003;22:5774–83.
- Hall EJ. Radiobiology for the radiobiologist, 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams Et Wilkins, 2000.
- Robert E, Barbosa E, Dozias S, Vandamme M, Cachoncinlle C, Viladrosa R, Pouvesle JM. Experimental study of a compact nanosecond plasma gun. *Plasma Process Polym* 2009;6:795–802.

26. Vandamme M, Robert E, Pesnel S, Barbosa E, Dozias S, Sobilo J, Lerondel S, Le Pape A, Pouvesle JM. Antitumor effect of plasma treatment on U87 glioma xenografts: preliminary results. plasma process. *Polym* 2010;7:264–73.
27. Vindelov LL, Christensen IJ. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1990; 11:753–70.
28. Labussiere M, Pinel S, Vandamme M, Plenat F, Chastagner P. Radiosensitizing properties of bortezomib depend on therapeutic schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;79:892–900.
29. Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernandez de Mattos S, Glassford J, Medema RH, Mann DJ, Lam EW. H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem* 2002;277: 13761–70.
30. Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* 1998;332 (Part 1):43–50.
31. Huang X, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods Mol Biol* 2006;314:73–80.
32. Georgescu N, Lupu AR. Tumoral and normal cells treatment with high-voltage pulsed cold atmospheric plasma jets. *IEEE Trans Plasma Sci* 2010;38:1949–55.
33. Rzeszowska-Wolny J, Przybyszewski WM, Widel M. Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy. *Eur J Pharmacol* 2009;625:156–64.

Supplementary material

Plasma characteristics :

Electrical discharges in air at atmospheric pressure naturally develop as sparks or arcs, i.e. relatively small diameter, non-stationary and hot filaments driving large amplitude currents. A conventional way to switch to cold, room temperature, and large volume discharges in atmospheric air is to cover one or both of the electrodes by a dielectric layer, preventing from direct arcing in the electrode gap. This dielectric barrier discharge, DBD, technology was recently extended for its application in biomedical application, where the plasma as to be produced on the surface of a Petri dish or on the living tissues. In the floating electrode DBD, FE-DBD design, the living tissue surface act as a an electrode at floating electrical potential. In FE-DBD, the distance between the dielectric layer embedding the high voltage electrode, powered to a few tens of kV, and the target is a few millimeters wide. In this discharge gap, a large number of filaments, labeled as streamers, develop randomly on the target surface from one discharge to another. The FE-DBD appears then as a robust way to produce an air plasma over large surfaces to be treated. Various configurations for DBD production exist considering both the electrode geometry and the electrical signal amplitude and waveform. In this work, microsecond duration voltage pulses, 23 kV in amplitude, and delivered at respectively 200 Hz and 2 kHz were used to produce a 0.78 cm², 2 mm high plasma volume over the mouse skin and the culture cell wells respectively. High bandwidth voltage and current probes were used to infer the electrical power coupled to the air plasma during one discharge event. For a 2 kHz repetition rate, the average power delivered to the plasma is of 0.52 W. Thus a 15 s operation at 2 kHz, using the 0.78 cm² DBD reactor leads to a 10J/cm² energy flux delivery on the biological sample. It must be pointed out that the electrical measurements and spectroscopic investigations have shown that properties of the air plasma produced for each discharge event are constant whatever the repetition rate is from 100 Hz to 5 kHz. Thus the energy flux is easily monitored by tuning the repetition rate of the DBD driver and selecting the treatment duration.

Detection of ROS levels in the medium

ROS such as H₂O₂, •OH, and ONOO• were detected using an oxidation-sensitive fluorescent probe dye 2 ,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, Sigma, Ex/Em = 495/529 nm). As H₂DCFDA is poorly selective for O₂^{•-}, dihydroethidium (DHE, Sigma, Ex/Em =

518/605 nm), which is highly selective for $O_2^{\bullet-}$, was used for its detection. In brief, just after NTP treatment of 500 μ L of media, 20 μ M of H_2DCFDA or 20 μ M of DHE was added in the medium and was incubated at 37°C for 30 min. FLI was then performed to detect DCF and DHE fluorescence. ROS and $O_2^{\bullet-}$ levels were expressed as normalized fluorescence intensity.

Apoptosis detection in vitro

The Caspase-Glo3/7 Assaykit (Promega) was also used to measure caspase 3/7 activation according to the manufacturer protocol. Briefly, 24h after plasma treatment, 100 μ L of Caspase3/7 reagent was added in each well and plate was incubated during 30 min. BLI intensity was acquired using IVIS Lumina and analyzed with Living Image software (Caliper, USA). Caspase 3/7 activity was normalized to non-treated cells.

Apoptosis detection in vivo

In vivo, 24h after the end of the treatment, tumors were excised and apoptosis indexes were determined by immunohistochemical detection of cleaved caspase 3 with SignalStain Cleaved Caspase-3 IHC kit (Cell Signaling, USA) according to the manufacturer protocol. These experiments were realized under double blind analysis in collaboration with Novaxia, a company specialized in histology pathology. Briefly, 24h after NTP treatment, tumors were excised and immediately fixed in 10% (v/v) buffered PFA in pH 7.4 for 72 h and paraffin-embedded. Serial coronal 5 μ m sections were cut through the center of the xenografts and apoptotic indexes were calculated on sections stained with a primary rabbit antibody anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling, dilution 1:1,000). The percentage of labeled tumor cells was recorded in adjacent areas of the tumor mass free from necrosis.

Cell cycle analysis and cell proliferation

Cell cycle analysis was performed by combined propidium iodide and bromodeoxyuridine (BrdU) staining. Both cell lines were incubated, 24h after NTP treatment, for 1h with 10 μ M BrdU (Sigma). Cells were collected and suspended in PBS 1X before fixation in 90% methanol at 4°C overnight and permeabilized with 2N HCl and 0.5% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Then cells were incubated for 30 min with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti- BrdU antibody (Millipore) at 1:3 dilution in 0.5% Tween 20 - 1% BSA- 1 mg/mL RNase solution. An IgG1 mouse secondary FITC-conjugated (Millipore) was used as negative control for non-specific fluorescence. Cells were finally incubated with 5 μ g/mL propidium iodide (Sigma) prior to analysis using a FACSort (Becton and Dickinson).

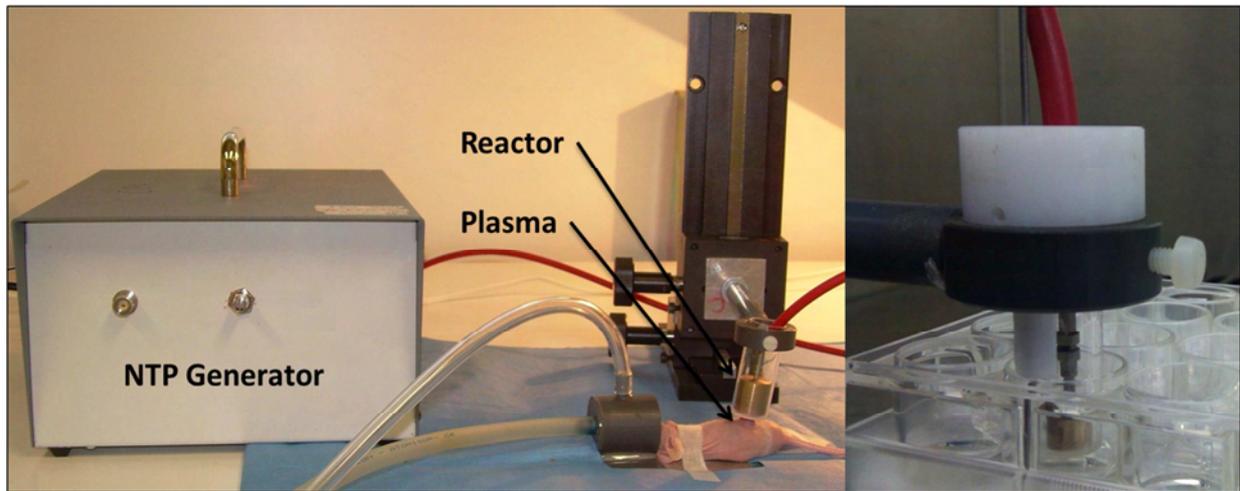


Figure S1: Experimental device used to produce DBD plasma. This experimental device can be used *in vivo* (left panel) and *in vitro* (right panel).

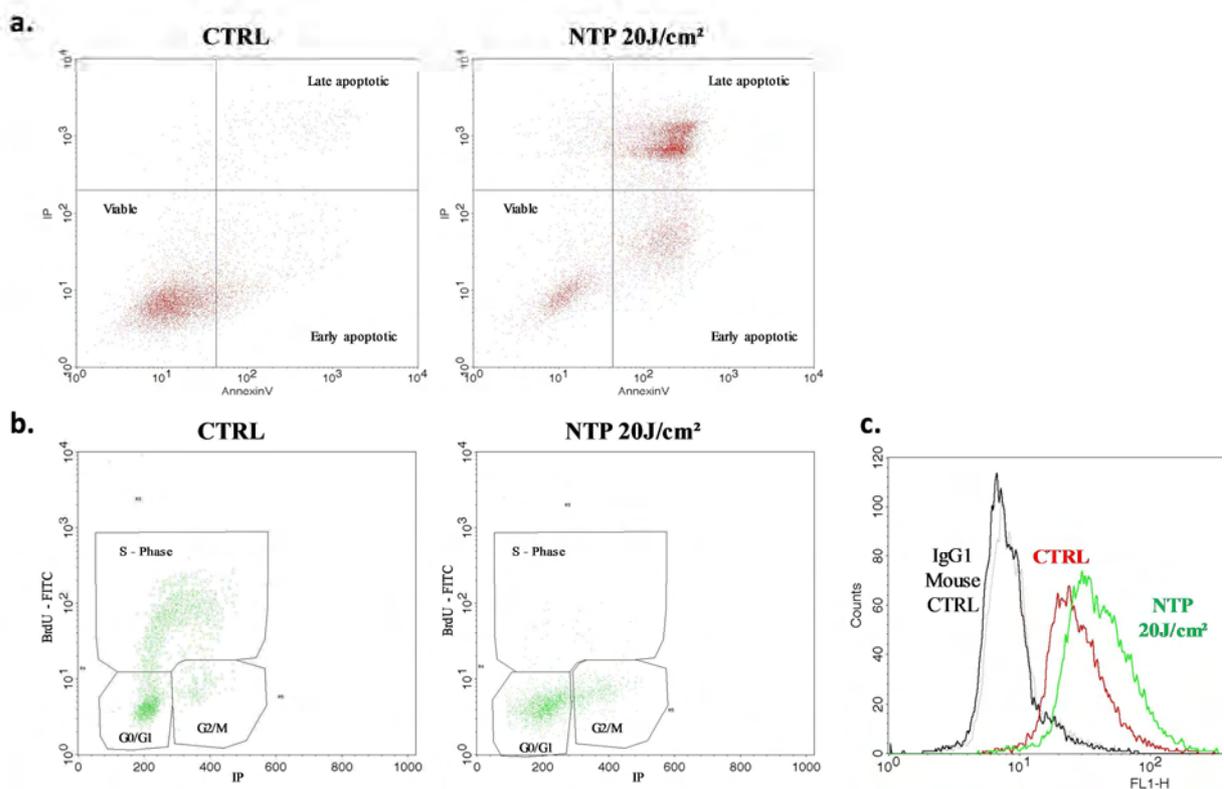


Figure S2: Representative RAW data of cytometry analyses. On the left, untreated U87MG cells and on the right plasma treated cells using 20J/cm². **a.** Apoptosis detection by annexin V-propidium iodide labeling. **b.** Cell proliferation and cell cycle distribution by incorporation of BrdU into S and propidium iodide staining. **c.** DNA damage detection by assessment of γ H2AX immunofluorescence.

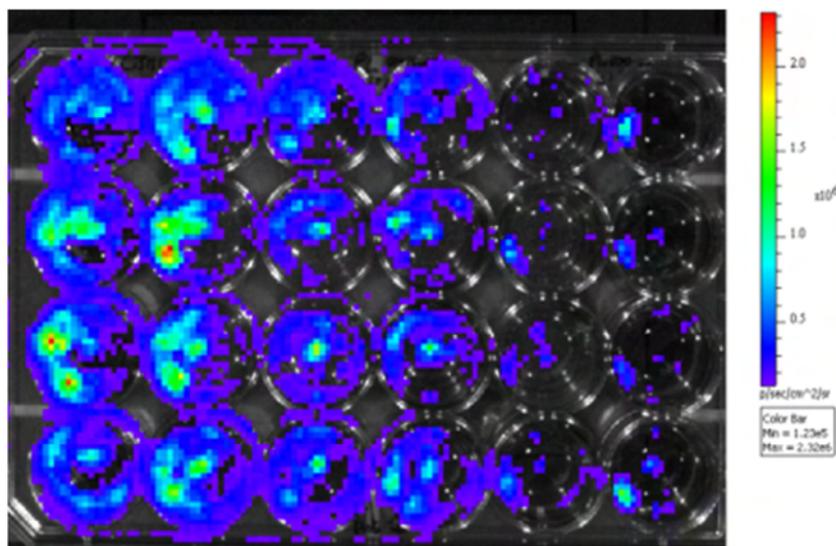


Figure S3: Representative picture of BLI imaging *in vitro*. A direct treatment was performed on U87MG cell line using two different doses (10 and 20J/cm²)

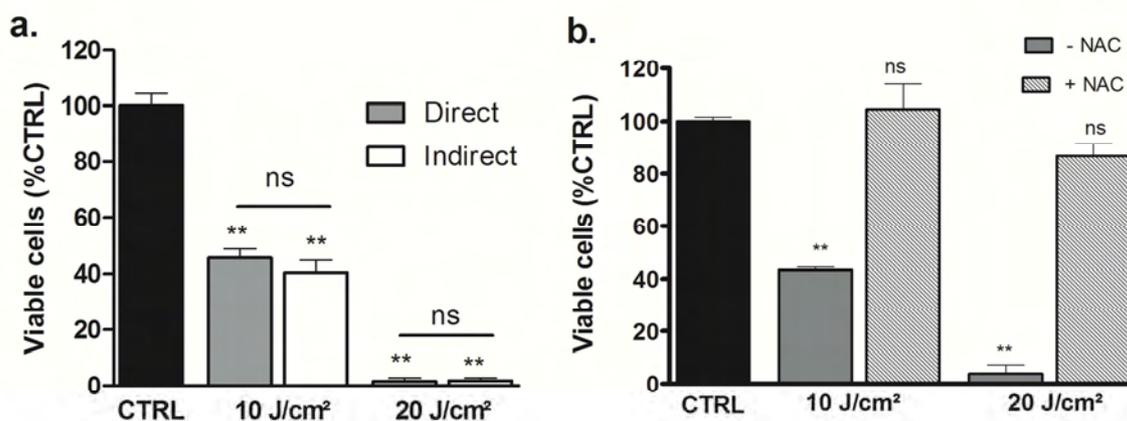


Figure S4: ROS implication in the antitumor effect of NTP. a. A direct and indirect treatment was performed on HCT-116 cell line using two different doses (10 and 20J/cm²). In indirect treatment, medium was treated and then transferred into wells containing cells. 24h after treatment, cell viability was determined by BLI imaging and was normalized to non-treated cells (CTRL). ***p*<0.01. b. HCT-116 cells were pretreated with NAC (4 mM), a ROS scavenger. Cells with or without NAC were directly treated by plasma and viability was determined by BLI. ***p*<0.01.

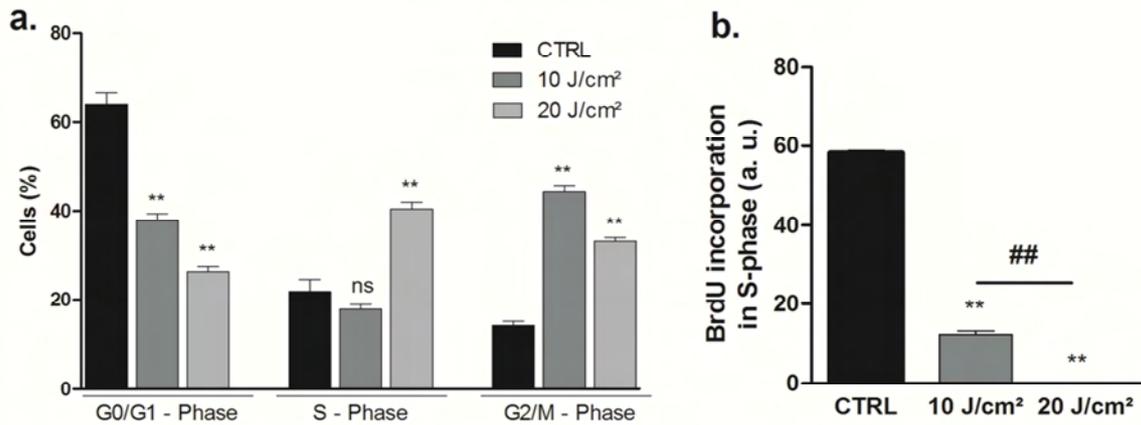


Figure S5: Cell cycle modification and proliferation arrest following NTP treatments. HCT-116 cells were NTP treated using two different doses (10J/cm² and 20J/cm²). **a.** 24h after treatment, cell cycle distribution was assessed by flow cytometry after propidium iodide staining. Results are presented as mean percentage of cells in the G0/G1, S, G2/M phase. **b.** Cell proliferation was evaluated by incorporation of BrdU into S phase by flow cytometry. Results are expressed as mean (\pm SEM). * p <0.05; ** p <0.01.

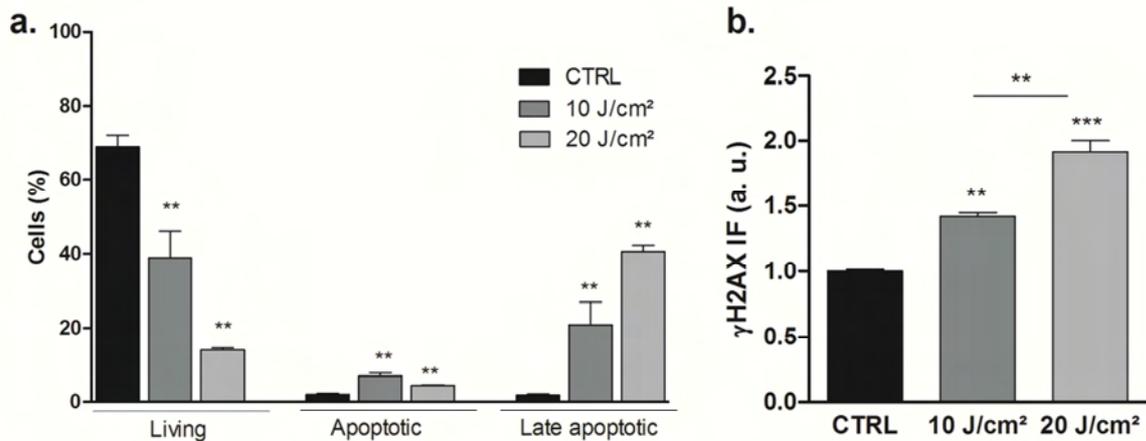


Figure S6: Apoptosis and DNA damages induction by NTP. HCT-116 cells were plasma treated with the indicated doses. **a.** Cell apoptosis was measured 24h after NTP treatment by annexin V-propidium iodide labeling. **b.** To detect DNA damages induction, assessment of γ H2AX immunofluorescence (IF) by flow cytometry was performed 1h after treatment. γ H2AX IF was normalized to non-treated cells. Results are expressed as mean (\pm SEM). * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001.

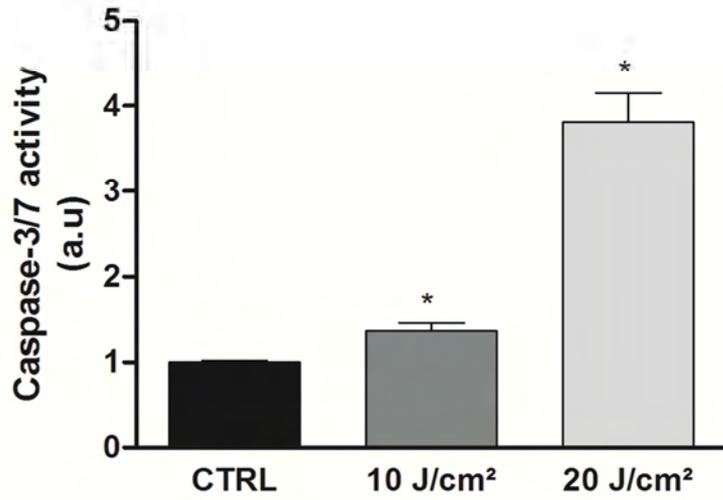


Figure S7: Apoptosis induction by NTP. U87 cells were plasma treated with the indicated doses. Apoptosis induction was detected using a caspase 3/7 Glo assay. Results are expressed as mean (\pm SEM). * $p < 0.05$.

2. Résultats complémentaires

Des données supplémentaires non publiées dans l'article méritent d'être présentées dans ce manuscrit. Elles concernent principalement l'effet du plasma *in vivo* sur la prolifération, le cycle cellulaire et la nécrose.

Après les cinq jours de traitement, nous avons déterminé le taux d'apoptose induit dans les tumeurs. Ces résultats ont été complétés par une analyse histologique du pourcentage de nécrose présent dans les tumeurs traitées et les tumeurs CTRL (figure 69).

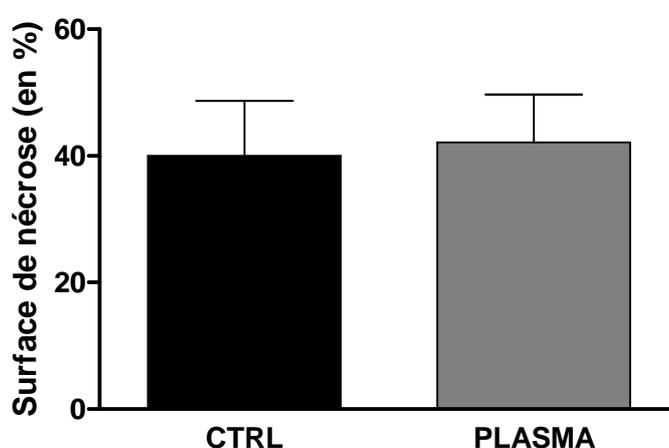


Figure 69 : Surface de nécrose (en%) dans les tumeurs CTRL et traités par plasma. (n=8, moyenne \pm SEM).

Le traitement par plasma n'induit aucune augmentation de la surface de nécrose dans les tumeurs. Ces données combinées à la stabilisation du volume tumoral et à l'induction de l'apoptose observée suggèrent que le plasma possède une activité antitumorale n'induisant pas une augmentation de la mort cellulaire par nécrose.

Un marquage immunohistochimique de Ki-67 activé a également été effectué à l'issue des 5 jours de traitement. Ce marquage permet de visualiser les cellules en prolifération et reflète les cellules engagées dans le cycle cellulaire (figure 70). Ces données permettent de compléter les résultats de la distribution dans le cycle cellulaire obtenus par cytométrie en flux.

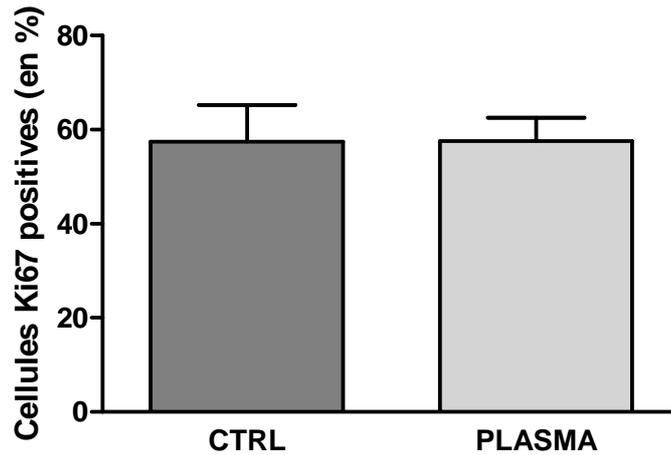


Figure 70 : Nombre de cellules Ki67 positives après traitements plasma. (n=8, moyenne+/-SEM)

Aucune variation du taux de cellules Ki-67 positives n'est observée au niveau de la tumeur. Il n'y a pas d'augmentation de la prolifération des cellules tumorales à la suite du traitement, comme une repopulation couramment observée après radiothérapie. En revanche, ce marqueur ne permet pas de distinguer les cellules en prolifération des cellules en arrêt dans le cycle.

Nous avons montré dans l'article un arrêt des cellules en phase S, 24h après 5 jours de traitement de tumeurs U87-MG en effectuant une analyse du cycle cellulaire. Cette analyse a également été réalisée après un seul traitement au plasma pendant 6 min à 200Hz. Les tumeurs ont été analysées 24h après cette exposition (figure 71).

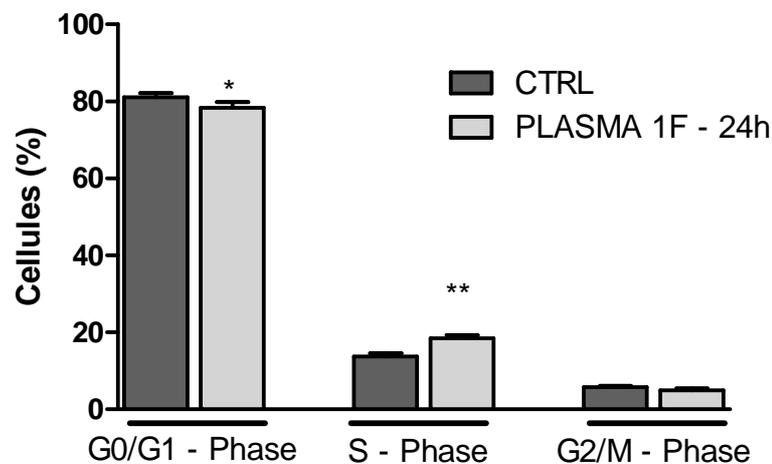


Figure 71 : Effets d'une fraction de plasma *in vivo* sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire. (n=8, moyenne+/-SEM, *p<0.05 ; **p<0.01)

Une augmentation significative du nombre de cellules en phase S associée à une diminution du nombre de cellules G0/G1 est induite par le traitement. Les résultats obtenus après 1 fraction sont similaires à ceux obtenus après 5 fractions de plasma suggérant un effet dès la première application.

C. Influence du débit de dose sur l'activité antitumorale

La dose de plasma reçue par les cellules n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. Comme nous l'avons observé *in vivo* sur la tolérance, une dose appliquée à différents débits de dose n'est pas équivalente. Dans cette partie, notre étude porte sur l'influence du débit de dose sur la viabilité cellulaire *in vitro* avec comme objectif la diminution totale du temps de traitement tout en augmentant le débit de dose. Cet objectif semble toutefois limité au vu des résultats obtenus en termes de tolérance.

Pour cela, chaque traitement doit fournir le même nombre de pulses mais en un temps différent (modification de la fréquence). La viabilité cellulaire a été évaluée par BLI, 24h après le traitement à la DBD. L'étude de l'influence du débit de dose *in vitro* a été réalisée sur trois lignées cellulaires différentes, à savoir : U87-MG, H460, HCT-116. La dose totale délivrée était de 833 pulses et 3 débits de dose différents ont été testés : 2KHz en 25 secondes, 1KHz en 50 secondes et 500Hz en 100 secondes (Tableau VII)

Tableau VII: Équivalence d'une dose selon la fréquence et le temps

2 000 Hz	1 000 Hz	500 Hz
25 secondes	50 secondes	100 secondes
833 pulses		

L'implication du débit de dose dans l'effet anti-tumoral a été testée sur les trois lignées cellulaires avec la dose de 833 pulses (figure 72). Pour la lignée U87, après un traitement à 2kHz, il reste moins de 20% de cellules viables alors que les traitements à 1kHz et 500Hz ont

un effet anti tumoral quasi identique, environ 60% des cellules n'ont pas été affectées par le traitement. Les résultats sont similaires sur les trois lignées cellulaires étudiées. Le traitement à 2KHz pendant 25sec est significativement plus efficace que 1KHz 50sec et 500Hz 100sec ($p<0,005$).

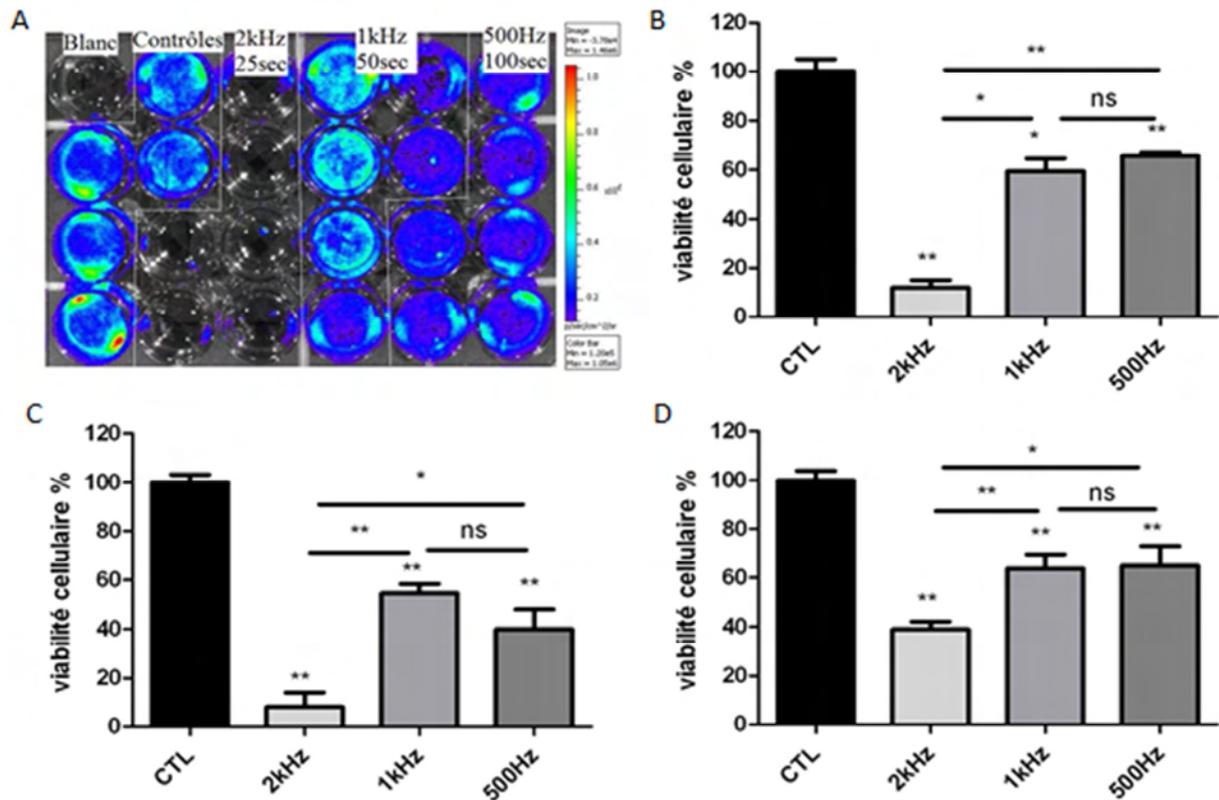


Figure 72 : Viabilité cellulaire 24h après traitement à 3 débits de dose différents. A, image de BLI (H460) représentative des résultats obtenus avec les 3 lignées, tous les puits ont reçu la même dose mais en un temps différent. B, viabilité déterminée par BLI de la lignée U87MG. C, viabilité déterminée par BLI de la lignée HCT116. D, viabilité déterminée par BLI de la lignée H460. (n=6, moyenne+/-SEM, * $p<0.05$; ** $p<0.01$)

Ces données ont été complétées en étudiant, sur la lignée H460, l'apoptose induite en fonction des débits de doses considérés. Pour cela, un kit Caspase Glo™ (Promega®) a été utilisé afin de mettre en évidence l'activation des caspases 3 et 7, par l'intermédiaire d'une réaction de BLI. Les résultats obtenus et présentés sur la figure 73 montrent une induction d'apoptose significative pour les trois débits de doses considérés. L'induction d'apoptose est significativement plus marquée avec un débit de 500Hz plutôt qu'avec les deux autres débits de dose.

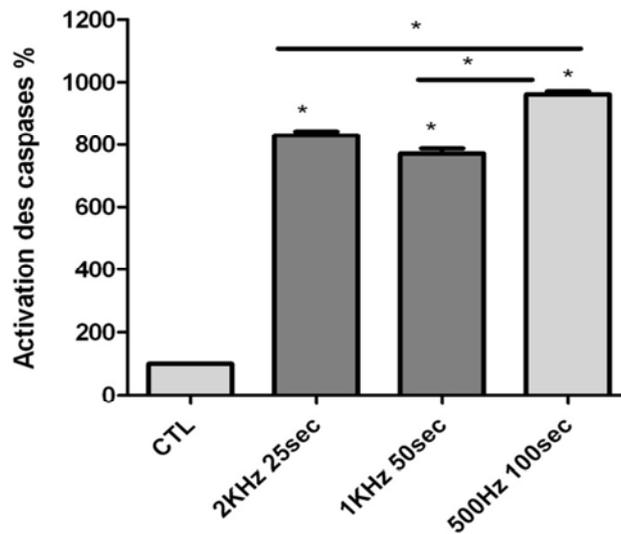


Figure 73 : Induction d'apoptose sur la lignée H460 avec différents débit de dose. (n=8, moyenne+/-SEM, *p<0.05)

L'étude de l'influence du débit de dose *in vitro* a mis en évidence que ce n'est pas uniquement la dose reçue par les cellules mais aussi le débit de dose qui compte dans l'effet antitumoral observé. Ces données mettent en lumière l'importance du protocole de traitement utilisé, c'est-à-dire le temps de traitement et la fréquence utilisée.

D. Sensibilité cellulaire

Le plasma froid présente une activité antitumorale importante sur les trois lignées testées *in vitro*. Cependant, ces trois lignées issues de tumeurs d'origines différentes présentent des caractéristiques moléculaires et des mutations qui leurs sont propres. Il est donc intéressant d'évaluer la sensibilité des cellules au plasma afin de vérifier que des mutations particulières n'affectent pas la réponse au traitement. Les principales mutations caractérisant ces lignées sont détaillées dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Principales mutations présentes dans les lignées utilisées

Lignée	ATCC	PIK3	PTEN	KRAS	p53
HCT-116	CCL-247	Muté	WT	Muté	WT
U87-MG	HTB-14	WT	Muté	WT	WT
NCI-H460	HTB-177	Muté	WT	Muté	Muté

Les DL_{50} des trois lignées ont été déterminées par augmentation de doses délivrée par le plasma (figure 74).

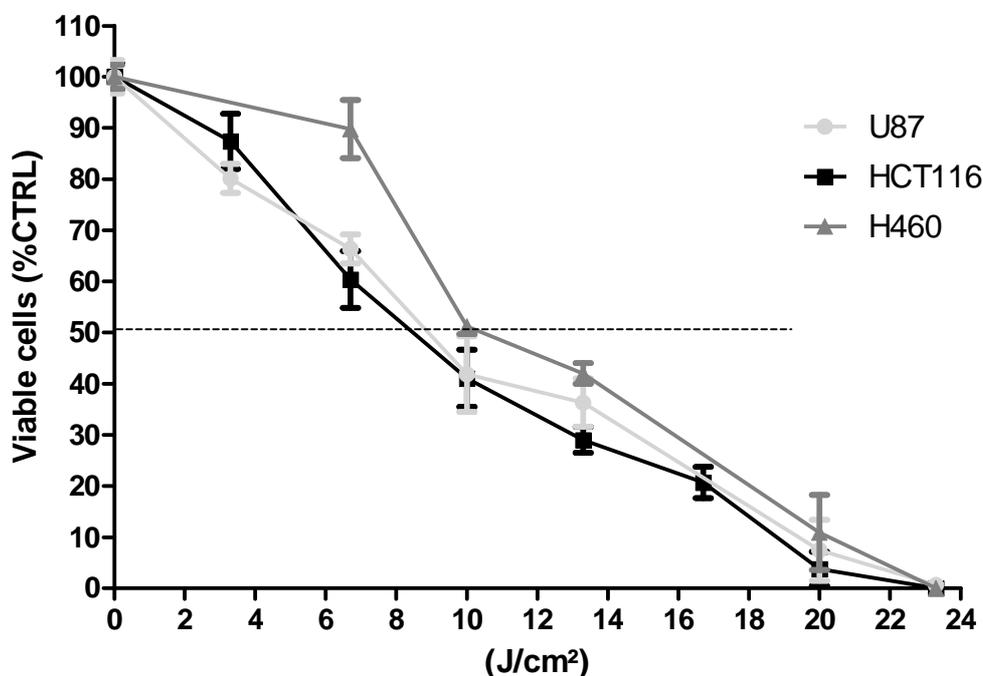


Figure 74 : DL_{50} des 3 lignées cellulaires 24h après traitement par DBD. (n=8, moyenne+/-SEM)

Les profils de réponse entre les 3 lignées sont quasiment identiques avec une sensibilité moindre pour la lignée H460 sur des temps de traitement court. La DL_{50} des 3 lignées se situe au alentour d'une dose de 8 à 10 J/cm². Afin d'étudier plus précisément la sensibilité, nous avons évalué la viabilité cellulaire pour une dose donnée de 10J/cm² correspondant à 15s de traitement (figure 75).

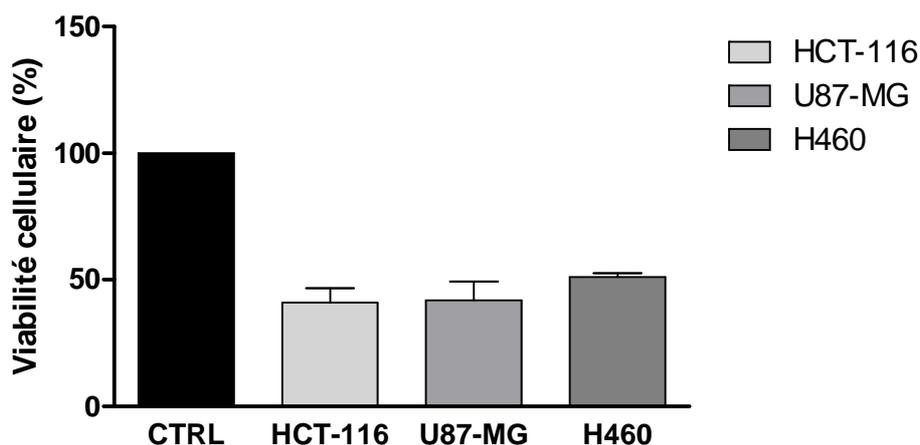


Figure 75 : Viabilité cellulaire déterminé par BLI après un traitement de 10J/cm² de plasma. (n=8, moyenne+/-SEM)

La figure présentée ci-dessus ne montre pas de différence significative de viabilité entre les trois lignées cellulaires pour une même dose de plasma. La lignée H460 semble présenter une résistance un peu plus importante que les autres mais celle-ci n'est pas significative. Cette résistance un peu plus importante, surtout dans des temps de traitement courts, peut être liée à la présence de la mutation du gène p53 qui intervient dans la réparation de l'ADN. La détermination du rôle de p53 dans la réponse au plasma nécessite des expérimentations supplémentaires. D'autre part, la réalisation de cette étude avec un débit de dose moins élevé serait intéressante afin d'obtenir des écarts de sensibilité éventuellement plus importants.

E. Activité antitumorale sur un modèle de tumeur colique HCT-116 en orthotopique

Le plasma froid présente une activité antitumorale sur la lignée U87-MG greffée en sous cutané chez la souris. Ces données *in vivo* ont conduit à la réalisation de l'étude de l'efficacité du plasma dans le cadre des cellules tumorales cibles du projet, c'est-à-dire la HCT-116 qui est représentative du carcinome colorectal. Cette lignée a été greffée en orthotopique chez la souris *nude* afin d'obtenir un modèle prédictif de la réponse attendue chez l'homme mais également afin de permettre un traitement *in situ* avec le plasma généré par DBD et obtenir une interaction directe du plasma avec les cellules tumorales.

Pour cela, des cellules tumorales de colon, HCT116 Luc, ont été injectées dans la paroi du caecum de 12 souris femelles *Swiss Nude* (Charles River) de 5 semaines suivant le protocole de Tseng *et coll.* [291].

Après une période d'acclimatation d'une semaine, les animaux sont placés sous paracétamol pour limiter la douleur et sont anesthésiés à l'isoflurane (2% dans l'air). L'abdomen de l'animal est désinfecté par de la Vétidine® (Vétoquinol) puis une incision de la peau et de la paroi musculaire est réalisée verticalement, sur un centimètre. A l'aide d'une pince, le caecum est délicatement extériorisé sur un champ opératoire. 50 µL de suspension cellulaire contenant 2 millions de cellules sont injectés dans la paroi du cæcum qui est ensuite remis dans l'abdomen et des points de suture sont réalisés.

Cinq jours après l'induction des tumeurs, les animaux ont été imagés par bioluminescence (IVIS Lumina, Caliper). Les souris ayant un signal suffisamment élevé (émission de 10^6 photons minimum), ont été réparties en deux lots homogènes. La masse tumorale est traitée par DBD pendant 8 min à 200Hz (lot traité) au décours d'une opération chirurgicale (figure 76) alors que pour les souris témoin, le cæcum est uniquement extériorisé puis remis en position.



Figure 76 : Photo du traitement d'un foyer tumoral par DBD.

Les animaux ont ensuite été suivis par bioluminescence durant 3 semaines, les images étant réalisées tous les 7 jours. La surface quantifiée par le logiciel Living Image™ a toujours été identique entre chaque animal et entre chaque jour d'expérimentation. A la fin de l'étude, les souris ont été sacrifiées afin de prélever les tumeurs et les métastases, de les rassembler et les peser.

Les images de BLI obtenues au cours de cette étude sont présentées sur la figure 77. Une différence importante de BLI est observée entre les souris traitées (PL) et les souris témoins (CTL). Dès J14, un nombre important de métastase est retrouvé alors que pour les souris traitées, la tumeur reste localisée au niveau du site de greffe, c'est-à-dire le caecum.

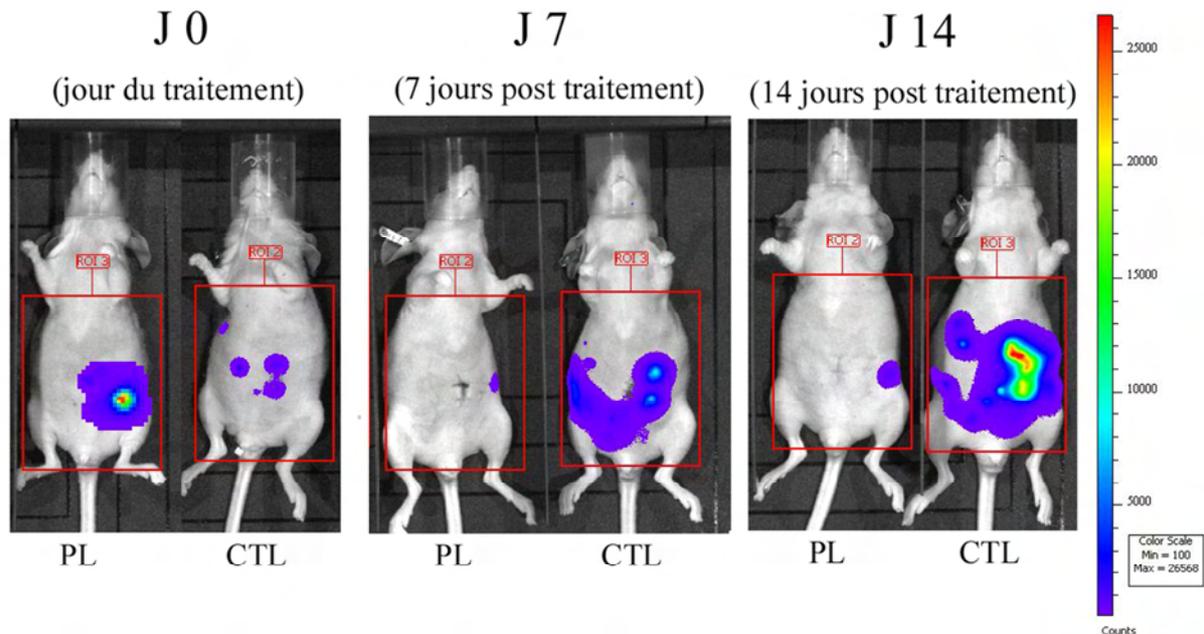


Figure 77 : Suivi de la croissance tumorale par BLI avec ou sans traitement au plasma : le traitement a été effectué après une opération chirurgicale, sur la tumeur, à 200Hz pendant 8 min (n=5)

La Figure 78 montre le signal moyen de BLI des tumeurs des groupes aux différents temps d'imagerie. Dans les deux lots le signal de BLI augmente au cours du temps. Le jour du traitement, les deux groupes présentent un signal moyen de BLI identique (pas de différence significative). Après traitement, le signal de bioluminescence du groupe traité pendant 8 min avec la DBD est significativement inférieur pendant toute la durée de l'étude par rapport au groupe contrôle ($p < 0,017$ à 14 jours, $p < 0,03$ à 22 jours et $p < 0,009$ à 29 jours). Bien que le traitement par plasma n'induit pas de disparition des tumeurs, le taux de prolifération des tumeurs traitées est bien inférieur aux tumeurs contrôle.

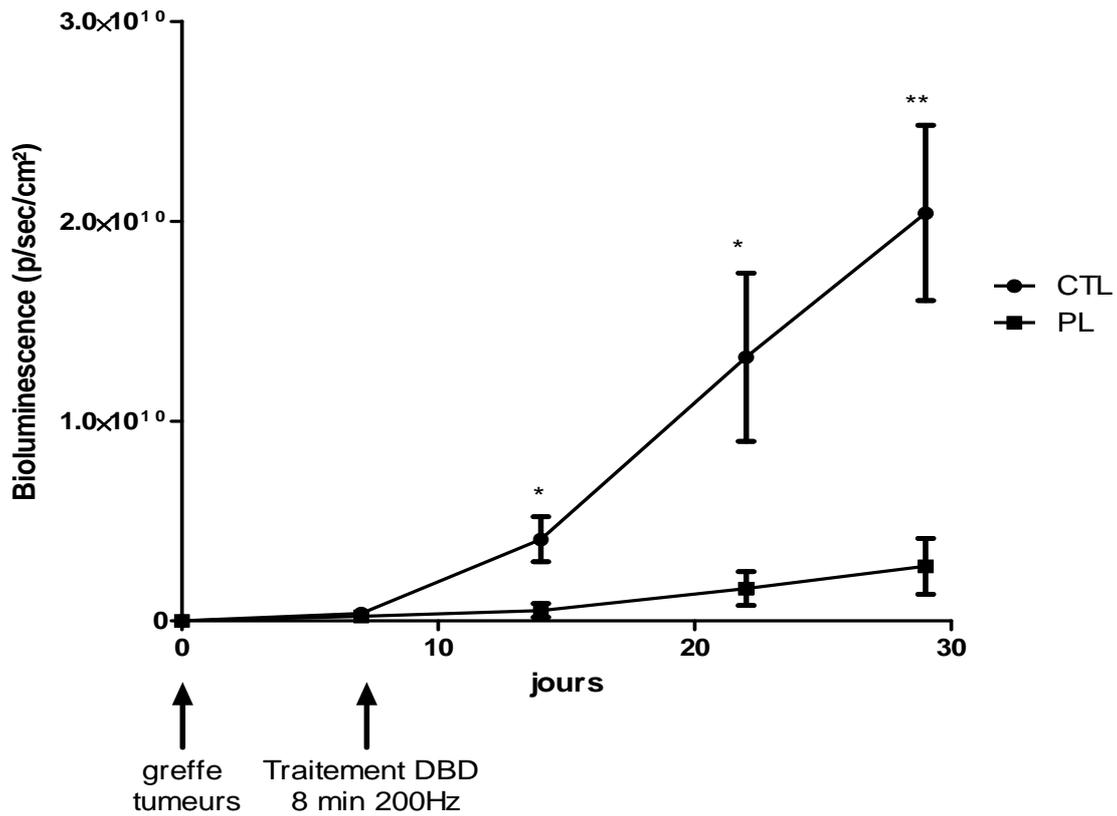


Figure 78 : Suivi de l'activité tumorale par imagerie de BLI avec ou sans traitement plasma. (n=5, moyenne+/-SEM, *p<0.05 ; **p<0.01)

L'autopsie des souris en fin d'étude révèle un nombre de métastases moins important pour les souris traitées par rapport aux souris contrôles, ce qui confirme les données observées en BLI. La figure 79 présente la masse tumorale totale après sacrifice des animaux. Le groupe CTRL a une masse tumorale significativement plus importante que le lot traité au plasma froid ($p<0.009$).

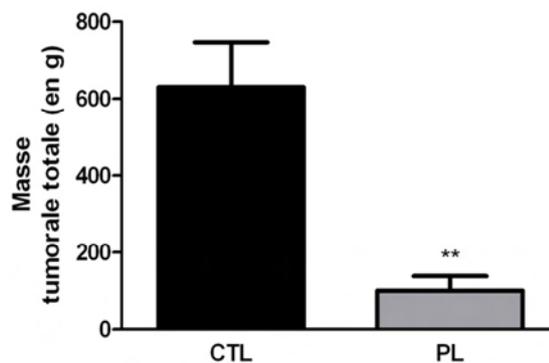


Figure 79 : Masse tumorale des tumeurs CTRL et Plasma, après sacrifice. (n=5, moyenne+/-SEM, **p<0.01)

L'évaluation de l'activité antitumorale de la DBD sur un modèle orthotopique montre une activité importante du plasma appliqué *in situ* sur la masse tumorale, avec une réduction de la prolifération des cellules et au final une diminution de la dissémination métastatique. Cette étude a été réalisée sur un faible nombre d'individus et mériterait d'être répétée sur un effectif plus important.

II. Effet antitumoral du plasma gun

Le plasma généré par DBD n'est pas la seule source de plasma disponible et est plutôt adapté à un traitement de surface. Dans cette partie, nous avons évalué l'activité antitumorale du plasma froid généré avec le plasma gun, ce qui permet des traitements localisés et ciblés *via* l'utilisation de capillaires de faible diamètre. L'activité antitumorale a tout d'abord été évaluée *in vitro* associée à l'analyse de l'effet de ce type de plasma sur la prolifération, le cycle ou encore l'apoptose. L'efficacité antitumorale du plasma a été ensuite évaluée *in vivo* directement sur un modèle de tumeurs de pancréas et un modèle de carcinome colorectal greffés en orthotopique.

A. Activité antitumorale *in vitro*

L'activité antitumorale a été évaluée sur 3 lignées cellulaires différentes, à savoir les lignées HCT-116, H460 et Mia PACA. Les cellules sontensemencées à 1.10^5 cellules par puits dans une plaque 24 puits 24h avant le traitement par plasma. Le traitement plasma est appliqué directement 2 mm au-dessous des 500 μ L de milieu recouvrant les cellules à une fréquence de 2000Hz avec des temps variant de 0 à 120s. Le gaz utilisé dans l'ensemble de ces études est un flux de 200 sccm d'hélium. L'effet du flux de gaz seul a été évalué dans chaque cas et n'a induit aucune diminution de la viabilité cellulaire. 48h après le traitement, la viabilité cellulaire a été déterminée par imagerie de BLI.

Les courbes doses réponses ont permis de déterminer la DL_{50} des différentes lignées testées (figure 80). Tout d'abord le traitement des cellules avec le plasma gun induit une diminution de la viabilité cellulaire. Les DL_{50} des lignées sont respectivement de 12s, 18s et 28s respectivement pour la lignée Mia PACA, la lignée HCT-116 et H460. La lignée H460 est

une nouvelle fois la lignée la plus résistante alors que la lignée Mia PACA présente une sensibilité au traitement plus importante. Le Tableau IX présente les principales mutations des cellules utilisées dans le cadre de cette étude.

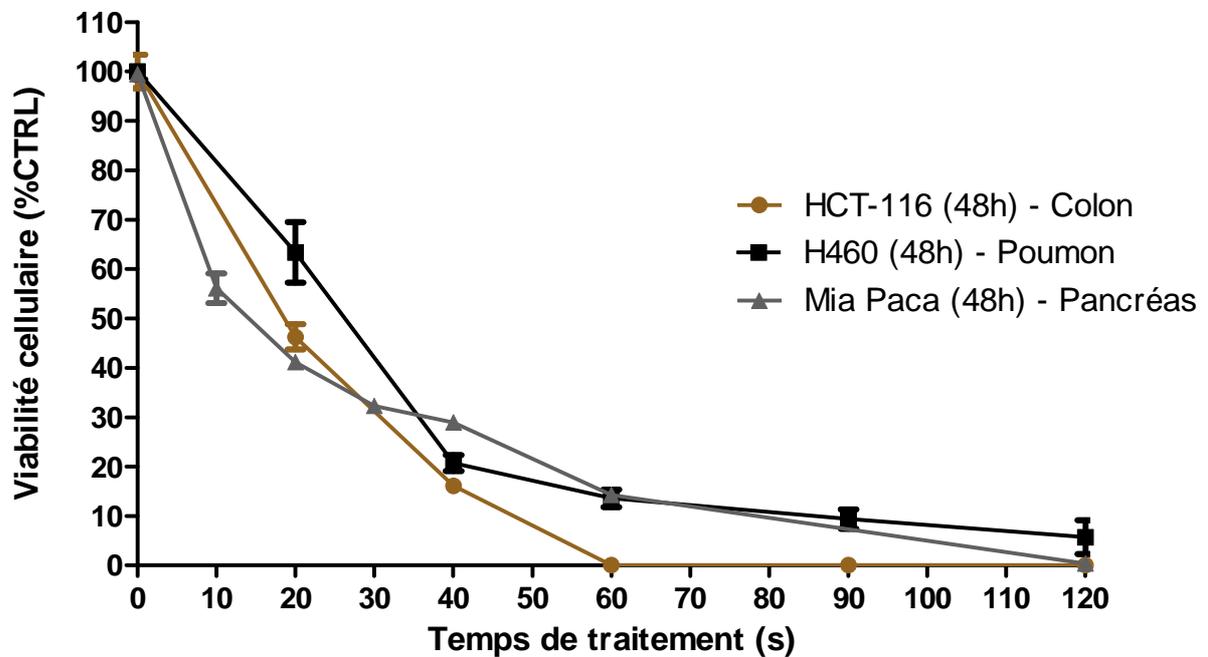


Figure 80 : Effets de dose croissante de plasma sur la viabilité cellulaire. (n=7, moyenne+/-SEM)

Les résultats de DL₅₀ obtenues ici sont difficilement comparables à ceux obtenus avec le plasma DBD. En effet la surface de traitement n'est absolument pas la même, tout comme le plasma généré. Toutefois, les temps de traitements nécessaires pour tuer les cellules sont plus longs avec le plasma gun.

Tableau IX : Principales mutations présentes dans les lignées utilisées.

Lignée	ATCC	PIK3	PTEN	KRAS	p53
HCT-116	CCL-247	muté	WT	Muté	WT
MIA PaCa-2	CRL-1420	WT	WT	Muté	Muté
NCI-H460	HTB-177	Muté	WT	Muté	Muté

Pour explorer la cinétique d'action du plasma sur les cellules, un suivi de l'activité antitumorale du plasma a été réalisé par observation en vidéo microscopie. Pour cela, les cellules HCT-116 ont étéensemencées à 50 000 cellules 24h avant le traitement au plasma gun. Les traitements d'une durée de 7, 15, 30, 45 et 60s ont été réalisés puis la plaque 24 puits

est placée à 37°C dans l'enceinte du vidéo microscope. Les puits sont photographiés toutes les heures pendant 72h (figure 81).

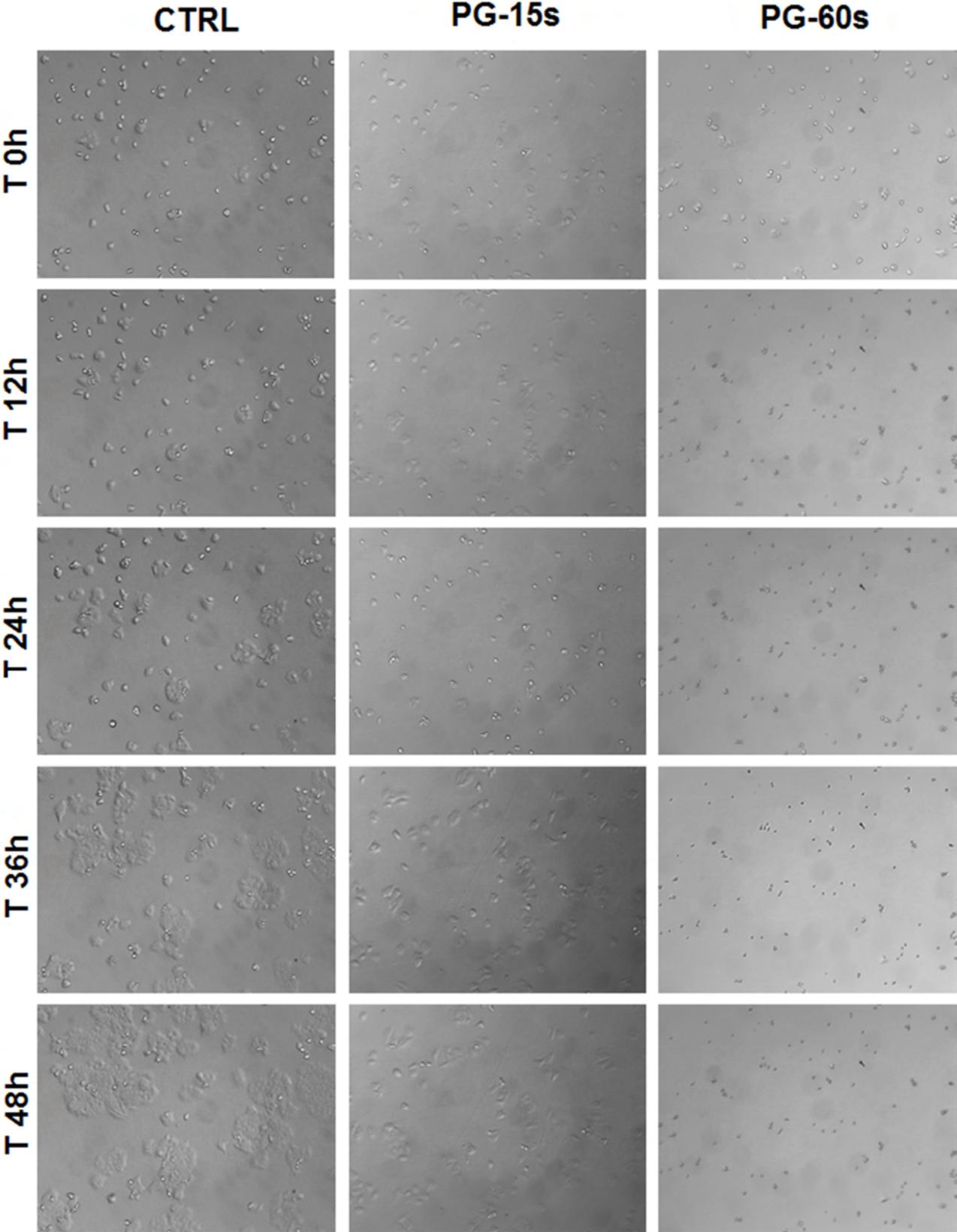


Figure 81 : Suivi par vidéo microscopie de l'effet de différentes doses de plasma sur la lignée HCT-116.

Dans les puits CTRL, les cellules prolifèrent rapidement pour remplir l'ensemble de l'espace disponible dans le puit. Pour les puits traités pendant 15s, cette prolifération est ralentie et une partie des cellules adoptent une configuration sphérique représentative des cellules apoptotiques. Pour le traitement de 60s, l'ensemble des cellules est affecté et meurent rapidement pour n'obtenir plus que des débris 24h après le traitement. Afin de quantifier ces phénomènes de manière plus précise, une macro a été développée sur le logiciel ImageJ. Les images sont analysées toutes les douze heures et la macro détermine la surface totale occupée par les cellules dans le champ considéré. Cette analyse permet de suivre la prolifération cellulaire mais ne permet pas de distinguer les cellules, des débris cellulaires. Les résultats obtenus avec ce logiciel sont présentés sur la figure 82.

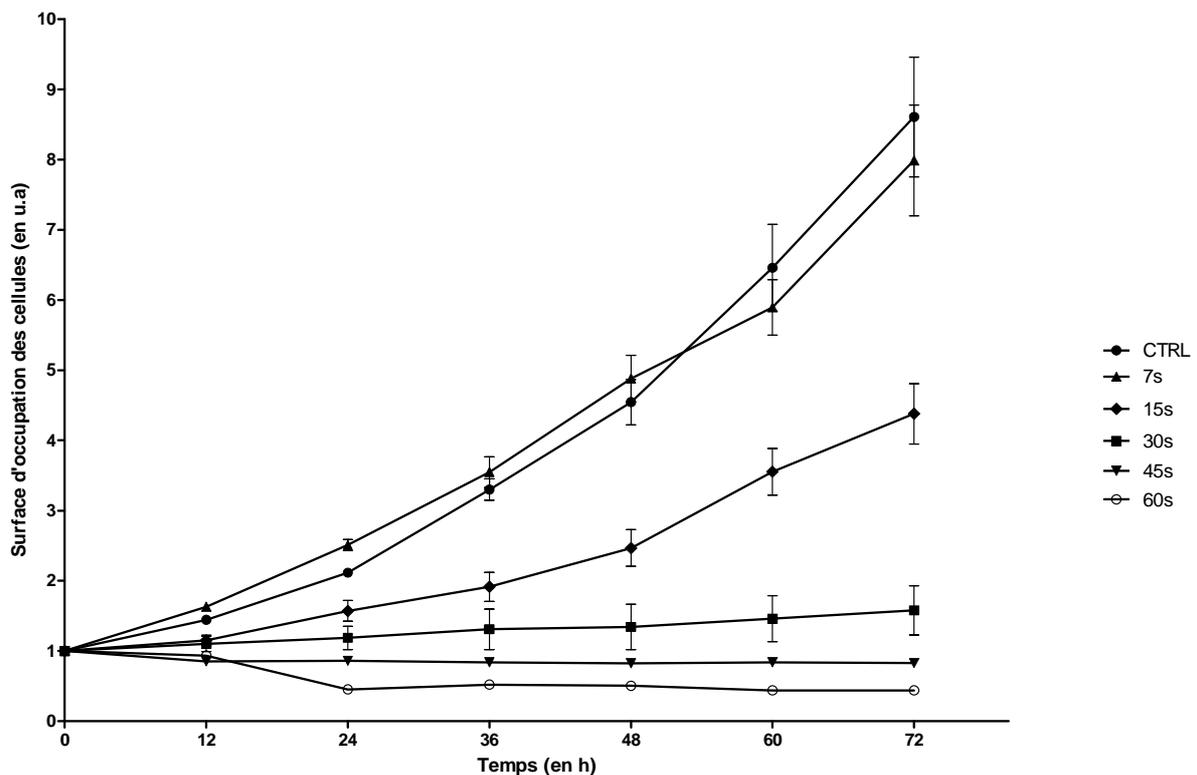


Figure 82 : Suivi de la prolifération des cellules tumorales par vidéo microscopie. (n=4, moyenne+/- SEM)

Pour les cellules CTRL ou traitées avec une dose de plasma de 7s, il y a une prolifération importante des cellules au cours du temps. Un traitement de 15s induit un ralentissement de la croissance des cellules tumorales. Le plasma administré à une dose de 30s induit une stabilisation du nombre de cellules alors que des temps supérieurs à 45s

induisent une diminution du nombre de cellules présentes avec une mortalité totale dans le puit.

B. Effets du plasma sur les paramètres cellulaires

1. Invasion/migration

Le processus de dissémination cellulaire est un des paramètres important dans la cancérisation cellulaire et le développement de foyers à distance. Avec le plasma généré par DBD, une diminution du nombre de métastases est observée après le traitement *in vivo*. Afin d'étudier la capacité de migration des cellules tumorales après traitement au plasma, nous avons réalisé un scratch test qui n'est pas à proprement parler un test de migration/invasion mais constitue une première approche dans l'évaluation des capacités de migration des cellules tumorales.

Une plaque 24 puits estensemencée avec les cellules HCT-116 à une concentration de 100 000 cellules par puits afin de constituer un tapis cellulaire uniforme. Une lésion est ensuite réalisée dans le tapis cellulaire afin de décrocher les cellules sur une longueur et une largeur uniforme. Le plasma est appliqué sur les cellules à des doses non cytotoxiques pour ne pas diminuer la viabilité cellulaire et des images du processus d'invasion sont acquises toutes les heures pendant 72h par vidéo microcopie.

La figure 83 présente les images représentatives du test d'invasion. Pour les cellules CTRL, la lésion est rapidement colonisée par les cellules et à 24h, celle-ci est presque complètement comblée. Le traitement avec le plasma n'empêche pas la colonisation de la lésion, mais semble réduire la vitesse de cicatrisation.

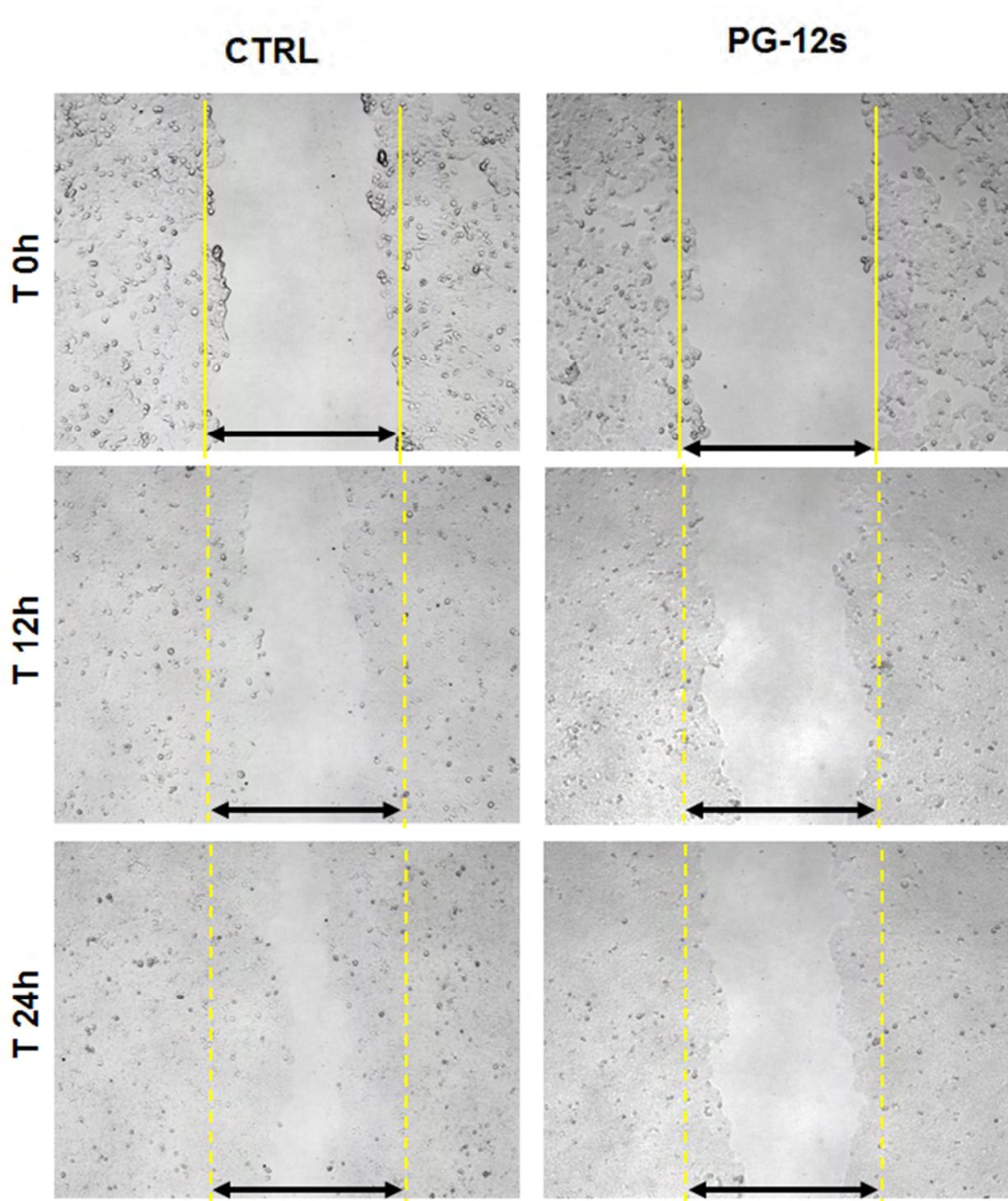


Figure 83 : Photos représentatives des blessures réalisées lors des expérimentations en scratch test.

Pour quantifier de manière précise l'effet observé, la vitesse de cicatrisation a été déterminée à partir de la surface de la lésion à différents temps post traitement avec le logiciel ImageJ. Les résultats obtenus ont été normalisés à la vitesse de cicatrisation des cellules CTRL (figure 84).

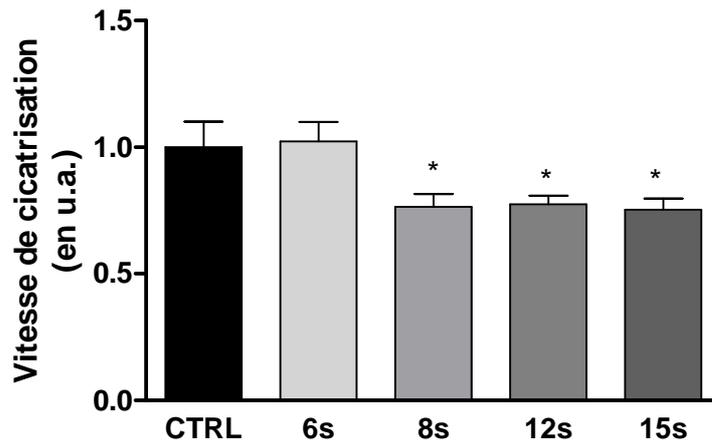


Figure 84 : Vitesse de cicatrisation déterminée à partir de l'aire des blessures. (n=4, moyenne +/- SEM, * $p < 0.05$)

Le plasma froid, à partir d'un temps de traitement de 8s, induit une diminution faible mais significative de la vitesse de cicatrisation par rapport aux cellules CTRL. Ces doses de traitement (8 et 12s) ne sont que faiblement cytotoxiques, mais nos données peuvent être la résultante d'une diminution de la prolifération cellulaire. Des études plus spécifiques sur ce paramètre, notamment l'utilisation de chambres de Boyden, sont nécessaires afin de déterminer l'impact du plasma sur la migration.

2. Cycle cellulaire et prolifération

En utilisant un protocole identique à celui décrit dans la publication de l'*International Journal of Cancer*, nous avons déterminé l'effet du plasma généré par plasma gun sur le cycle cellulaire et la prolifération afin de comparer les résultats avec ceux obtenus par DBD. La distribution dans le cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie en flux 24h après le traitement. Deux doses ont été utilisées, un temps de traitement de 15s et de 30s (figure 85).

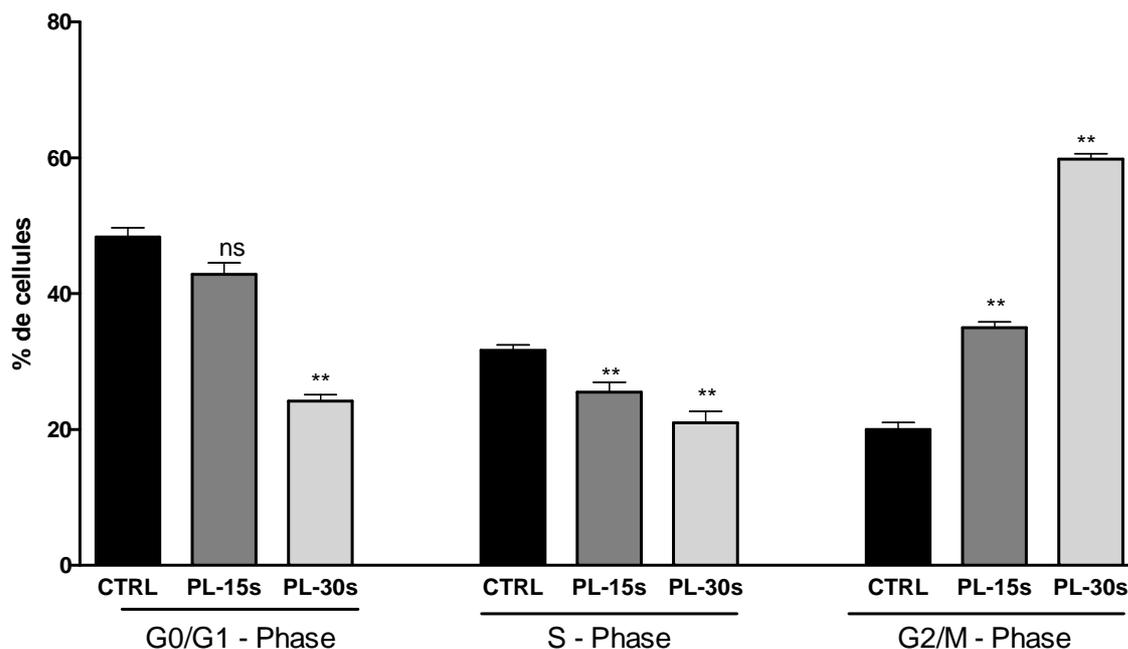


Figure 85 : Distribution des cellules dans le cycle cellulaire en fonction des doses de plasma.
(n=8, moyenne +/-SEM, **p<0.01)

Le traitement des cellules HCT-116 avec le plasma gun induit une diminution significative du nombre de cellules en phase G0/G1 et phase S. Ces diminutions sont couplées à une augmentation importante du nombre de cellules en phase G2/M que ce soit pour un traitement de 15 ou de 30s. Ces résultats suggèrent un arrêt des cellules préférentiellement dans cette phase du cycle cellulaire.

Pour compléter ces données, une étude de la prolifération cellulaire a été réalisée 24h après le traitement, par une incorporation de BrdU dans l'ADN (figure 86).

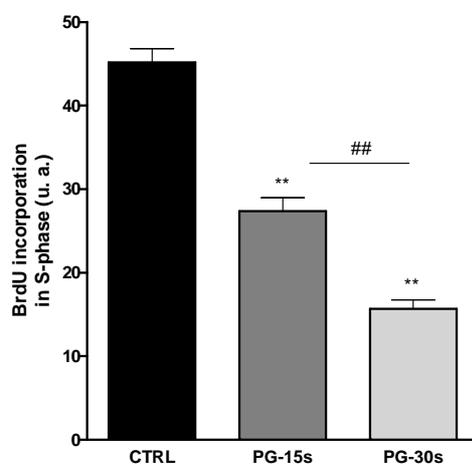


Figure 86 : Prolifération cellulaire 24h après traitement déterminée par incorporation de BrdU.
(n=8, moyenne +/-SEM, **p<0.01)

Le plasma gun induit une diminution importante et significative de la prolifération cellulaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés dans le cadre de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

En comparaison avec les résultats obtenus avec la DBD, le plasma gun induit également des arrêts dans le cycle cellulaire, en particulier en phase G2/M. D'autre part, un arrêt de la prolifération, bien que moins marqué, est retrouvé avec le plasma gun. Les différences observées sur ces paramètres peuvent être liées aux doses utilisées qui ne sont pas les mêmes en terme de réponse antitumorale.

3. Apoptose

Afin de compléter ce panel d'études *in vitro*, l'apoptose induite par le plasma gun a été déterminée en utilisant un marquage par l'annexinV et une détection par cytométrie en flux (figure 87)

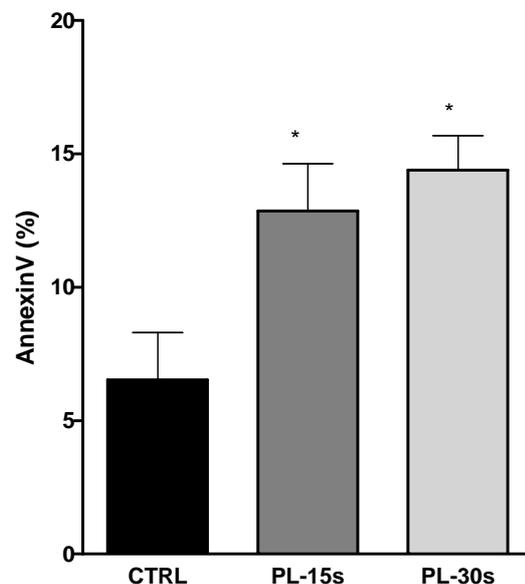


Figure 87 : Induction d'apoptose par le plasma gun sur la lignée HCT-116. (n=8, moyenne+/-SEM, *p<0.05).

Le plasma gun induit une augmentation significative du pourcentage de cellules en apoptose pour les deux types de traitement considérés. Cette induction est similaire à celle observée avec le plasma administré avec la DBD.

La globalité des résultats obtenus *in vitro* avec le plasma gun a permis de définir l'effet de ce type de plasma sur les cellules tumorales. D'une manière générale les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec la DBD. Pour compléter ces données, l'analyse des dommages à l'ADN induit par le traitement est en cours.

C. Activité antitumorale *in vivo*

L'évaluation de l'activité antitumorale du plasma gun a été conduite sur deux modèles de greffes orthotopiques qui sont des cibles potentielles pour l'utilisation du plasma en clinique, c'est-à-dire les adénocarcinomes du pancréas et les carcinomes colorectaux. Des études de tolérance des tissus traités ont été menées et n'ont montré aucun dégât majeur avec un traitement localisé de 10 min à 2000Hz avec le plasma gun.

1. Tumeur pancréatique

Pour évaluer l'activité antitumorale du plasma gun sur un modèle pancréatique, la lignée Mia PACA-Luc a été greffée en orthotopique chez la souris *nude* afin d'obtenir un modèle prédictif de la réponse attendue chez l'homme mais également afin de permettre un traitement *in situ* avec le plasma généré par le plasma gun et localisé à l'aide d'un cathéter et obtenir une interaction directe du plasma avec les cellules tumorales. Les résultats obtenus vont être comparés avec le traitement de référence des tumeurs pancréatique en monothérapie, à savoir la gemcitabine. Pour finir, une étude d'association gemcitabine et plasma gun a été réalisée.

Des cellules tumorales du pancréas ont été injectées dans la tête du pancréas de 32 souris femelles *Swiss Nude* (Charles River) de 5 semaines suivant le protocole de Buchler *et coll.* [292]. Après une période d'acclimatation d'une semaine, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane (2% dans l'air). L'abdomen de l'animal est désinfecté par de la Vétidine® (Vétoquinol) puis une incision dans le quart supérieur gauche de l'abdomen est réalisée verticalement, sur un centimètre. À l'aide d'une pince, le pancréas est délicatement extériorisé sur un champ opératoire. 50 µL de suspension cellulaire contenant 2 millions de cellules sont

injectés dans la tête du pancréas qui est ensuite remis dans l'abdomen et des points de suture sont réalisés.

4 jours après l'injection des cellules tumorales, la prise de la greffe est vérifiée par imagerie de BLI et les souris sont réparties aléatoirement dans 4 groupes de traitement de 8 souris sur la base de leur valeur de BLI :

- Un groupe CTRL
- Un groupe NTP recevant 3 séances de plasma gun de 10 min espacé de 10 jours.
- Un groupe GEM, recevant en *i.v.* 200 mg/kg de gemcitabine administrés tous les 5 jours pour un total de 5 administrations.
- Un groupe NTP+GEM, recevant l'association des deux traitements, la gemcitabine étant administrée 24h avant le traitement par plasma.

Le début des traitements commence 4 jours après l'induction des tumeurs. Pour les souris recevant le plasma, les souris subissent le traitement au cours d'une opération chirurgicale identique à celle utilisé pour l'induction. Le traitement est appliqué sur la masse tumorale à l'aide du cathéter pendant une durée de 10 min avec un flux d'hélium de 200 sccm (figure 88). Les souris CTRL subissent la même opération et sont exposées uniquement au flux de gaz.

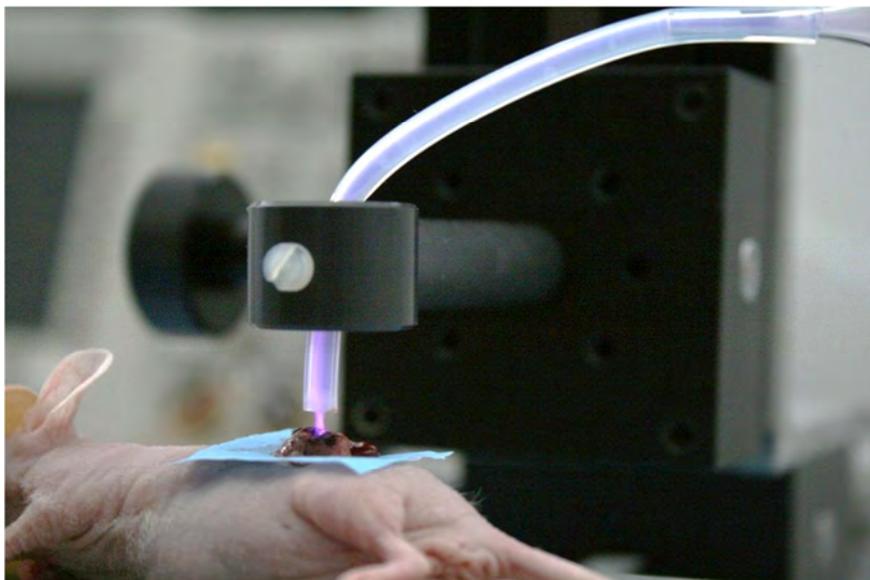


Figure 88 : Photo du traitement d'une tumeur localisée du pancréas chez la souris avec le plasma gun.

Pour évaluer l'activité antitumorale du plasma et de la gemcitabine, une imagerie de BLI est réalisée une fois par semaine jusqu'au sacrifice des animaux qui a lieu à J36.

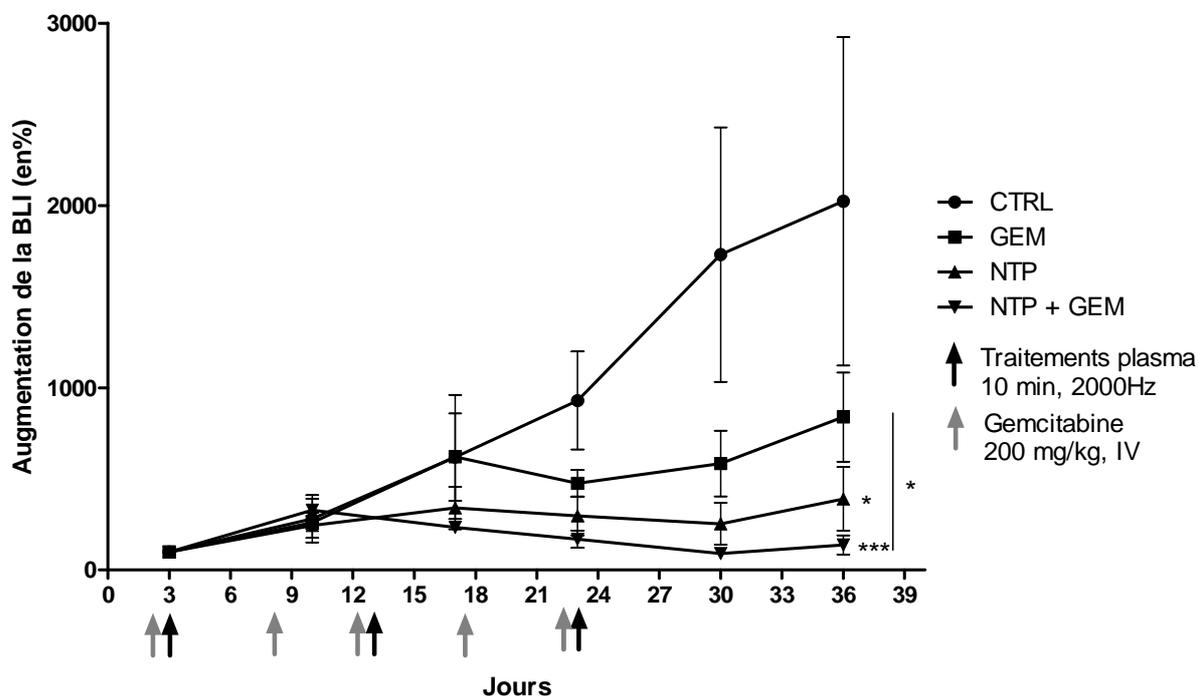


Figure 89 : Évolution de l'activité tumorale de tumeurs du pancréas déterminée par BLI. (n=8, moyenne +/- SEM, *p<0.05 et **p<0.01).

La figure 89 montre l'évolution de la BLI en fonction du temps et des différents groupes de souris. Pour les souris CTRL, il y a une augmentation continue de BLI au cours du temps. Pour les souris traitées à la gemcitabine, l'augmentation de la BLI est identique à celle des CTRL jusqu'au jour 17, puis la BLI se stabilise au cours du temps. Dans le cadre des traitements au plasma gun, il y a une stabilisation de la BLI dès le jour 10 et les traitements semblent induire une légère diminution de la BLI après chaque fraction. L'association de la gemcitabine et du traitement avec le plasma gun induit un effet encore plus marqué. Au final, à J36, seul le plasma et l'association NTP+GEM induisent une diminution significative de la BLI par rapport au groupe CTRL. Ce modèle à J36 ne présente pas de métastases disséminées et ne permet donc pas d'étudier l'effet des différents traitements sur les processus métastatique.

À la fin de l'étude à J36, les souris ont été sacrifiées et les masses tumorales ont été pesées pour les différents groupes (figure 90). Les tumeurs du groupe CTRL atteignent une masse moyenne de 95±8 mg alors que les tumeurs des groupes NTP et GEM+NTP atteignent

respectivement 40 ± 14 et 15 ± 5 mg seulement. La gemcitabine seule ne permet pas de réduire significativement la masse tumorale des tumeurs par rapport au groupe CTRL.

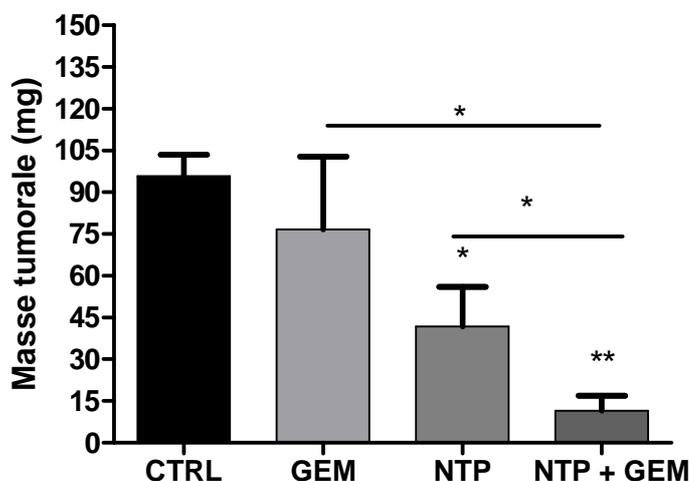


Figure 90 : Masse des tumeurs des différents groupes de traitements à la fin de l'étude (J36). (n=8, moyenne +/-SEM, * $p < 0.05$)

Le plasma gun présente une activité antitumorale importante sur la lignée Mia PACA greffée en orthotopique. Cet effet est renforcé avec l'ajout d'une chimiothérapie de référence dans ce type de pathologie. Il n'est pas encore possible de déterminer l'interaction mécanistique de cette chimiothérapie avec le plasma gun et des études complémentaires sont nécessaires.

2. Carcinome colorectal

L'efficacité antitumorale du plasma gun a également été conduite sur un modèle de carcinome colorectal, mais contrairement au traitement du pancréas, ce traitement a été administré en une seule fraction afin de limiter les opérations chirurgicales et proposer ainsi un protocole transposable à une pratique clinique.

Le protocole d'induction des tumeurs est identique à celui précédemment décrit dans le cadre du traitement avec la DBD. 7 jours après injection des cellules HCT-116 luc au niveau du cæcum, les souris sont réparties en 2 groupes de 6 souris sur la base de leur intensité de BLI (CTRL et PG). Dans le groupe PG, les souris sont opérées selon le protocole habituel et la masse tumorale est traitée avec le plasma gun pendant une durée de 10 min avec

un flux de gaz de 200 sccm d'hélium (figure 91). Pour les souris CTRL, la tumeur est uniquement exposée à un flux de gaz de même intensité pendant 10 min. La croissance tumorale est ensuite suivie par imagerie de BLI une fois par semaine jusqu'à ce que les tumeurs atteignent un niveau de BLI supérieur à 4.10^{10} p/s (photons/secondes). Au-delà, l'envahissement tumoral devient trop important et les souris sont sacrifiées afin d'éviter la douleur liée au protocole.

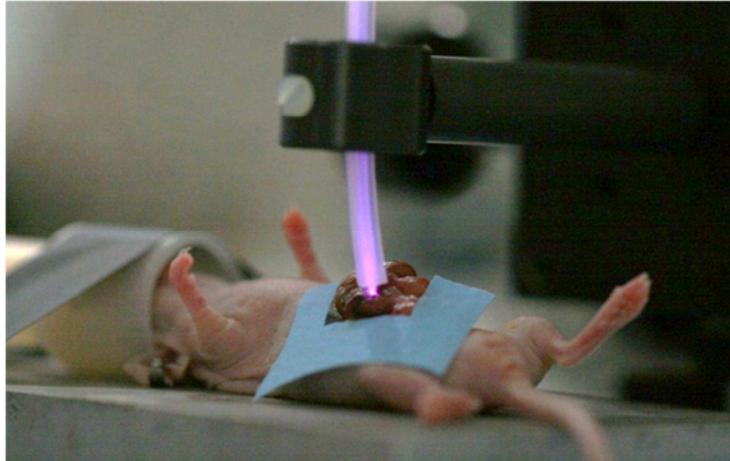


Figure 91 : Traitement de carcinome colorectal avec le plasma gun.

La figure 92 présente l'évolution moyenne de la BLI des souris des différents groupes en fonction du temps. Pour les souris CTRL, une augmentation continue et rapide de la BLI est observée et les tumeurs atteignent le volume cible de 4.10^{10} p/s en 32 jours en moyenne. Les tumeurs exposées à un seul traitement au plasma gun *in situ* présentent un fort ralentissement de la croissance tumorale. Une différence significative de l'intensité de BLI entre le groupe PG et le groupe CTRL est observée dès le jour 14 et se poursuit au cours du temps. Les tumeurs traitées atteignent le volume cible en une moyenne de 69 jours, traduisant un retard de croissance tumorale de 37 jours. Le traitement au plasma gun présente une activité antitumorale très importante *in vivo* dans le cadre du traitement de tumeurs *in situ* et induit dans cette étude un gain de survie des souris traitées de l'ordre de 115%.

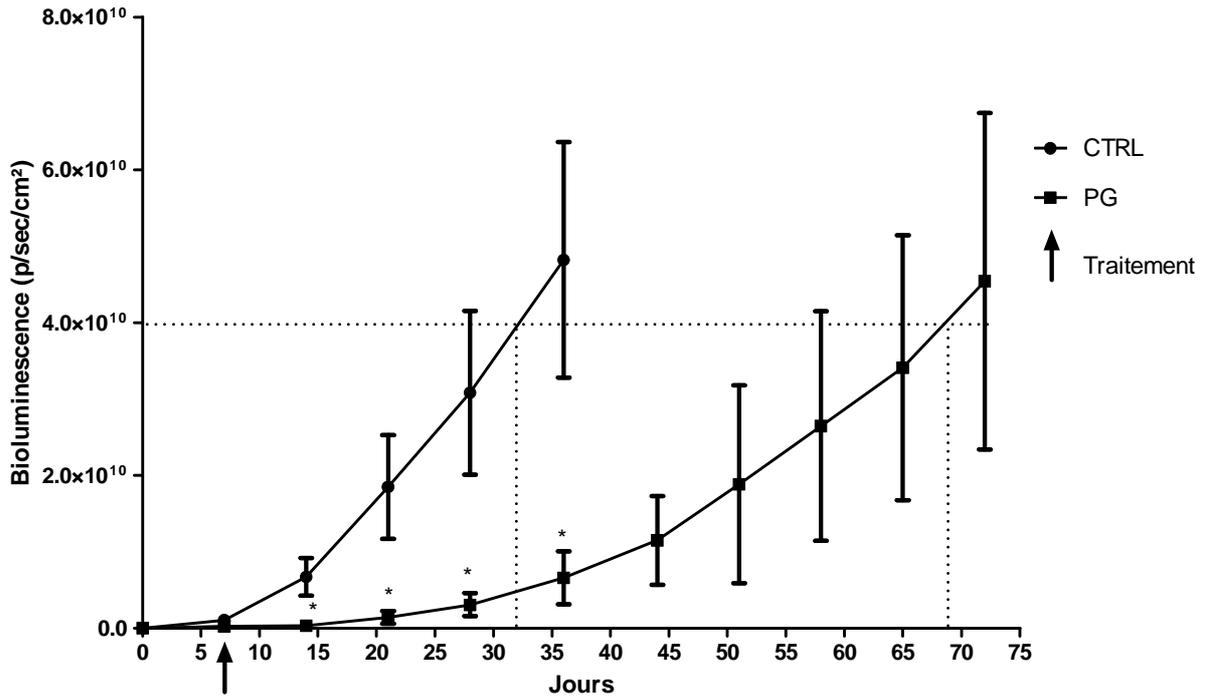


Figure 92 : Suivre de la croissance tumorale par imagerie de BLI du groupe CTRL et du groupe PG. (n=6, moyenne +/-SEM, * $p<0.05$).

Le traitement au plasma gun permet également de réduire le nombre de métastases. Par exemple, à j37, les souris CTRL présentent de nombreux foyers tumoraux disséminés dans l'abdomen de la souris alors que les souris traitées au plasma gun ne présentent qu'un foyer tumoral bien localisé au niveau du cæcum (figure 93).

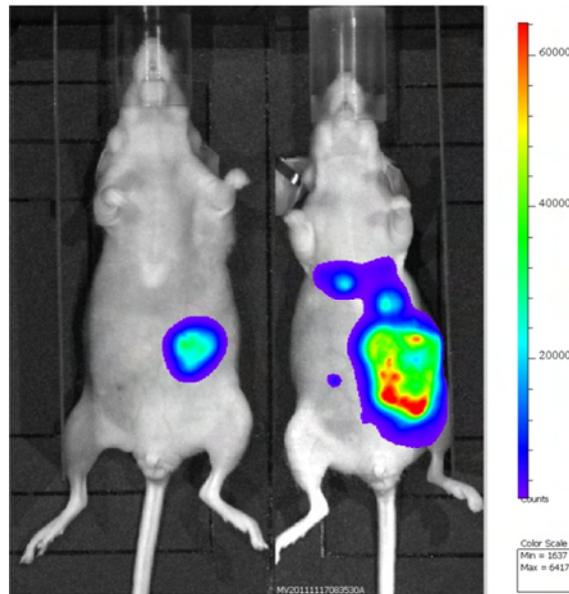


Figure 93 : Imagerie de BLI d'une souris traitée au plasma (à gauche) et d'une souris CTRL (à droite) à J37.

Le plasma gun possède comme la DBD une activité antitumorale importante sur ce modèle tumoral. Une étude portant sur l'association du plasma avec une chimiothérapie de référence comme l'irinotécan permettrait d'augmenter éventuellement l'efficacité observée. De plus, compte tenu de la bonne tolérance du tissu adjacent traité vis-à-vis du plasma, une augmentation de la dose délivrée par une augmentation du débit de dose serait un paramètre intéressant à étudier. Par ailleurs, des études mécanistiques de l'effet du plasma sur les tumeurs sont en cours, afin d'étudier l'effet du plasma *in situ* sur l'apoptose et le cycle.

Chapitre 6 : Discussion

La thématique « plasma médecine » est en plein essor, les applications des plasmas sont évaluées dans de nombreux domaines tels que la décontamination, la coagulation du sang ou encore, comme dans notre cas l'évaluation du plasma froid comme nouvel agent antitumoral. Cela a conduit à un nombre important de publications dans le domaine au cours des cinq dernières années et a une évolution rapide des connaissances sur le sujet. Par exemple, au début de nos travaux, seule l'équipe de Fridman *et coll.* avait démontré une activité antitumorale des plasmas froids sur des cellules tumorales *in vitro* [223]. Depuis, de nombreuses autres équipes, dont la nôtre, ont confirmé ces données sur une grande variété de lignées tumorales, ainsi que la première démonstration de l'activité antitumorale du plasma *in vivo*.

Nos études ont été réalisées dans le cadre d'une recherche dite translationnelle visant à développer et évaluer l'intérêt du plasma froid comme nouvel agent antitumoral, tout en prenant en compte, dès le début du projet, les considérations cliniques que ce soit au niveau des cibles tumorales ou encore des conditions d'application.

Les cibles d'applications retenues sont les tumeurs du colon, du poumon et du pancréas. Il s'agit de pathologies tumorales dont les traitements actuels ne présentent encore pas une efficacité suffisante et dont le pronostic à long terme est sombre. Les traitements actuels associent une prise en charge par de la chimiothérapie systémique mais également des traitements localisés comme la PDT et surtout la radiothérapie. La radiothérapie reste un des traitements de référence en oncologie bien que les effets secondaires sur les tissus traversés et adjacents à la tumeur puissent être importants. La tolérance est un des paramètres clé dans la réussite d'un traitement, celui-ci doit posséder une activité importante sur la tumeur tout en préservant les tissus sains. Cependant, le seuil d'activité des agents antitumoraux actuellement disponibles est souvent très proche des doses maximales tolérées. Le développement ces dix dernières années des thérapies ciblées vise à élargir la fenêtre thérapeutique, en ciblant spécifiquement des caractéristiques spécifiques des cellules tumorales afin de limiter les effets

secondaires systémiques. L'autre solution est de développer des thérapies ciblées par leurs conditions d'applications comme c'est le cas de la PDT ou de la radiothérapie. Les progrès récents en radiothérapie permettent de cibler avec précision le tissu tumoral en couplant l'irradiation à des examens radiologiques de haute précision. Il n'empêche que les tissus traversés par les radiations bien que moins exposés, peuvent rapidement présenter des signes d'intolérance, en particulier au niveau cutané avec le développement de radiodermites [110]. De plus, la multiplication des séances de traitement induit de manière non négligeable une augmentation du risque de développer un cancer radio-induit, en particulier lors de traitement réalisé chez le sujet jeune [293].

La PDT est un traitement *in situ* qui s'approche, par ses conditions d'utilisation, des modalités que l'on peut envisager pour le plasma gun en clinique ; c'est-à-dire, un accès jusqu'au site tumoral par endoscopie, ce qui permet de cibler de manière précise la lésion tumorale grâce à un couplage vidéo. Un des points négatifs importants de la PDT est l'utilisation de photosensibilisants qui doivent être injectés par voie systémique et nécessitent donc une AMM. Les photosensibilisants actuellement disponibles sur le marché ne permettent pas un ciblage optimal de la tumeur et sont à l'origine de nombreux effets secondaires, en particulier liés à l'exposition des tissus sains à la lumière qui conduit à de graves brûlures cutanées ou encore à des problèmes ophtalmologiques [294]. Ces problèmes de phototoxicité représentent un des défis majeurs du développement de la PDT.

Le développement d'un plasma dit fibré permet d'envisager le traitement de tumeurs localisées par voie endoscopique de la même manière que ce qui est développé en PDT, avec un diamètre de capillaire équivalent. De plus, contrairement à la PDT, le fonctionnement du plasma gun ne requiert pas, *à priori*, l'ajout d'une substance sensibilisante. En revanche d'autres contraintes sont à prendre en considération mais dépendent de la source utilisée. Pour le plasma gun, ces caractéristiques sont :

- La nécessité d'un flux de gaz pour générer le plasma
- La présence d'une alimentation en gaz
- Le gaz utilisé
- La présence d'un appareil médical disposant de haute tension
- Le courant électrique traversant les tissus

Ces paramètres représentent autant de défis qu'il faut prendre en compte dès le début du développement de la thérapie, comme le choix des gaz et du flux utilisés. Des sources aux

fonctionnements différents du plasma gun sont également disponibles, comme par exemple la DBD qui offre des possibilités cliniques intéressantes.

La surface de traitement qu'offre le système DBD permet d'envisager des traitements de tumeur d'un volume plus important au décours d'un acte chirurgical mais surtout permet d'envisager l'utilisation de ce type de plasma pour stériliser les berges lors de la résection tumorale. Les rechutes sur le site de résection liées à la persistance de cellules tumorales restantes dans les berges sont fréquentes. Ce type de traitement pourrait permettre d'améliorer le contrôle local sans augmenter les marges faites par le chirurgien, en particulier dans le cas de tissus sensibles comme le cerveau.

Dans notre cas, les études précliniques sur l'activité antitumorale ont été menées à la fois *in vitro* et *in vivo* sur des lignées tumorales représentatives des cibles tumorales pour lesquelles le plasma a été développé. La lignée U87-MG a principalement été utilisée pour ses caractéristiques de radiorésistance et chimiorésistance importantes ; mais ce type de tumeur peut présenter une cible dans le cadre de la stérilisation des berges tumorales après résection. Les autres lignées utilisées sont les suivantes :

- La lignée HCT-116 : modèle de carcinome colorectal
- La lignée NCI-H460 : modèle de carcinome pulmonaire
- La lignée Mia PACA : modèle d'adénocarcinome du pancréas

L'évaluation de l'activité anti-tumorale du plasma froid généré par DBD ou plasma gun a été conduite sur ces différentes lignées qui sont toutes transfectées avec le gène de la luciférase et l'efficacité a été déterminée dans la plupart des cas par imagerie de BLI. La validité de la BLI dans le cadre de cette évaluation a été faite en comparant les résultats obtenus avec un comptage cellulaire et un test de viabilité MTT. Une très bonne concordance entre les 3 techniques a été obtenue et nous a permis d'utiliser principalement la BLI. En effet, la BLI repose sur une activité cellulaire, par son besoin en ATP et en oxygène mais également par la transcription du gène de la luciférase. Un traitement ciblant principalement le métabolisme cellulaire pourrait impacter de manière importante les valeurs de BLI sans impacter sur le nombre de cellules vivantes.

Nos données montrent que le traitement des cellules tumorales avec le plasma généré par DBD induit une diminution rapide du nombre de cellules vivantes. Un temps de traitement

supérieur à 30s permet de tuer l'ensemble des cellules présentes dans le puit en seulement 24h et cela, quelque soit la lignée cellulaire testée. Le plasma gun qui est une variété de « plasma jet » présente également une activité importante envers les cellules tumorales testées comme par exemple les lignées H460, HCT-116 ou encore MiaPaca. Ces résultats sont concordants avec ceux de la littérature qui rapportent une activité antitumorale du plasma sur une large variété de cellules tumorales. Ainsi, des données sont disponibles dans la littérature sur les lignées suivantes :

- mélanome (G361, B16F10, A2058) [288, 295-297]
- carcinome hépatocellulaire (BEL-7402, HepG2) [298, 299]
- carcinome colorectal (SW480, HCT-116, COLO320DM) [296, 300, 301]
- carcinome pulmonaire (A549) [302]
- carcinome mammaire (MCF-7) [303]
- carcinome du col de l'utérus (HeLa) [304]

D'une manière générale, les lignées les plus souvent testées sont le mélanome et le carcinome colorectal, la lignée de mélanome était la première sur laquelle a été évaluée et démontrée l'activité antitumorale du plasma froid généré par DBD [223]. Le mélanome par sa localisation cutanée est une cible potentielle intéressante pour la DBD qui permet un traitement de surface. Des équipes travaillant déjà sur ce modèle au départ du projet, cette cible a volontairement été écartée de nos travaux. Le deuxième modèle le plus étudié est le carcinome colorectal pour les applications avec « les plasma jet ».

Il n'existe pas dans la littérature d'étude comparative de l'efficacité de la décharge DBD vs les plasma jets. En effet, comme dans notre cas, il est très difficile de comparer les résultats obtenus en termes d'efficacité. Ces deux sources présentent des caractéristiques qui leurs sont propres et dont la modulation peut faire varier l'efficacité du traitement. Le flux de gaz utilisé avec les plasma jets en est un exemple concret. La surface de traitement est également un paramètre très différent entre la DBD et le plasma gun. Effectivement, pour un temps de traitement donné, nous avons obtenu une efficacité plus importante de la DBD par rapport au plasma gun, mais ces résultats ne signifient pas pour autant que le plasma gun est moins performant. L'utilisation de ces différentes sources doit être faite en fonction des besoins d'application et en général la littérature parle de l'effet du plasma froid sans distinction de la source qui le produit.

Afin de comprendre les mécanismes d'action du plasma sur les cellules tumorales *in vitro*, l'étude de l'impact du traitement sur un certain nombre de paramètres intracellulaire a été réalisée.

Tout d'abord, le plasma a un impact important sur le cycle cellulaire. Nous avons démontré que la DBD ou encore le plasma gun induit des arrêts des cellules tumorales dans différentes phases du cycle cellulaire (S et G2/M). Yan *et col.* ont également observé un arrêt des cellules en phase G2/M après un traitement réalisé avec un plasma jet d'hélium [299]. La lignée utilisée était une lignée de carcinome hépatocellulaire (HepG2) sur laquelle des doses croissantes de plasma ont été administrées et la distribution dans le cycle cellulaire a été évaluée 24h après le traitement. Une augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M a été observée avec l'augmentation de la dose de plasma délivrée. Ces résultats sont très proches de ceux que nous avons obtenus avec la lignée HCT-116 que ce soit avec le traitement par DBD ou par plasma gun. Dans les cas de doses plus importantes, une augmentation du nombre de cellules en phase S est également observée, suggérant un blocage des cellules en phase G2/M et S. En revanche, ces données sont contradictoires avec celles publiées par Kim *et coll.* qui montre sur la lignée HCT-116 une diminution dose/dépendante du nombre de cellules en phase S et G2/M après traitement [300]. Cette différence peut éventuellement s'expliquer par le type de source plasma utilisée qui est différent.

Le cycle cellulaire est régulé par un nombre important de protéines et fait intervenir des checkpoints qui permettent de maintenir l'intégrité de l'ADN au cours du cycle. Une des protéines majeures dans la régulation du cycle cellulaire en réponse à un stress est la protéine p53 ; par exemple, une induction de p53 a été décrite après radiothérapie [11]. Les auteurs ont évalué l'expression de cette protéine sur la lignée HepG2 (p53 WT) après traitement plasma par RT-PCR et ont montré une augmentation de p53 en fonction des doses de plasma utilisées [299]. Ces résultats de RT-PCR permettent de mettre en évidence l'augmentation de la quantité de protéine mais ne permettent pas d'affirmer avec certitude une augmentation de l'activité du facteur de transcription p53. Comme la radiothérapie, le plasma induit une expression de p53 et cette expression permet alors l'expression de gènes cibles spécifiques en réponse au stress [10]. Parmi ces gènes cibles se trouvent ceux de la régulation du cycle cellulaire, permettant ainsi un arrêt de la prolifération des cellules. Les auteurs ont ensuite évalué l'expression de la cycline B1, de p21 et de CDC2 toujours par RT-PCR. Le complexe cycline B1 – Cdc2 est un complexe majeur de la régulation du cycle cellulaire en intervenant dans la progression G2 à M du cycle [305]. Les données obtenues montrent que le plasma

provoque une diminution de l'expression de la cycline B1 et de la kinase cdc2 dans les heures suivant le traitement [299]. Bien que cette hypothèse n'ait pas été validée, les auteurs proposent que cette diminution des ARNm provoquerait ainsi une diminution du complexe cycline B1/Cdc2 dans la cellule conduisant à un blocage des cellules en phase G2. En effet, en l'absence de synthèse de cycline B1, cdc2 reste inactif et la cellule ne peut entrer dans la phase de mitose, restant ainsi bloquée en phase G2. Kim *et coll.* ont également montré par western blot que l'expression d'une autre cycline, la cycline D1, est fortement diminuée après traitement plasma de cellules HCT-116 [301]. Le niveau d'expression de la cycline D1 est dépendant des phases du cycle cellulaire et permet le passage de certains checkpoints comme la transition G1-S [306]. Un niveau faible de cycline D1 est associé à la phase S du cycle cellulaire et pourrait correspondre à l'accumulation de cellules en phase S que l'on observe après traitement au plasma.

La protéine p21 est sous la dépendance directe de p53. De manière non surprenante, la protéine p21 est surexprimée après traitement au plasma [299]. Elle joue également un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire en inhibant de manière importante les kinases impliquées dans le cycle cellulaire. Cette protéine est couramment surexprimée dans la réponse aux agents antitumoraux. Par exemple, la vinblastine, un agent antimitotique, provoque une augmentation de p21 intracellulaire induisant des arrêts du cycle cellulaire [65]. La radiothérapie va également induire un arrêt du cycle cellulaire *via* la régulation des cyclines (cycline p21, p27, p16) lors des checkpoints du cycle [106]. D'une manière générale, ce sont les ROS qui sont à l'origine de ces arrêts, en effet les ROS appliqués seuls sur les cellules vont induire le même type de réactions que le plasma, c'est-à-dire une diminution de la cycline D et une accumulation de p21 dans la cellule [138].

Les arrêts dans le cycle cellulaire sont à l'origine de l'arrêt de la prolifération cellulaire observée après traitement par plasma et représentent une étape importante dans l'efficacité du traitement. Certaines mutations comme le dysfonctionnement de la protéine p53 ou encore une suractivation de la voie PI3K/AKT qui exerce un contrôle négatif sur p21 empêchent les arrêts dans le cycle [54]. Dans ce cadre, la présence d'une mutation de p53 dans les cellules traitées peut ainsi être un facteur de résistance au plasma. Les données obtenues dans nos différentes études montrent que le type cellulaire le plus résistant au plasma est la lignée NCI-H460. Cette lignée possède une mutation dans le gène p53, contrairement aux lignées U87-MG et HCT-116, ce qui semble corroborer notre hypothèse (Tableau X).

Tableau X : Mutations des différentes lignées.

Lignée	ATCC	PIK3	PTEN	KRAS	p53
HCT-116	CCL-247	muté	WT	Muté	WT
U87-MG	HTB-14	WT	Muté	WT	WT
MIA PaCa-2	CRL-1420	WT	WT	Muté	Muté
NCI-H460	HTB-177	Muté	WT	Muté	Muté

Par ailleurs, la lignée NCI-H460 possède également une mutation pour les gènes PIK3 et K-ras peut être également impliqué dans cette résistance. Dans la littérature, la perte de la fonctionnalité de p53 dans les tumeurs se traduit en général par une chimio et radio-résistance [13, 14] et la détection de mutations de p53 a été proposée comme facteur pronostique dans les cancers ORL [17].

La lignée Mia PACA est quant à elle la plus sensible au plasma mais elle possède également une mutation pour le gène p53 ainsi que de K-ras. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène comme par exemple la présence éventuelle d'autres mutations comme pour la protéine pRB, ou au niveau de la voie de l'EGF-R, ou, plus simplement, que les mutations affectant le contrôle du cycle cellulaire ne soient pas prédictives de la réponse thérapeutique. La réponse précise à ces questions nécessite de réaliser des expérimentations complémentaires comme la vérification de la distribution dans le cycle cellulaire après traitement d'une lignée p53 mutée telle que la lignée NCI-H460 afin de vérifier la présence d'arrêts dans le cycle cellulaire. Il serait également intéressant de tester l'efficacité du plasma sur un panel de lignées plus important et/ou de réaliser un test de sensibilité au plasma sur une lignée mutante pour p53 et réintroduire le gène fonctionnel pour en déduire son rôle exact dans la réponse.

Nos études ont montré, en parallèle de cet arrêt de la prolifération, une induction d'apoptose après traitement. Un marquage à l'annexine V a permis d'observer cette induction après traitement plasma par DBD ou plasma gun de la lignée HCT-116. Cette induction a également été observée 24h après le traitement de la lignée U87 avec un marquage à l'annexine V et également par une détection de l'activité caspase3.

Fridman *et coll.* ont été les premiers à montrer une induction d'apoptose sur une lignée de mélanome [223]. Des doses modérées de plasma induisent une mort cellulaire par apoptose tandis que des doses élevées provoquent une mort cellulaire par nécrose. Ces données ont été confirmées par la suite par de nombreuses équipes qui ont également observé cette induction

d'apoptose [288, 297, 304]. L'apoptose découlant du traitement par plasma se déclenche dans les 24h mais atteint son maximum dans les 48 à 72h suivant le traitement [297].

Les mécanismes précis de l'induction d'apoptose par le plasma ne sont pas encore clairement définis mais le rôle de p53 paraît une nouvelle fois prépondérant [299]. p53 est une protéine importante dans le déclenchement des processus apoptotiques, en particulier *via* la régulation des protéines pro et anti-apoptotiques. L'évaluation de la balance apoptotique a été réalisée par Yan *et coll.* en déterminant l'expression des protéines Bax et Bcl-2 après le traitement par plasma des cellules HepG2 [299]. L'expression de la protéine Bax est associée à une augmentation de l'apoptose tandis que la protéine Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique. C'est la balance de ces protéines qui permet le déclenchement ou non de l'apoptose. Dans le cadre des traitements par plasma, une augmentation de l'expression de Bax est observée, associée à une diminution de l'expression de Bcl-2 [299]. Ces données mettent en évidence la place de la réponse intracellulaire résultant du traitement par plasma avec l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcriptions comme p53, et l'induction de voies de signalisation conduisant au déclenchement de l'apoptose. Une étude de Ahn *et coll.* a confirmé ces données en étudiant l'effet du plasma sur les voies de déclenchement de l'apoptose [304]. Après avoir observé une apoptose induite par le plasma sur une lignée de carcinome du col de l'utérus (HELA), ces auteurs ont étudié le potentiel mitochondrial et ont montré une dépolarisation du potentiel membranaire de la mitochondrie après traitement. Cette dépolarisation conduit au relargage de facteurs pro apoptotiques [304]. En utilisant des inhibiteurs spécifiques des caspase 3, 8 et 9, les auteurs ont pu mettre en évidence le rôle des différentes caspases dans l'induction d'apoptose par le plasma. Avec les inhibiteurs de caspase 3 et 9, une diminution de l'apoptose induite est observée alors qu'avec un inhibiteur de la caspase 8, aucun impact sur l'apoptose n'est retrouvé. Ces données suggèrent que l'apoptose induite par le plasma impliquerait la voie mitochondriale et non la voie extrinsèque [304].

Par ailleurs, l'apoptose est le principal type de mort cellulaire étudié après traitement plasma mais il n'est pas forcément le seul impliqué, d'autres types pouvant intervenir comme la catastrophe mitotique qui pourrait expliquer la mort cellulaire sur des temps tardifs après le traitement. En effet, la radiothérapie dont l'efficacité repose également sur la génération de ROS intracellulaires induit principalement une mort cellulaire par catastrophe mitotique qui n'intervient qu'après 2 à 3 divisions cellulaires [299]. La mise en place de ce type de mort repose également sur une activation de p53 conduisant au recrutement des protéines impliquées dans l'apoptose comme la caspase 3 [307]. Ce type de mort est la résultante de

l'accumulation de dommages qui conduit à des divisions asymétriques et un blocage de la mitose, ce qui signifie que dans ce cadre, les arrêts dans le cycle avec l'implication des différentes cyclines interviennent également [308].

Les arrêts dans le cycle cellulaire induisent l'apoptose des cellules, et même si d'autres éléments peuvent induire l'apoptose des cellules de manière indépendante du cycle, il semble que ce phénomène soit majoritaire.

Les arrêts dans le cycle cellulaire conduisant à ce déclenchement d'apoptose sont principalement liés à la formation de dommages à l'ADN induits par le plasma. En effet, nous avons montré dans le cas des lignées U87-MG et HCT-116 une augmentation importante du nombre de cassures de l'ADN après traitement plasma avec la DBD. Ce type de cassures double brin est très souvent létal et conduit à l'apoptose à cause de l'impossibilité pour la cellule de les réparer. C'est ce type de mécanisme qui est couramment observé après radiothérapie ou encore avec la PDT [95]. Un nombre important de chimiothérapies comme les inhibiteurs de topo-isomérase induisent également des cassures de l'ADN conduisant à un arrêt irréversible du cycle cellulaire et à une mort par apoptose des cellules [63]. D'une manière générale, les ROS, qui sont particulièrement oxydants pour les molécules telles que l'ADN, vont induire un nombre important de cassures de l'ADN provoquant un arrêt du cycle cellulaire [137].

Dans notre cas, l'évaluation de ces dommages à l'ADN a été réalisée par la détection par cytométrie en flux de la phosphorylation de H2AX. Cette protéine participe à la détection des cassures de l'ADN et est ensuite rapidement phosphorylée, ce qui va permettre la signalisation de ces dommages [309]. Par exemple, dans le cas de la radiothérapie, le recrutement de H2AX va activer les protéines ATM et ATR qui vont phosphoryler la protéine p53 et permettre son accumulation ; p53 va alors transcrire ses gènes cibles et ainsi induire une apoptose radio-induite [12]. Cependant, la phosphorylation de H2AX peut également intervenir dans le cadre de la fragmentation de l'ADN induite durant les processus apoptotiques. Pour détecter les dommages induits par le plasma lui-même, nous avons réalisé les expérimentations 1h après traitement. En effet dans la littérature, il est admis que les cassures d'ADN consécutives au déclenchement de l'apoptose n'interviennent pas avant un délai minimum de 3h [310].

Des études récentes ont également rapporté une augmentation du nombre de cassure de l'ADN après traitement venant confirmer nos données [297]. En utilisant, un marqueur identique (la phosphorylation de H2AX), une induction dose dépendant du nombre de

cassures de l'ADN a été observé sur une lignée de mélanome. Cependant, à hautes doses (>30J/cm²), les auteurs ont trouvé une diminution du taux de phosphorylation de H2AX et suggèrent que cette dose induit une mort cellulaire par nécrose. Une autre étude réalisée sur des plasmides a permis de déterminer l'effet du plasma sur l'ADN, en analysant le type de dommages induits [311]. Dès les premières secondes de traitement, un nombre très important de cassures simple brin est induit puis, dans des temps plus tardifs, il y a la formation de cassures double brin [311].

Les mécanismes de signalisation des dommages de l'ADN après traitement plasma ont été étudiés par Kalghatgi *et coll.* sur une lignée non tumorale de cellules épithéliales de sein (MCF10A) [221]. Comme pour les cellules tumorales, une augmentation dose dépendante du nombre de dommages à l'ADN est observée. Les auteurs ont ensuite analysé l'implication des protéines ATM, ATR et DNA-PK dans la phosphorylation de la sérine 139 de H2AX après traitement plasma mais également en comparaison avec le H₂O₂. En utilisant un inhibiteur de l'activité de ces 3 protéines (ATM, ATR et DNA-PK) : la wortmannin, la phosphorylation de H2AX est fortement diminuée que ce soit après traitement plasma ou encore avec le H₂O₂. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la protéine ATM ne réduit absolument pas la phosphorylation de H2AX en réponse au plasma, alors que la phosphorylation de H2AX est fortement diminuée après exposition au H₂O₂ [221]. Ces données suggèrent que les protéines ATR et DNA-PK seraient nécessaires à la phosphorylation de H2AX en réponse aux dommages de l'ADN induits par le plasma. Pour conclure sur le rôle de ATM et ATR, les auteurs ont utilisé des shRNA dirigés contre ATM ou ATR pour les inhiber spécifiquement. L'inhibition de la protéine ATM n'empêche pas la phosphorylation de H2AX alors que l'inhibition de ATR en bloque la phosphorylation [221]. Ces données confirment que les dommages à l'ADN induits par le plasma activent la protéine ATR, ce qui n'est pas le cas du H₂O₂ qui active la protéine ATM.

L'activation de la protéine ATM est généralement associée à la détection de cassures double brin de l'ADN, alors que la protéine ATR est associée à la formation de dimères de pyridines par les rayonnements UV [312]. Cependant, ce type de dommages n'a pas été retrouvé après l'exposition au plasma [221]. Le type de dommages induits par le plasma est encore à déterminer et bien que les cassures double brin ne soient pas à exclure, des dommages à l'ADN induit par l'oxydation des bases par les ROS sont à privilégier. En effet, leur caractère électrophile les rend très réactifs et ils peuvent oxyder les bases de l'ADN. Ces oxydations conduisent à un nombre très important de bases modifiées, les plus étudiées étant

la 8-oxoG (oxo guanine), et les diols de thymines [313]. D'autre part, l'activation de ATR a été obtenue sur une seule lignée non tumorale dans le cadre de l'étude présentée. Une étude récente montre sur une lignée de cellule rénales, une induction d'apoptose mettant en jeu l'activation de la caspase 3 [314]. Cette apoptose est liée à la génération de dommages à l'ADN détectés par une augmentation de la phosphorylation de H2AX. De manière contradictoire à l'étude précédente, ces dommages à l'ADN induisent une signalisation dépendante de la protéine ATM [314], l'utilisation de cellules déficientes en ATM ne permettant plus de visualiser la phosphorylation de H2AX. A l'heure actuelle, les données disponibles ne sont donc pas suffisantes pour comprendre les phénomènes induits au niveau de l'ADN par le plasma et le type de cassures mis en jeu.

D'après la littérature et nos données, l'effet du plasma pourrait être résumé de la manière suivante, le plasma induisant :

- des dommages à l'ADN
- le recrutement de la protéine ATR ou ATM
- la phosphorylation de H2AX
- l'activation de p53.
- le blocage des cellules en phase S et G2/M *via* la régulation de p21 et des cyclines
- l'arrêt de la prolifération
- et la mort cellulaire.

Ce type de mécanisme est assez similaire à ceux que l'on observe après radiothérapie ou encore avec l'utilisation de chimiothérapies comme les agents alkylants qui vont créer des dommages massifs à l'ADN.

Après avoir démontré l'activité antitumorale des plasmas froids et l'action de ceux-ci au niveau intracellulaire, il est important de déterminer les composants du plasma à l'origine de cet effet. Le plasma est en effet composé de nombreux éléments intrinsèques qui peuvent tous présenter un effet antitumoral sur les cellules tumorales :

- Les ROS
- Les RNS
- La température

- Le champ électrique
- Les radiations UV
- Les particules chargées

La discrimination des composants impliqués, bien que non indispensable, pourrait permettre une amélioration de l'efficacité du plasma en jouant sur les paramètres les plus importants. D'après l'ensemble des effets observés au niveau cellulaire, les ROS semblent avoir une place prépondérante dans l'effet antitumoral des plasmas. Afin de prouver cette affirmation, nous avons réalisé des traitements direct et indirect des cellules tumorales. Dans le cas du traitement indirect, du milieu est traité puis est mis en contact avec les cellules. Avec ce traitement, les cellules ne sont pas exposées aux champs électriques, à l'élévation potentielle de température ni aux rayonnements UV. Elles sont uniquement exposées aux espèces générées par le plasma qui ont diffusées dans le milieu. Ce type de traitement induit une mort cellulaire identique à un traitement standard, ce qui signifie que ce sont les espèces qui sont majoritairement responsables de l'activité du plasma *in vitro*. Ces données ont été confirmées par ailleurs en utilisant le même type d'expériences sur une lignée de mélanome avec une source DBD [223]. La quantité de milieu présent dans les puits joue alors un rôle important, plus la quantité de milieu est importante, moins le plasma est efficace [223]. A partir de ce constat, Khalghatgi *et coll.* ont réalisé le traitement de cellules en diluant le milieu, ils ont mis en évidence que la quantité de dommages à l'ADN induits est corrélée à la concentration utilisée [221]. Le plasma générant des quantités importantes d'ions H⁺, une acidification rapide du milieu traité apparaît. Cette acidification dépend du type de source plasma utilisée et du temps de traitement. Dans nos expériences *in vitro*, l'utilisation d'un milieu de culture tamponné ne permettait pas une diminution en dessous de pH 6.5 même pour les doses de plasma les plus importantes. D'autres études dans la littérature montrent une diminution du pH aux alentours de pH5.5 après seulement 30s de traitement, les auteurs ont alors comparé l'effet de 30s de plasma à l'effet du milieu acidifié à pH5.5 et ont montré que cette acidification du milieu n'avait aucun impact sur la viabilité de la lignée utilisée, alors que le plasma entraînait la mort de plus de 80% des cellules [223, 297].

Afin de vérifier que les RS générés par le plasma sont les acteurs majeurs de l'effet antitumoral, nous avons utilisé des inhibiteurs non spécifiques des ROS comme le NAC ou encore le pyruvate de sodium. En utilisant ces inhibiteurs, le plasma ne présente plus aucune activité antitumorale. Ces données sont conformes à celle retrouvées dans la littérature qui montrent que le NAC permet de prévenir les dommages à l'ADN induits par le plasma sur

une lignée de mélanome [297]. De manière non surprenante, l'apoptose induite par le plasma est également inhibée dans ces conditions [297]. Ces résultats ont été également obtenus sur une lignée non tumorale de cellules épithéliales de sein [221].

Afin de déterminer la quantité de ROS produite dans le milieu, nous avons réalisé un dosage des ROS en utilisant deux sondes fluorescentes. La première est le DHE (DiHydroEthidium) qui est une molécule fluorescente préférentiellement clivée par le $O_2^{\bullet-}$, la seconde est le H_2DCFDA qui permet la détection préférentielle du H_2O_2 . L'utilisation de ces deux sondes a montré que le plasma produit dans le milieu de culture une quantité de ROS dose dépendante. En utilisant comme référence une gamme de dilution de H_2O_2 , nous avons mis en évidence que le plasma à la dose $10J/cm^2$ génère une quantité maximale de H_2O_2 de l'ordre de $600\mu M$. Cette quantité est largement surestimée, la sonde n'étant pas spécifique exclusivement du H_2O_2 .

Le dosage des ROS intracellulaires montre une augmentation importante par rapport aux cellules non traitées et met en évidence que les dommages induits à la cellule sont liés à la diffusion intracellulaire des ROS générés dans le milieu [221]. La durée de vie des ROS est souvent limitée à quelques secondes. Par exemple, l'oxygène singulet possède une durée de vie très courte (quelques μs dans l'eau et 25 à 100 μs dans les milieux organiques) mais est très réactif et susceptible de réagir dans son environnement proche (10 à 45 nm) [82]. Afin de vérifier l'influence du milieu de culture dans les effets antitumoraux, nous avons réalisé le traitement de cellules dans du PBS. Tout d'abord, le PBS en contact pendant 24h avec les cellules n'a pas d'influence sur la survie cellulaire. Le traitement de cellules dans du milieu ou du PBS induit les mêmes effets antitumoraux, suggérant que l'effet antitumoral du plasma n'est pas lié à une dégradation du milieu de culture par les ROS (données non présentées). De plus, les espèces générées dans le milieu apparaissent relativement stables, le milieu traité continuant à conserver une activité antitumorale identique jusqu'à plusieurs jours après traitement. Une étude similaire a mis en évidence que le PBS traité de manière indirecte (le PBS est traité puis est mis au contact des cellules) n'induit pas d'effet antitumoral, ce qui suggère que les espèces générées ne sont pas stables dans une solution non organique [221] et que les composants organiques présents dans le milieu de culture comme les acides aminés et les protéines sont donc en partie peroxydés et participent à l'action antitumorale [315]. Afin d'évaluer les composants du milieu impliqués, le milieu « complet » a été remplacé par du milieu ne contenant que certains acides aminés. Les dommages à l'ADN sont alors proportionnels à l'efficacité de peroxydation des acides aminés dans le milieu ; la valine est

l'acide aminé entraînant le plus de dommages, tandis que la méthionine ou la sérine n'occasionne aucun dommage [221].

La peroxydation des acides aminés présents dans le milieu culture permet la stabilisation des ROS générés par le plasma. Cependant, le PBS seul induit aussi un effet anti-tumoral, ce qui laisse suggérer que, dans ce cas, il s'agit plutôt d'une action des espèces à demi-vie courte et d'une interaction de ces espèces avec les molécules présentes dans la cellule.

La génération des ROS et la peroxydation des molécules par le plasma sont à l'origine des effets anti-tumoraux observés. Les ROS sont des molécules décrites dans la littérature pour induire de nombreux effets biologiques. Le traitement par plasma permet ainsi de déposer au contact des cellules traitées une quantité importante de RS et c'est par la génération des ROS que l'on peut expliquer le rôle paradoxal du plasma.

Les ROS, comme le plasma à faibles doses, contribuent à la prolifération cellulaire alors que des doses plus élevées peuvent induire l'apoptose des cellules [127]. En effet, le plasma froid utilisé à faibles doses permet la stimulation de la prolifération de cellules endothéliales. Cette prolifération cellulaire est liée à une sécrétion de FGF par les cellules dans l'heure suivant le traitement par plasma [285]. Le rôle des ROS a clairement été mis en évidence dans cet effet.

A plus fortes doses, les ROS sont connus pour induire l'apoptose à la fois *in vitro* mais également *in vivo* sur diverses lignées cellulaires [122]. Ces ROS, particulièrement oxydants, vont induire un nombre important de cassures de l'ADN provoquant un arrêt du cycle cellulaire [137]. En parallèle, les ROS vont provoquer une perméabilité transitoire des pores mitochondriaux, ce qui permet le relargage des facteurs pro apoptotiques [122, 139]. L'ensemble des données sur les conséquences des ROS est concordant avec les données concernant l'effet du plasma froid sur les cellules. La littérature sur les effets des ROS sur les cellules est riche, ce qui permet d'obtenir des bases sur les propriétés des plasmas, en gardant à l'esprit que les ROS générés mais également les autres paramètres du plasma présents peuvent induire des effets particuliers propres aux plasmas. Les ROS peuvent induire de nombreux effets au niveau cellulaire dépendant de la dose et du type de lignée [142]. Les ROS, en plus de leurs effets sur l'ADN, ou encore l'apoptose, possèdent un rôle non négligeable sur d'autres paramètres comme le métabolisme cellulaire. Les ROS, *via* leurs rôles dans la signalisation cellulaire, sont également capables d'activer le facteur de transcription HIF-1 [134, 135]. Ce facteur joue un rôle majeur dans la régulation de l'hypoxie et dans la mise en place de l'angiogenèse. Le facteur de transcription HIF-1 est couramment suractivé après les traitements par radiothérapie et est considéré comme un facteur de

radiorésistance [316, 317]. L'activation de ce facteur par le plasma n'a pour le moment pas été étudié, ni l'impact du plasma sur le métabolisme et l'angiogenèse.

Avec ses effets antagonistes en fonction de la dose (i.e. prolifération *vs.* mort cellulaire), la dose de plasma délivrée aux cellules est une donnée importante. Comme évoqué précédemment, il n'existe pas à l'heure actuelle de normes dans l'établissement des doses de plasma, la dose délivrée et la réactivité du plasma pouvant varier de manière importante en fonction du type de source de plasma ou encore du type de gaz utilisé. Par exemple, les études spectroscopiques montrent qu'il est possible d'augmenter la quantité de ROS générée dans le plasma en mélangeant au gaz noble comme l'hélium, quelques pourcents d'oxygène, permettant ainsi d'améliorer l'efficacité antitumorale [303]. De plus, la dose n'est pas le seul paramètre à considérer, le débit de doses (i.e. la fréquence) à laquelle le plasma est appliqué pouvant également présenter un rôle non négligeable. Par exemple, il est décrit dans le cadre de la radiothérapie que le débit de dose utilisé a un impact sur la réponse, un débit de dose élevé occasionnant un nombre plus important de cassures double brin à l'ADN [318].

Dans le cadre du traitement par plasma, comme nous l'avons démontré, une même dose appliquée avec deux fréquences différentes n'occasionne pas des effets identiques sur la viabilité cellulaire. La fréquence la plus importante occasionne plus de dégâts, et ces effets ont été observés également dans le cadre de traitement dit indirect. Ces travaux n'ont été pour le moment confirmés par aucune autre équipe à notre connaissance.

Notre hypothèse est que le taux de génération des ROS n'est pas identique en fonction de la fréquence de traitement, c'est-à-dire que la génération des ROS dans le milieu est plus efficace à haute fréquence, induisant de ce fait des effets plus importants en termes de dégâts cellulaires. En effet, nous avons exclu le rôle du champ électrique ou encore des UV dans un effet antitumoral direct du plasma *in vitro*, mais cela ne veut pas dire que le champ électrique et les UV ne participent pas à la génération des ROS dans le milieu qui auront une action sur les cellules [319]. Cette hypothèse est à confirmer en réalisant un dosage des ROS générés dans le milieu après exposition au plasma.

La dose et le débit de dose vont être deux paramètres importants dans le cadre de l'application du plasma *in vivo*, la tolérance des tissus exposés conditionnant les applications potentielles du plasma. Les équipes allemandes ont d'ores et déjà réalisé des essais cliniques de l'utilisation du plasma dans le cadre du traitement d'ulcères de jambes [251]. Ces études ont mis en évidence l'inocuité du plasma à faible doses au niveau cutané. Des études réalisées

auparavant avaient également mis en évidence cette bonne tolérance chez la souris mais également chez le porc [273, 275]. Elles ont permis de définir des doses de traitement acceptables n'induisant pas de dommages tissulaires. Dans le cadre de l'utilisation de nos sources, nous avons également évalué la tolérance de la souris vis-à-vis du plasma. Aucune variation majeure du rythme respiratoire et cardiaque n'a été observée. Au niveau de la zone cutanée traitée, de faibles doses n'induisent pas d'inflammation alors que des doses excessives induisent une inflammation importante, avec une déstructuration de la peau et un recrutement important de neutrophiles dans la zone traitée. Les dommages de la peau au niveau de la zone de traitement ont également été obtenus par Fridman *et coll.* qui ont montré le même type de résultats à haute dose de plasma [217]. D'après plusieurs études, les doses de plasma induisant ces dommages sont plus élevées que les doses thérapeutiques dont nous avons besoin [217, 220]. Nos études ont montré une inflammation localisée qui n'apparaissait qu'à partir de 4 à 5 min de traitement et semble acceptable jusqu'à 8-10 min de traitement (à 200Hz).

Avec l'utilisation de souris transgénique NF- κ B - Luc et l'imagerie de BLI, nous avons mis en évidence une induction de NF- κ B dans les heures suivant le traitement dans la zone traitée. Le facteur de transcription NF- κ B permet la régulation de l'inflammation et est activé par de nombreux stimuli comme les UV ou encore la radiothérapie [11]. De manière non surprenante, dans nos études, il est également activé après traitement au plasma. L'activation de ce facteur est décrite pour conduire à l'expression d'un nombre important de gènes impliqués dans l'inflammation comme le TNF ou encore l'interleukine 6 [320]. Avec l'activation de ce gène, de nombreuses modifications dans la signalisation cellulaire vont intervenir avec le traitement. Les mécanismes à l'origine de cette activation après plasma ne sont pas encore élucidés mais les ROS, tout comme les UV ou encore le champ électrique peuvent être à l'origine de cet effet. En effet, les ROS sont des modulateurs puissants de l'activation du facteur de transcription NF- κ B [321], ils sont très oxydants et peuvent provoquer la mort des cellules par apoptose ou nécrose.

L'induction de NF- κ B par les ROS repose sur différents mécanismes. Les ROS peuvent activer la protéine IKK qui va alors phosphoryler la protéine I κ B qui séquestre le facteur de transcription NF- κ B dans le cytoplasme [321]. Après phosphorylation, I κ B libère ainsi NF- κ B qui pourra alors induire la transcription des gènes cibles. Un autre mécanisme repose sur une phosphorylation directe de I κ B par les ROS [321].

NF- κ B est un facteur de transcription possédant différents rôles en fonction de la situation dans laquelle se trouvent les cellules [322]. En général, l'activation de NF- κ B est liée à la promotion de la survie cellulaire mais dans certains cas, NF- κ B contribue à l'induction de la mort cellulaire [322]. La manière dont NF- κ B va lutter contre le stress oxydant est l'activation de la transcription d'un certain nombre de gènes cibles impliqués dans la détoxification des ROS, comme par exemple, la manganèse superoxyde dismutase ou encore la glutathion S transférase, l'augmentation de l'ensemble de ces enzymes permettant la diminution de la quantité de ROS intracellulaires [321].

Afin de diminuer le temps de traitement total qui est de l'ordre de 6 min, nous avons évalué l'effet d'une dose similaire mais appliquée avec un débit de dose plus élevé. Ainsi, nous avons réduit le traitement à une durée inférieure à la minute. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation du débit de dose est extrêmement dommageable. En effet, la dose appliquée à 2000 Hz provoque dans les jours qui suivent le traitement, une nécrose tissulaire très importante qui a nécessité le sacrifice des souris. Le suivi de l'activation de NF- κ B a révélé une induction moins élevée du facteur avec un traitement à fréquence élevée, ce qui montre la limite de ce type d'imagerie. En effet, il est clair que l'inflammation et les dégâts produits sont bien plus élevés mais le facteur de transcription ne permet plus de les révéler.

L'imagerie de BLI reposant sur une activité cellulaire qui met en œuvre une activité transcriptionnelle, ainsi que l'utilisation d'ATP et d'oxygène, ces processus peuvent être affectés par un traitement à fréquence importante et ne pas permettre l'émission de BLI. De plus, par analogie aux résultats de l'effet du débit de dose sur les cellules tumorales *in vitro*, une mort cellulaire par nécrose peut intervenir plus rapidement, empêchant tout processus inflammatoire dans la zone traitée.

Dans le cadre de l'utilisation du plasma froid comme nouvel agent antitumoral, les effets secondaires aux tissus adjacents constituent un paramètre important. Tout d'abord, nous avons observé une inflammation localisée dans la zone de traitement ce qui nous permet d'envisager que lors d'un traitement de tumeurs, le plasma étant appliqué de manière localisée sur la tumeur, les tissus adjacents ne seront que peu touchés et, si c'était le cas il s'agirait de doses moins élevées que celle directement adressées à la tumeur. Avec l'ensemble des données obtenues *in vitro*, il apparaît que les plasmas font intervenir une génération de ROS

au contact de la zone à traiter. Les ROS vont alors oxyder les cellules et provoquer les dégâts intracellulaires décrits préalablement. Les cellules normales et les cellules tumorales ne possèdent pas la même sensibilité intrinsèque aux ROS [138]. La prolifération rapide des cellules tumorales les rendent plus sensibles aux agents ciblant l'ADN que les cellules normales qui se trouvent majoritairement en phase de quiescence G0. Par exemple, dans le cadre de la radiothérapie, la sensibilité aux radiations selon les différentes phases du cycle cellulaire ne sont pas les mêmes. Les cellules en phase S sont plus résistantes aux radiations, leur ADN étant moins exposé. La phase la plus radiosensible est la phase G2/M [115], phase dans laquelle ne se situent pas les cellules normales.

De plus, le niveau basal de ROS dans les cellules normales est beaucoup plus faible que le niveau de ROS présent dans les cellules tumorales [323]. Ainsi, l'apport d'une même quantité de ROS aux cellules va permettre aux cellules tumorales de franchir la limite au delà de laquelle la concentration en ROS devient létale alors que pour les cellules normales, cette limite n'est pas atteinte [122]. Ce phénomène est détaillé sur la figure 94. Par ailleurs, il apparaît que le niveau d'expression basale des enzymes de détoxification ne soit pas corrélé à la sensibilité des cellules aux ROS [324], ce qui signifie que ce paramètre semble à exclure dans le cadre de la différence de sensibilité observée entre nos différentes lignées.

Quelques études ont évalué la sensibilité de cellules tumorales par rapport à des cellules normales en utilisant la même source plasma et des doses similaires de plasma. Kim *et coll.* ont comparé la sensibilité de cellules de mélanome B16 par rapport à des fibroblastes (CL.7). Avec une même dose de plasma, les cellules tumorales apparaissent plus sensibles au traitement et une induction d'apoptose plus importante est observée dans les cellules tumorales [325]. Une autre étude a comparé la sensibilité du plasma envers des cellules de mélanomes B16, des cellules de cancer colorectal (COLO320DM) et des macrophages (RAW 264.7) [296]. Des résultats similaires à l'étude précédente mettent en évidence une induction d'apoptose 30 % plus importante dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales. L'ensemble de ces données semble corrélé aux différentiels de l'effet des ROS sur les différents types cellulaires et met en lumière l'intérêt du plasma comme nouvel agent antitumoral présentant des effets secondaires potentiellement réduits.

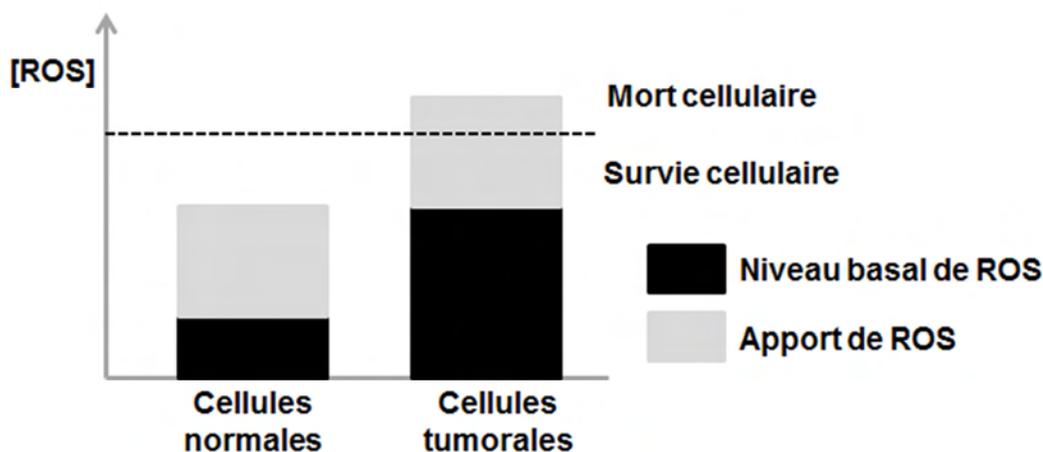


Figure 94 : Sensibilité des cellules aux ROS. Adapté de [122].

Compte tenu de la bonne tolérance du plasma dans les conditions d'application, nous avons réalisé l'évaluation de l'activité antitumorale du plasma *in vivo*. Nos publications sont les premières à décrire un effet antitumoral du plasma dans le cadre de l'étude de l'activité chez le petit animal. Depuis, deux autres publications ont rapporté des résultats similaires [326, 327].

Dans le cadre de nos études, nous avons choisi comme modèle animal la souris qui est la référence en oncologie. En première approche, nous avons évalué l'activité antitumorale du plasma sur un modèle sous cutané de glioblastome (U87-MG). Ce modèle de glioblastome humain présente plusieurs avantages dans le cadre de nos études dont :

- Une croissance rapide
- Une forme sphérique
- Une grande chimio et radiorésistance

De plus, cette lignée a été préalablement transfectée avec le gène de la luciférase ce qui permet un suivi de l'activité tumorale par imagerie de bioluminescence. L'imagerie de BLI réalisée en parallèle du suivi du volume tumoral par mesure au pied à coulisse permet d'obtenir des informations complémentaires aux volumes tumoraux bruts, comme l'activité des cellules et permet d'appréhender un effet au niveau tumoral avant d'observer un effet sur le volume.

La durée du traitement des tumeurs a été définie à partir des études de tolérance et un traitement d'une durée de 6 min a été réalisé. Ce temps de traitement a été fractionné en trois

séquences de 2 min afin de limiter l'augmentation de température observée au niveau cutané. En effet, bien que le plasma soit froid, une augmentation de la température de l'ordre de 3 à 4 °C intervient durant le traitement, la température revenant à la normale dans les secondes suivant l'arrêt du traitement. Le traitement appliqué en 3 fois permet d'avoir un traitement limitant l'exposition des tissus à une température élevée bien que modeste, mais permet également d'avoir un traitement d'une durée raisonnable pour laisser aux tissus un temps d'adaptation. Keidar *et coll.* a également évalué l'augmentation de la température sous cutanée durant un traitement de 2 min avec un plasma jet et a observé une augmentation de la température de 2°C [326].

La première fraction de plasma a été appliquée lorsque les tumeurs ont atteint un volume de 100 mm³ au minimum afin d'évaluer l'efficacité du plasma sur une tumeur de volume important et bien établie sur la souris. Ce paramètre est particulièrement important pour la prédictivité de la réponse observée dans un contexte de recherche translationnelle. Après une seule dose de plasma, aucun effet n'a été observé sur le volume tumoral. En revanche une augmentation du signal de BLI a été observée, associée à un arrêt des cellules en phase S. L'arrêt des cellules en phase S est concordant avec les données obtenues *in vitro*. De plus, plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'augmentation du signal de BLI traduisant une augmentation de l'activité tumorale. De manière identique à la radiothérapie ce phénomène peut être expliqué par un phénomène identique à la réoxygénation tumorale. En effet, après chaque fraction de RT, il se produit une réoxygénation tumorale qui est la conséquence directe de la réduction de la pression intra tumorale et de la normalisation de la vascularisation. Cet effet conduit à la radio sensibilisation des zones hypoxiques pour la fraction de RT suivante et finalement à la réduction de la masse tumorale qui n'intervient que plus tard [111]. L'autre hypothèse est en lien avec l'arrêt des cellules dans le cycle cellulaire, cet arrêt pourrait provoquer un « *burst* » métabolique par la mitochondrie qui est observé avant le déclenchement de l'apoptose [328] et induisant l'augmentation de la bioluminescence observée.

Bien que le plasma induise un effet au niveau tumoral dès le premier traitement, afin d'obtenir un effet antitumoral, le plasma a été appliqué tous les jours pendant cinq jours. Ce protocole de traitement a été choisi afin de se calquer sur un protocole standard de radiothérapie. Il permet dès la cinquième exposition d'obtenir un effet antitumoral important du plasma froid. Le plasma induit une stabilisation du volume tumoral et une stabilisation de la bioluminescence durant la durée du traitement suggérant un effet du plasma sur la prolifération tumorale. L'impact du plasma sur la distribution cellulaire montre un arrêt des

cellules en phase S plus marquée après 5 fractions qu'après une seule. Ces données restent cohérentes avec celles obtenues *in vitro* sur cette même lignée. Afin de vérifier que l'augmentation du nombre de cellules en phase S est liée à un blocage des cellules et non à une repopulation tumorale comme cela est observé après radiothérapie et qui est à l'origine de l'échappement aux traitements [111], nous avons réalisé un marquage de la prolifération cellulaire par Ki-67 activé. Ce marquage utilisé en pratique clinique permet de déterminer le taux de prolifération tumorale [22]. Aucune différence du marquage de Ki-67 n'est observée après plasma, ce qui signifie tout d'abord, qu'il n'y a pas de phénomène de repopulation après plasma au temps considéré. Le marqueur Ki-67 permet de détecter toutes les cellules dans le cycle excepté les cellules en phase G0, ce qui signifie dans notre cas, que l'augmentation du nombre de cellules en phase S est bien liée à un blocage des cellules dans cette phase. Ce type de blocage des cellules et cet arrêt de la prolifération est un phénomène courant dans le cadre de traitement par radiothérapie [106] mais également dans le cadre de l'utilisation de ROS *in vivo* [138].

En parallèle, l'évaluation de l'apoptose par un marquage immunohistochimique de la caspase 3 activée au sein de la tumeur a révélé une augmentation du taux d'apoptose avec le traitement par plasma. Une induction d'apoptose au sein d'une tumeur traitée par plasma est décrite ici pour la première fois et bien que cette induction soit modérée (x3), un traitement de cinq jours par radiothérapie (10 Gy) sur cette même lignée n'induit qu'un doublement de l'activité caspase-3 [174]. L'évaluation de la surface de nécrose après traitement ne montre pas de différence entre les tumeurs non traitées et traitées au plasma. Ces données suggèrent que le plasma agit au niveau de la tumeur par un blocage de la prolifération et par une induction d'apoptose sans induire de nécrose supplémentaire au sein de la tumeur.

De façon intéressante, l'apoptose observée après plasma est répartie de manière homogène au sein de la tumeur et une induction plus prononcée n'est pas observée sur le dessus de la tumeur. Ce résultat pose la question de la pénétration du plasma et des composants impliqués dans cet effet au sein de la tumeur. La mise en place d'un effet type bystander peut expliquer un tel phénomène mais sur une surface limitée seulement et pas sur l'ensemble de la tumeur d'un volume de près de 200 mm³. Les composants du plasma impliqués dans cet effet antitumoral peuvent inclure les ROS, les UV, la température ou encore le champ électrique. Contrairement aux études réalisées *in vitro*, il est beaucoup plus difficile de discriminer les composants impliqués. D'autre part, les effets observés au niveau des tumeurs avec un blocage du cycle et l'induction de l'apoptose semblent liés à des phénomènes impliquant les ROS. De plus, nous avons observé une diminution importante du

pH cutané et une augmentation du pH sous cutané, ce qui tend à indiquer que des espèces chimiques seraient impliquées dans cet effet.

Les autres composants comme les UV ou encore le champ électrique peuvent, d'après la littérature, également induire ce type d'effet [329, 330].

Dans le cas des UV, un effet antitumoral a été décrit avec la mise en place de dommages à l'ADN [329]. Cependant, dans le cas du traitement de tumeurs sous cutanées, la peau fait office de couche protectrice pour la tumeur vis-à-vis du plasma. Considérant l'épaisseur de la peau de souris (~700 µm) et la capacité de pénétration des UV à travers la peau, qui va de 2 µm à 90 µm en fonction de la longueur d'onde [331], le rôle des UV apparaît comme négligeable dans l'effet antitumoral du plasma.

L'augmentation de la température est limitée à quelques degrés durant le traitement, de plus cette augmentation n'intervient que pendant quelques minutes. L'hyperthermie est un traitement qui permet en fonction de la température de provoquer une mort cellulaire ou encore une sensibilisation des cellules à la radiothérapie via une augmentation du flux sanguin dans la tumeur [332, 333]. Ces phénomènes n'interviennent qu'à des températures supérieures à 41°C pendant de longues minutes suggérant que, dans le cas du traitement par plasma, l'effet d'une augmentation faible de la température n'a que peu d'impact.

Le champ électrique est capable de provoquer un arrêt de la prolifération cellulaire *in vivo* en bloquant la division cellulaire [334, 335]. Il est cependant difficile de comparer le champ appliqué dans ce type d'étude par rapport aux champs présents dans le plasma, mais l'effet du champ sur l'effet du plasma *in vivo* serait à étudier.

Un rôle coopératif de ces différents éléments n'est pas à exclure et pour conclure de manière définitive, sur un rôle unique des ROS dans cet effet, l'administration d'inhibiteur de ROS comme les NAC *in vivo*, permettrait de réduire ou supprimer l'effet antitumoral du plasma observé.

L'effet antitumoral du plasma *in vivo* a également été démontré sur une lignée de mélanome B16 greffée en sous cutané chez la souris [327]. Les auteurs ont évalué deux protocoles de traitement différents avec un plasma jet. Un des protocoles ne fait intervenir qu'un seul traitement d'une durée de 5s et ne provoque pas de retard de croissance tumorale. Le deuxième protocole implique un traitement tous les jours pendant 4 jours consécutifs pendant une durée de 5s et met en évidence un retard de croissance important des tumeurs traitées par rapport aux tumeurs contrôles [327]. Ce schéma d'administration est proche de celui que nous avons utilisé et qui a montré, sur la lignée U87-MG, un retard de croissance

tumorale de l'ordre de 6 jours. Ce retard de croissance se traduit dans notre cas par une augmentation de la survie des animaux de l'ordre de 60%. Ce chiffre est à comparer avec une augmentation de la survie de 200% sur cette même lignée décrite après deux semaines de traitement par radiothérapie alors que notre traitement n'est administré qu'une seule semaine [290]. Le schéma d'administration du plasma semble important pour obtenir un effet antitumoral et un seul traitement ne semble pas suffisant dans ces études pour obtenir une réponse. Dans le cadre du traitement de tumeurs facilement accessibles comme le mélanome, ce type de schéma semble en adéquation avec une pratique clinique, en revanche dans le cadre de tumeurs d'accès plus difficiles nécessitant une approche endoscopique, le nombre de fractions de traitement possibles sera limité. Par ailleurs, Keidar *et coll.* ont évalué l'efficacité du plasma sur deux types différents de tumeurs *in vivo*, une lignée de mélanome B16 et une lignée de tumeur rénale (SCaBER) [326]. Ces deux lignées tumorales ont été greffées en sous cutané chez la souris et le traitement a été administré en une seule fraction de 5 min avec un plasma jet. Dans le cas de la lignée de mélanome, un traitement unique par plasma permet une régression totale de la tumeur. Néanmoins, le volume tumoral le jour du traitement est un paramètre important à prendre en compte et est associé à la prédictivité de la réponse chez l'homme [167]. Un traitement réalisé sur des tumeurs de faible volume ($\sim 60 \text{ mm}^3$) peut engendrer de fausses réponses positives [167]. Les auteurs ont ensuite réalisé le même traitement sur des tumeurs d'un volume plus important et ont obtenu dans ce cas un retard de croissance important. Des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée de tumeur rénale, pour laquelle les souris traitées par plasma présentent une augmentation de 90% de leur survie [326]. Ce résultat obtenu avec un seul traitement est très encourageant dans le cadre du traitement de tumeurs greffées en situation hétérotopique surtout en sous cutané. En effet, la présence de la peau représente une barrière pour le plasma qui, en situation de greffe orthotopique de ce type de tumeurs, ne sera pas présente. L'efficacité du plasma pourra être plus importante et les doses administrées également, la tolérance de la peau n'étant plus une contrainte.

Keidar *et coll.* ont également évalué l'impact du plasma au niveau tumoral en réalisant une puce d'expression génique de type Illumina et ont comparé l'expression génique des tumeurs traitées ou non [326]. Cette approche globale est très intéressante et permet de visualiser rapidement les effets du plasma sur l'expression génique. Une modification de l'expression génique a été retrouvée dans les gènes associés à la signalisation cellulaire, la prolifération, l'inflammation, l'invasion et la mort cellulaire. De nombreux gènes impliqués

dans l'apoptose sont surexprimés après traitement, ce qui montre de manière indirecte que le plasma semble induire comme dans notre cas une induction d'apoptose *in vivo*. Des gènes impliqués dans le stress oxydant sont également augmentés après traitement, ce qui semble indiquer l'importance des ROS dans l'effet antitumoral du plasma *in vivo* [326]. Concernant l'effet du plasma au niveau de l'inflammation et du système immunitaire, l'effet antitumoral du plasma dans les deux études présentées précédemment a été obtenu sur une lignée tumorale murine greffée chez la souris, ce qui implique dans ce cas une possible intervention du système immunitaire dans la réponse antitumorale. L'ensemble de nos études a été réalisé chez la souris *nude* qui est immunodéficiente, ce qui implique que l'effet antitumoral observé dans notre cas ne fait pas intervenir le système immunitaire, or il apparaît par exemple dans le cas de traitement par PDT que le système immunitaire soit très important et influence la réponse antitumorale [93]. Il serait alors intéressant de comparer l'efficacité antitumorale du plasma sur une lignée tumorale murine greffée chez des souris immunocompétentes ou non afin de mettre en évidence l'implication du système immunitaire dans la réponse.

L'évaluation de l'activité antitumorale du plasma a ensuite été réalisée sur des tumeurs greffées en situation orthotopique afin de mimer au mieux l'environnement tumoral et d'objectiver un effet du plasma dans ce cadre. Comme évoqué précédemment, l'application du plasma au contact direct de la tumeur (en l'absence de la peau) devrait être bénéfique. Les cibles choisies pour cette évaluation sont les tumeurs du colon et du pancréas. Concernant les tumeurs pulmonaires, bien que la faisabilité et l'inflammation induite par le traitement au niveau pulmonaire aient été caractérisées et que le traitement soit bien supporté par la souris, l'évaluation de l'efficacité du plasma dans ce cadre n'a pas été réalisée pour le moment.

Les tumeurs du pancréas, en particulier les adénocarcinomes qui représentent plus de 80% des tumeurs du pancréas, présentent une incidence en augmentation ces dernières années correspondant à 5 000 nouveaux cas par an [336]. Le traitement de ce type de tumeur repose sur la chirurgie, lorsqu'elle est possible, accompagnée en monothérapie d'un traitement par gemcitabine. Un traitement par radiothérapie peut également être proposé [336]. La PDT peut également être proposée dans les cancers du pancréas non opérables, le traitement par PDT est alors administré par voie endoscopique [85]. Ce type tumoral est associé à une hypoxie sévère qui la rend particulièrement résistante aux différents traitements proposés donnant une survie des patients à 5 ans inférieure à 5% [336].

Dans ce cadre, nous avons évalué l'activité antitumorale du plasma froid sur un modèle de tumeurs de pancréas humain greffé chez la souris *nude*. Pour obtenir une tumeur

représentative de ce type de pathologie, les cellules ont été implantées en orthotopique, c'est-à-dire au niveau du pancréas de la souris. La réponse au traitement a été réalisée en suivant l'activité tumorale par imagerie de BLI au cours du temps, la contrainte majeure du suivi par BLI est la présence de l'hypoxie sévère qui en augmentant au cours du temps peut conduire à un défaut d'émission de photons par la tumeur.

Les résultats obtenus montrent que le plasma froid généré avec le plasma gun exerce une activité antitumorale importante sur un modèle de tumeur du pancréas implanté en situation orthotopique. Le plasma appliqué en trois fois à dix jours d'intervalle permet une stabilisation de la BLI par rapport aux tumeurs non traitées. En comparaison au traitement de référence, un antimétabolite (la gemcitabine), le plasma présente une meilleure activité que ce composé injecté à la dose de 200 mg/kg, ce qui signifie que le plasma présente une activité encourageante sur ce type de tumeur.

Dans la plupart des cas, les traitements ne sont rarement proposés seuls, une association de différentes molécules permettant d'augmenter les effets. Une nouvelle stratégie comme le plasma froid ne pourra se substituer aux traitements actuels mais pourrait être associé de manière concomitante ou non à des traitements de référence. Nous avons évalué l'efficacité de ce type d'association dans le traitement du cancer du pancréas, le plasma ayant été associé à la gemcitabine. La gemcitabine est un sensibilisant connu associé à la radiothérapie et permet d'en augmenter la réponse dans différents types tumoraux dont les tumeurs du pancréas [337, 338]. Nos données montrent un effet bénéfique de l'association plasma gemcitabine en termes de réponse tumorale, avec un traitement par gemcitabine administré 24h avant le traitement par plasma. D'autre part, aucune augmentation de la toxicité causée par cette association n'a été observée.

Les mécanismes d'action associés à cet effet n'ont pour le moment pas été étudiés. D'une manière générale, très peu d'études *in vitro* ont évalué les associations plasma – chimiothérapie. Kim *et coll.* ont rapporté un effet bénéfique de l'association du plasma avec un anticorps dirigé contre la protéine FAK [288]. Une seconde étude rapporte le bénéfice de l'association de cyclophosphamide avec le plasma *in vitro* sur un modèle de carcinome colorectal sans en détailler les mécanismes d'action [296]. L'ensemble du rationnel développé dans le cadre des associations chimioradiothérapie devrait pouvoir s'appliquer dans le contexte du plasma, même si ce point reste à vérifier. Par exemple, des thérapies ciblées dirigées contre des voies de signalisation potentiellement impliquées dans la résistance au traitement comme le facteur de transcription HIF-1 ou encore NF- κ B. Le ciblage direct de

l'ADN avec des agents alkylants pourrait également présenter une autre alternative. Par ailleurs, le plasma est capable d'induire une perméabilisation transitoire des membranes permettant la transfection de molécules d'ADN dans les cellules [282, 339], ce qui laisse espérer la possibilité de faire pénétrer plus facilement les molécules cytotoxiques au sein de la cellule.

Pour finir, l'évaluation de l'activité du plasma froid sur un modèle de carcinome colorectal a mis en évidence une activité antitumorale importante de cette stratégie. L'utilisation du plasma gun ou encore de la DBD dans le cadre du traitement de ce type tumoral implanté en situation orthotopique ne montre pas de différence majeure en termes de réponse, bien que le plasma mis en œuvre soit lui bien différent. Le traitement n'est appliqué qu'en une seule fraction au décours de l'acte chirurgical afin d'utiliser un schéma de traitement qui paraît compatible avec une utilisation clinique. Avec cette fraction unique, le plasma induit un retard de la croissance tumorale très important associé à une augmentation de la survie des animaux de 115% et à une diminution du nombre de métastases.

Compte tenu de la bonne tolérance du tissu adjacent traité vis-à-vis du plasma, une augmentation de la dose délivrée par une augmentation du débit de dose constituerait un point à aborder, tout comme une association à une chimiothérapie de référence comme l'irinotécan. De plus, l'étude mécanistique de l'effet du plasma sur ces tumeurs après un seul traitement sera un paramètre intéressant à étudier, en particulier l'effet du plasma sur l'apoptose et le cycle. A ce jour, l'étude de l'apoptose après plasma dans ces conditions a seulement été réalisée par imagerie de bioluminescence en utilisant une luciférine modifiée qui n'est active que dans les cellules en apoptose, mais aucun résultat probant n'a été obtenu. Cela est principalement lié aux problèmes rencontrés avec l'utilisation de cette ZDEVD-luciférine.

Par ailleurs, l'effet du plasma sur le nombre de métastases *in vivo* est une donnée intéressante, celles-ci étant responsables de la plupart des décès liés au cancer [23]. Nous avons ainsi évalué l'effet du plasma sur la capacité de migration des cellules HCT-116 après traitement *in vitro*. Nous avons observé avec un test de cicatrisation un effet certes significatif mais pas majeur du plasma avec une diminution de la migration cellulaire. Sur la même lignée, une autre étude a rapporté un effet beaucoup plus marqué dans l'effet anti migratoire du plasma [300, 301]. Avec une étude réalisée sur une lignée de mélanome G361 *in vitro*, les auteurs ont observé une diminution de l'expression des intégrines α et de la protéine FAK (focal adhésion kinase) après traitement au plasma, qui sont des molécules impliquées dans la capacité métastatique des cellules tumorales [295]. En effet, il est décrit que l'incapacité des

cellules à exprimer les molécules d'adhésion comme les FAK ou les intégrines est associée à la dormance de ces cellules [25]. Cette diminution est une nouvelle fois liée à la génération des ROS par le plasma induisant la diminution de la capacité d'invasion.

L'effet du plasma appliqué *in situ* sur des tumeurs colorectales apparaît donc comme particulièrement prometteur à la vue des résultats antitumoraux obtenu sur un modèle préclinique très représentatif de la situation clinique.

Conclusions et perspectives

Les stratégies thérapeutique actuellement mises en oeuvre dans la prise charge des pathologies tumorales reposent sur la chirurgie, la radiothérapie, et la chimiothérapie. Les développements et l'amélioration des traitements actuels sont basés sur les caractéristiques tumorales et visent à contrecarrer des altérations particulières, tout en tentant de limiter les effets secondaires.

Dans ce contexte, nos études réalisées dans le cadre d'une recherche dite translationnelle, ont mis en évidence que le plasma froid possède une activité antitumorale importante à la fois *in vitro* mais également pour la première fois *in vivo*. Avec deux sources plasmas différentes (DBD ou plasma gun), une activité antitumorale très importante a été mise en évidence après quelques secondes de traitements sur des lignées représentatives de glioblastome, carcinomes colorectal, pulmonaire et pancréatique *in vitro*.

Cette activité est liée à une production importante de ROS dans le milieu qui conduit à l'induction d'un certain nombre de mécanismes intracellulaires qui touchent différentes caractéristiques tumorales. Le traitement par plasma induit une diminution de la prolifération cellulaire via une induction de dommages à l'ADN, ces dommages vont conduire à un blocage des cellules dans différentes phase du cycle cellulaire et au final, induire un phénomène d'apoptose. En parallèle, la capacité de migration et d'invasion des cellules est diminuée. L'ensemble de ces effets est décrit pour être induit par les ROS avec l'implication d'un certain nombre de facteurs de signalisation comme p21 ou p53. L'évaluation de l'effet

du plasma sur d'autres caractéristiques comme l'angiogenèse et l'hypoxie ou encore les cellules souches reste à explorer.

Les doses maximales tolérées chez la souris ont été définies et ont permis d'établir un protocole de traitement pour évaluer l'efficacité antitumorale du plasma *in vivo*. Le plasma à haute doses induit une inflammation importante avec un recrutement de neutrophiles dans le tissu traité. De plus, le plasma induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui est responsable de l'induction d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'inflammation et la survie cellulaire. Les ROS possédant, a priori, un rôle majeur dans ces effets, les cellules tumorales sont plus sensibles aux traitements que les cellules normales, ce qui permet d'envisager un effet antitumoral important préservant les tissus adjacents. Sur des tumeurs sous cutanées, le plasma possède une activité antitumorale importante, avec un arrêt de la prolifération cellulaire et une induction d'apoptose dans la tumeur. Le traitement administré tous les jours pendant cinq jours permet d'obtenir un gain de survie des souris traitées de 60%. En utilisant les tumeurs cibles de notre traitement (pancréas et colon) greffées en situation orthotopique, le plasma présente une activité antitumorale très importante avec une stabilisation de la taille des tumeurs et un gain en survie des animaux.

Le type de plasma utilisé (plasma gun ou DBD) semble posséder une activité antitumorale équivalente mais ces données sont à confirmer sur d'autres lignées. De plus, les effets cellulaires entre la DBD et le plasma gun ne sont pas complètement équivalents mais cela semble être lié à la différence de doses utilisées. Par ailleurs, nos données ont montré que le débit de doses mis en œuvre pour le traitement influence de manière sensible l'effet antitumoral. Une même dose appliquée à différents débits n'induit pas les mêmes effets. Un travail important de définition des doses de plasma appliqué reste à accomplir et devra prendre en compte de nombreux paramètres parmi lesquels le débit de dose, le gaz ou encore la surface de traitement.

Les perspectives sont multiples à la vue des différents résultats obtenus. Tout d'abord, la compréhension des mécanismes d'action des plasmas froids nécessite d'être renforcée afin de confirmer l'importance des ROS, en particulier *in vivo*. Une attention toute particulière est à porter sur la pénétration de l'effet du plasma à travers les tissus, ce qui va conditionner les conditions d'application du plasma et la taille des tumeurs pouvant être traitées par ce système. D'autre part, les facteurs de sensibilité cellulaire et les facteurs de résistance au

plasma doivent être définis afin d'améliorer l'efficacité tout en caractérisant le plasma produit en le modulant pour obtenir les espèces les plus efficaces avec des gaz ou mélanges de gaz différents.

En conclusion, les éléments apportés par nos travaux montrent que l'utilisation du plasma en tant que nouvel agent antitumoral dans le traitement des tumeurs apparaît comme prometteur. De plus, le fait d'utiliser des modèles tumoraux *in vivo* représentatifs des cibles tumorales potentielles de l'application en clinique démontre une efficacité du plasma qui est prédictive par rapport à l'homme. Cette approche par plasma fibré est d'autant plus intéressante qu'elle pourra être couplée à la mise en œuvre simultanée de l'imagerie par fluorescence proche infrarouge per-opératoire à champ ouvert, ou par fibroscopie ou coelioscopie, ce qui permettra une identification plus précise des foyers tumoraux à traiter en ayant en parallèle la possibilité d'appliquer un traitement efficace avec une bonne tolérance pour les tissus adjacents.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Wong, M.L., A.H. Kaye, and C.M. Hovens, *Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes*. *J Clin Neurosci*, 2007. **14**(4): p. 301-8.
4. Futreal, P.A., et al., *A census of human cancer genes*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(3): p. 177-83.
5. Burkhart, D.L. and J. Sage, *Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(9): p. 671-82.
6. Doorbar, J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. *Clin Sci (Lond)*, 2006. **110**(5): p. 525-41.
7. Munakata, T., et al., *Hepatitis C virus induces E6AP-dependent degradation of the retinoblastoma protein*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(9): p. 1335-47.
8. Meuwissen, R., et al., *Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model*. *Cancer Cell*, 2003. **4**(3): p. 181-9.
9. Toledo, F. and G.M. Wahl, *Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(12): p. 909-23.
10. Meek, D.W., *Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?* *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(10): p. 714-23.
11. Criswell, T., et al., *Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(37): p. 5813-27.
12. Hennequin, C., L. Quero, and V. Favaudon, *[Determinants and predictive factors of tumour radiosensitivity]*. *Cancer Radiother*, 2008. **12**(1): p. 3-13.
13. Buttitta, F., et al., *p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study*. *Br J Cancer*, 1997. **75**(2): p. 230-5.
14. Lowe, S.W., et al., *p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes*. *Nature*, 1993. **362**(6423): p. 847-9.

15. Cuddihy, A.R. and R.G. Bristow, *The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no?* *Cancer Metastasis Rev*, 2004. **23**(3-4): p. 237-57.
16. Eriksen, J.G., et al., *The possible role of TP53 mutation status in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) with radiotherapy with different overall treatment times.* *Radiother Oncol*, 2005. **76**(2): p. 135-42.
17. Jain, D., et al., *Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy.* *Gynecol Oncol*, 2003. **88**(1): p. 22-8.
18. Williams, G.H. and K. Stoeber, *The cell cycle and cancer.* *J Pathol*, 2012. **226**(2): p. 352-64.
19. Hartwell, L.H. and T.A. Weinert, *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.* *Science*, 1989. **246**(4930): p. 629-34.
20. Harbour, J.W. and D.C. Dean, *The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms.* *Genes Dev*, 2000. **14**(19): p. 2393-409.
21. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer.* *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
22. Loddo, M., et al., *Cell-cycle-phase progression analysis identifies unique phenotypes of major prognostic and predictive significance in breast cancer.* *Br J Cancer*, 2009. **100**(6): p. 959-70.
23. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective.* *Cancer Res*, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
24. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* *Cell*, 2009. **139**(5): p. 871-90.
25. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.* *Cell*, 2011. **147**(2): p. 275-92.
26. Blasco, M.A., *Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging.* *EMBO J*, 2005. **24**(6): p. 1095-103.
27. Kang, S.K., et al., *Expression of telomerase extends the lifespan and enhances osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells.* *Stem Cells*, 2004. **22**(7): p. 1356-72.
28. Adams, J.M. and S. Cory, *Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential.* *Curr Opin Immunol*, 2007. **19**(5): p. 488-96.
29. Lowe, M., et al., *Caspase-mediated cleavage of syntaxin 5 and giantin accompanies inhibition of secretory traffic during apoptosis.* *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 7): p. 1139-50.

30. Johnstone, R.W., A.A. Ruefli, and S.W. Lowe, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 2002. **108**(2): p. 153-64.
31. Okada, H. and T.W. Mak, Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(8): p. 592-603.
32. Zong, W.X., et al., Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*, 2004. **18**(11): p. 1272-82.
33. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 2004. **384**(Pt 2): p. 201-32.
34. Gerl, R. and D.L. Vaux, Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(2): p. 263-70.
35. Jin, Z. and W.S. El-Deiry, Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(2): p. 139-63.
36. Folkman, J., Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, 2003. **3**(7): p. 643-51.
37. Carmeliet, P., Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 389-95.
38. Bikfalvi, A., Angiogenesis: health and disease. *Ann Oncol*, 2006. **17 Suppl 10**: p. x65-70.
39. Rankin, E.B. and A.J. Giaccia, The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(4): p. 678-85.
40. Lauzier, M.C., et al., [HIF-1 activation during tumor progression: implications and consequences]. *Bull Cancer*, 2006. **93**(4): p. 349-56.
41. Birner, P., et al., Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer*, 2001. **92**(1): p. 165-71.
42. Zagzag, D., et al., Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*, 2000. **88**(11): p. 2606-18.
43. Ravi, R., et al., Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*, 2000. **14**(1): p. 34-44.
44. Page, E.L., et al., Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem*, 2002. **277**(50): p. 48403-9.
45. Richard, D.E., et al., p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, 1999. **274**(46): p. 32631-7.

46. Goel, S., et al., Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev*, 2011. **91**(3): p. 1071-121.
47. Clarke, M.F., et al., Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 2006. **66**(19): p. 9339-44.
48. Dingli, D. and F. Michor, Successful therapy must eradicate cancer stem cells. *Stem Cells*, 2006. **24**(12): p. 2603-10.
49. Buczacki, S., R.J. Davies, and D.J. Winton, Stem cells, quiescence and rectal carcinoma: an unexplored relationship and potential therapeutic target. *Br J Cancer*, 2011. **105**(9): p. 1253-9.
50. Baumann, M., M. Krause, and R. Hill, Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(7): p. 545-54.
51. Scatena, R., et al., Cancer stem cells: the development of new cancer therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*, 2011. **11**(7): p. 875-92.
52. Chatelut, E., [Pharmacology of platinum compounds: differences between the three molecules and factors of interpatient variability]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1253-61.
53. Pourquier, P., [Alkylating agents]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1237-51.
54. Siddik, Z.H., Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003. **22**(47): p. 7265-79.
55. Lansiaux, A., [Antimetabolites]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1263-74.
56. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(5): p. 330-8.
57. Senderowicz, A.M., et al., Erlotinib/gemcitabine for first-line treatment of locally advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncology (Williston Park)*, 2007. **21**(14): p. 1696-706; discussion 1706-9, 1712, 1715.
58. Huang, P. and W. Plunkett, Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol*, 1995. **22**(4 Suppl 11): p. 19-25.
59. Plunkett, W., et al., Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potentialiation. *Semin Oncol*, 1995. **22**(4 Suppl 11): p. 3-10.
60. Sablin, M.P., et al., [Gemcitabine and pemetrexed: novel associations and mechanisms of resistance]. *Bull Cancer*, 2007. **94 Spec No Actualites**: p. S149-54.

61. Lansiaux, A. and P. Pourquier, [Molecular determinants of response to topoisomerase II inhibitors]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1299-310.
62. Pourquier, P. and A. Lansiaux, [Molecular determinants of response to topoisomerase I inhibitors]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1287-98.
63. Xu, Y. and M.A. Villalona-Calero, Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol*, 2002. **13**(12): p. 1841-51.
64. Dumontet, C., [Antitubulin agents]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1275-85.
65. Gascoigne, K.E. and S.S. Taylor, How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 15): p. 2579-85.
66. Robert, J., [Tyrosine kinase inhibitors]. *Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1321-34.
67. Sharma, S.V., D.A. Haber, and J. Settleman, Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(4): p. 241-53.
68. Carloni, S., et al., Tyrosine kinase inhibitors gefitinib, lapatinib and sorafenib induce rapid functional alterations in breast cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010. **10**(4): p. 422-31.
69. Zhou, X., et al., Gefitinib inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells via cell cycle arrest. *Anat Rec (Hoboken)*, 2009. **292**(8): p. 1122-7.
70. Rho, J.K., et al., Gefitinib circumvents hypoxia-induced drug resistance by the modulation of HIF-1alpha. *Oncol Rep*, 2009. **21**(3): p. 801-7.
71. Ferlay, J., et al., Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*, 2007. **18**(3): p. 581-92.
72. Parkin, D.M., et al., Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(2): p. 74-108.
73. Fry, W.A., J.L. Phillips, and H.R. Menck, Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report. *Cancer*, 1999. **86**(9): p. 1867-76.
74. Chang, A., Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC. *Lung Cancer*, 2011. **71**(1): p. 3-10.
75. Toyooka, S., K. Kiura, and T. Mitsudomi, EGFR mutation and response of lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, 2005. **352**(20): p. 2136; author reply 2136.
76. Kuang, Y., et al., Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(8): p. 2630-6.

77. Ducreux, M. and P. Rougier, [Adjuvant treatment of colorectal cancers]. *Gastroenterol Clin Biol*, 1994. **18**(8-9): p. 719-25.
78. Armand, J.P., et al., CPT-11 (irinotecan) in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 1995. **31A**(7-8): p. 1283-7.
79. Nordlinger, B., et al., Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet*, 2008. **371**(9617): p. 1007-16.
80. Saltz, L.B., et al., Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(12): p. 2013-9.
81. Saltz, L., et al., Phase III Trial of Cetuximab, Bevacizumab, and 5-Fluorouracil/Leucovorin vs. FOLFOX-Bevacizumab in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2011.
82. Foote, C.S., F.C. Shook, and R.B. Abakerli, Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol*, 1984. **105**: p. 36-47.
83. Dougherty, T.J., et al., Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(12): p. 889-905.
84. Agostinis, P., et al., Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(4): p. 250-81.
85. Maunoury, V., et al., La thérapie photodynamique en hépato-gastroentérologie. *Hépatogastro*, 2007. **14**(2): p. 157.
86. Pech, O., et al., Long-term results of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for superficial Barrett's cancer and high-grade intraepithelial neoplasia. *Gastrointest Endosc*, 2005. **62**(1): p. 24-30.
87. Etienne, J., et al., Photodynamic therapy with green light and m-tetrahydroxyphenyl chlorin for intramucosal adenocarcinoma and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc*, 2004. **59**(7): p. 880-9.
88. Ortner, M.E., et al., Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study. *Gastroenterology*, 2003. **125**(5): p. 1355-63.
89. Bown, S.G., et al., Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. *Gut*, 2002. **50**(4): p. 549-57.
90. Dolmans, D.E., D. Fukumura, and R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(5): p. 380-7.
91. Castano, A.P., P. Mroz, and M.R. Hamblin, Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(7): p. 535-45.

92. *Fingar, V.H., et al., The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy. Photochem Photobiol, 1993. 58(3): p. 393-9.*
93. *Korbelik, M., et al., The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. Cancer Res, 1996. 56(24): p. 5647-52.*
94. *Furnari, F.B., et al., Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev, 2007. 21(21): p. 2683-710.*
95. *Hall, E.J., ed. Radiobiology for the radiobiologist. 5th edition ed. 2000, Lippincott Williams Et Wilkins: Philadelphia.*
96. *Nakano, T., et al., Long-term results of high-dose rate intracavitary brachytherapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Cancer, 2005. 103(1): p. 92-101.*
97. *Woolsey, J., N. Miller, and D. Theodorescu, Permanent interstitial brachytherapy for prostate cancer: a current review. World J Urol, 2003. 21(4): p. 209-19.*
98. *Fieler, V.K., Side effects and quality of life in patients receiving high-dose rate brachytherapy. Oncol Nurs Forum, 1997. 24(3): p. 545-53.*
99. *Riley, M.B. and K. Byar, The rationale for and background of radioimmunotherapy: an emerging therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Semin Oncol Nurs, 2004. 20(1 Suppl 1): p. 1-7.*
100. *Harris, M.A., et al., Limited field radiotherapy for early stage, infra-diaphragmatic Hodgkin's lymphoma. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2004. 16(1): p. 53-7.*
101. *Witzig, T.E., et al., Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol, 2002. 20(15): p. 3262-9.*
102. *Perez, C.A., et al., Three-dimensional conformal therapy versus standard radiation therapy in localized carcinoma of prostate: an update. Clin Prostate Cancer, 2002. 1(2): p. 97-104.*
103. *Gerszten, P.C. and W.C. Welch, Cyberknife radiosurgery for metastatic spine tumors. Neurosurg Clin N Am, 2004. 15(4): p. 491-501.*
104. *Orecchia, R., et al., Clinical and research validity of hadrontherapy with ion beams. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. 51(2): p. 81-90.*
105. *Suit, H.D., Protons to replace photons in external beam radiation therapy? Clin Oncol (R Coll Radiol), 2003. 15(1): p. S29-31.*
106. *Turesson, I., et al., Biological response to radiation therapy. Acta Oncol, 2003. 42(2): p. 92-106.*

107. Branzei, D. and M. Foiani, Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(4): p. 297-308.
108. Seiwert, T.Y., J.K. Salama, and E.E. Vokes, The concurrent chemoradiation paradigm--general principles. *Nat Clin Pract Oncol*, 2007. **4**(2): p. 86-100.
109. d'Adda di Fagagna, F., Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(7): p. 512-22.
110. Yeoh, A., et al., Radiation therapy-induced mucositis: relationships between fractionated radiation, NF-kappaB, COX-1, and COX-2. *Cancer Treat Rev*, 2006. **32**(8): p. 645-51.
111. Pajonk, F., E. Vlashi, and W.H. McBride, Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells*, 2010. **28**(4): p. 639-48.
112. Kufe, D. and R. Weichselbaum, Radiation therapy: activation for gene transcription and the development of genetic radiotherapy-therapeutic strategies in oncology. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(4): p. 326-9.
113. Prise, K.M. and J.M. O'Sullivan, Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(5): p. 351-60.
114. Rzeszowska-Wolny, J., W.M. Przybyszewski, and M. Widel, Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy. *Eur J Pharmacol*, 2009. **625**(1-3): p. 156-64.
115. Pawlik, T.M. and K. Keyomarsi, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004. **59**(4): p. 928-42.
116. Favaudon, V., [Radiobiology]. *Cancer Radiother*, 2000. **4**(5): p. 333.
117. Hennequin, C., et al., [Radio-chemotherapy combinations: from biology to clinics]. *Bull Cancer*, 1994. **81**(12): p. 1005-13.
118. Deutsch, E. and F. Huguet, [Perspectives in biological modulation of radiotherapy]. *Bull Cancer*, 2005. **92**(1): p. 90-6.
119. Halatsch, M.E., et al., Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev*, 2006. **32**(2): p. 74-89.
120. Barker, F.G., 2nd, et al., EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001. **51**(2): p. 410-8.
121. Moeller, B.J., R.A. Richardson, and M.W. Dewhirst, Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 241-8.

122. Lopez-Lazaro, M., *Dual role of hydrogen peroxide in cancer: possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. Cancer Lett*, 2007. **252**(1): p. 1-8.
123. Fruehauf, J.P. and F.L. Meyskens, Jr., *Reactive oxygen species: a breath of life or death? Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 789-94.
124. Inoue, M., et al., *Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Curr Med Chem*, 2003. **10**(23): p. 2495-505.
125. Fang, J., H. Nakamura, and A.K. Iyer, *Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. J Drug Target*, 2007. **15**(7-8): p. 475-86.
126. Guyton, K.Z. and T.W. Kensler, *Oxidative mechanisms in carcinogenesis. Br Med Bull*, 1993. **49**(3): p. 523-44.
127. Dreher, D. and A.F. Junod, *Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur J Cancer*, 1996. **32A**(1): p. 30-8.
128. Imlay, J.A., S.M. Chin, and S. Linn, *Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. Science*, 1988. **240**(4852): p. 640-2.
129. Imlay, J.A. and S. Linn, *DNA damage and oxygen radical toxicity. Science*, 1988. **240**(4857): p. 1302-9.
130. Burdon, R.H., *Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radic Biol Med*, 1995. **18**(4): p. 775-94.
131. del Bello, B., et al., *Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. FASEB J*, 1999. **13**(1): p. 69-79.
132. Arbiser, J.L., et al., *Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(2): p. 715-20.
133. Nishikawa, M., et al., *Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. Clin Exp Metastasis*, 2004. **21**(3): p. 213-21.
134. Chandel, N.S., et al., *Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. J Biol Chem*, 2000. **275**(33): p. 25130-8.
135. Haddad, J.J. and S.C. Land, *A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. FEBS Lett*, 2001. **505**(2): p. 269-74.
136. Benhar, M., D. Engelberg, and A. Levitzki, *ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. EMBO Rep*, 2002. **3**(5): p. 420-5.

137. Cantoni, O. and P. Giacomoni, *The role of DNA damage in the cytotoxic response to hydrogen peroxide/histidine*. *Gen Pharmacol*, 1997. **29**(4): p. 513-6.
138. Barnouin, K., et al., *H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(16): p. 13761-70.
139. Brenner, C. and S. Grimm, *The permeability transition pore complex in cancer cell death*. *Oncogene*, 2006. **25**(34): p. 4744-56.
140. Kaibara, M. and E. Fukada, *The influence of the concentration of thrombin on the dynamic viscoelasticity of clotting blood and fibrinogen-thrombin systems*. *Biorheology*, 1971. **8**(3): p. 139-47.
141. Mealey, J., Jr., *Response of Tumor-Bearing Rats to Regional Arterial Infusion of Vinblastine (Nsc-49842) and Hydrogen Peroxide (Nsc-19892)*. *Preliminary Report. Cancer Chemother Rep*, 1965. **45**: p. 35-40.
142. Fang, J., T. Seki, and H. Maeda, *Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009. **61**(4): p. 290-302.
143. Yuan, Z., et al., *Reactive nitrogen species block cell cycle re-entry through sustained production of hydrogen peroxide*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **28**(6): p. 705-12.
144. Lechner, M., P. Lirk, and J. Rieder, *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin*. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(4): p. 277-89.
145. Takimoto, C.H., *Why drugs fail: of mice and men revisited*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(2): p. 229-30.
146. Boehm, T., et al., *Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance*. *Nature*, 1997. **390**(6658): p. 404-7.
147. Twombly, R., *First clinical trials of endostatin yield lukewarm results*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(20): p. 1520-1.
148. Kerbel, R.S., *Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved*. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(4 Suppl 1): p. S134-9.
149. Hansen, K. and C. Khanna, *Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(6): p. 858-80.
150. Tuveson, D.A. and T. Jacks, *Technologically advanced cancer modeling in mice*. *Curr Opin Genet Dev*, 2002. **12**(1): p. 105-10.
151. Rofstad, E.K., *Local tumor control following single dose irradiation of human melanoma xenografts: relationship to cellular radiosensitivity and influence of an immune response by the athymic mouse*. *Cancer Res*, 1989. **49**(12): p. 3163-7.

152. Taghian, A.G. and H.D. Suit, *Animal systems for translational research in radiation oncology. Acta Oncol*, 1999. **38**(7): p. 829-38.
153. Taghian, A., et al., *Quantitative comparison between the transplantability of human and murine tumors into the brain of NCr/Sed-nu/nu nude and severe combined immunodeficient mice. Cancer Res*, 1993. **53**(20): p. 5018-21.
154. Bosma, G.C., R.P. Custer, and M.J. Bosma, *A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature*, 1983. **301**(5900): p. 527-30.
155. Pearson, T., D.L. Greiner, and L.D. Shultz, *Humanized SCID mouse models for biomedical research. Curr Top Microbiol Immunol*, 2008. **324**: p. 25-51.
156. Frese, K.K. and D.A. Tuveson, *Maximizing mouse cancer models. Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(9): p. 645-58.
157. Vrignaud, P., *[Preclinical models in oncology]. Bull Cancer*, 2011. **98**(11): p. 1355-61.
158. Kelland, L.R., *Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. Eur J Cancer*, 2004. **40**(6): p. 827-36.
159. Zips, D., H.D. Thames, and M. Baumann, *New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. In Vivo*, 2005. **19**(1): p. 1-7.
160. Harari, P.M., *Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer*, 2004. **11**(4): p. 689-708.
161. Balko, J.M. and E.P. Black, *A gene expression predictor of response to EGFR-targeted therapy stratifies progression-free survival to cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 145.
162. Paez, J.G., et al., *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science*, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
163. Hoffman, R.M., *Orthotopic transplant mouse models with green fluorescent protein-expressing cancer cells to visualize metastasis and angiogenesis. Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(3): p. 271-7.
164. Fidler, I.J., et al., *Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. Cancer Metastasis Rev*, 1994. **13**(2): p. 209-22.
165. Teicher, B.A., *Tumor models for efficacy determination. Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(10): p. 2435-43.
166. Cowen, S.E., M.C. Bibby, and J.A. Double, *Characterisation of the vasculature within a murine adenocarcinoma growing in different sites to evaluate the potential of vascular therapies. Acta Oncol*, 1995. **34**(3): p. 357-60.

167. Teicher, B.A., et al., Acute in vivo resistance in high-dose therapy. *Clinical Cancer Research*, 1998. **4**(2): p. 483-491.
168. Inaba, M., et al., Pharmacokinetic approach to rational therapeutic doses for human tumor-bearing nude mice. *Jpn J Cancer Res*, 1988. **79**(4): p. 509-16.
169. Inaba, M., et al., Evaluation of antitumor activity in a human breast tumor/nude mouse model with a special emphasis on treatment dose. *Cancer*, 1989. **64**(8): p. 1577-82.
170. Inaba, M., et al., Responsiveness of human gastric tumors implanted in nude mice to clinically equivalent doses of various antitumor agents. *Jpn J Cancer Res*, 1988. **79**(4): p. 517-22.
171. Tashiro, T., et al., Responsiveness of human lung cancer/nude mouse to antitumor agents in a model using clinically equivalent doses. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989. **24**(3): p. 187-92.
172. Peterson, J.K. and P.J. Houghton, Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(6): p. 837-44.
173. Tsai, M.H., et al., Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation. *Cancer Res*, 2007. **67**(8): p. 3845-52.
174. Labussiere, M., et al., Radiosensitizing properties of bortezomib depend on therapeutic schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **79**(3): p. 892-900.
175. Reynolds, C.P., et al., Assessing growth and response to therapy in murine tumor models. *Methods Mol Med*, 2005. **111**: p. 335-50.
176. Beck-Bornholdt, H.P., F. Wurschmidt, and H. Vogler, Net growth delay: a novel parameter derived from tumor growth curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1987. **13**(5): p. 773-7.
177. Fiebig, H.H., A. Maier, and A.M. Burger, Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(6): p. 802-20.
178. Kagadis, G.C., et al., In vivo small animal imaging: current status and future prospects. *Med Phys*, 2010. **37**(12): p. 6421-42.
179. Edinger, M., et al., Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(16): p. 2128-36.
180. Hoffman, R.M., Imaging cancer dynamics in vivo at the tumor and cellular level with fluorescent proteins. *Clin Exp Metastasis*, 2009. **26**(4): p. 345-55.
181. Hilderbrand, S.A. and R. Weissleder, Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol*, 2010. **14**(1): p. 71-9.

182. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging*. *Curr Opin Chem Biol*, 2003. **7**(5): p. 626-34.
183. Khullar, O., et al., *Image-guided sentinel lymph node mapping and nanotechnology-based nodal treatment in lung cancer using invisible near-infrared fluorescent light*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. **21**(4): p. 309-15.
184. Tanaka, E., et al., *Real-time intraoperative ureteral guidance using invisible near-infrared fluorescence*. *J Urol*, 2007. **178**(5): p. 2197-202.
185. Hoffman, M.S. and D.C. Bodurka, *Surgical education and training program development for gynecologic oncology: American perspective*. *Gynecol Oncol*, 2009. **114**(2 Suppl): p. S47-51.
186. Anidjar, M., et al., *Refining the orthotopic dog prostate cancer (DPC)-1 model to better bridge the gap between rodents and men*. *Prostate*, 2011.
187. Rodrigues, A., et al., *Multicentric squamous cell carcinoma in situ associated with papillomavirus in a ferret*. *Vet Pathol*, 2010. **47**(5): p. 964-8.
188. Bhaumik, S. and S.S. Gambhir, *Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 377-82.
189. Bhaumik, S., X.Z. Lewis, and S.S. Gambhir, *Optical imaging of Renilla luciferase, synthetic Renilla luciferase, and firefly luciferase reporter gene expression in living mice*. *J Biomed Opt*, 2004. **9**(3): p. 578-86.
190. Sato, A., B. Klaunberg, and R. Tolwani, *In vivo bioluminescence imaging*. *Comp Med*, 2004. **54**(6): p. 631-4.
191. Jenkins, D.E., et al., *Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis*. *Clin Exp Metastasis*, 2003. **20**(8): p. 733-44.
192. Ryan, P.L., et al., *Photonic monitoring in real time of vascular endothelial growth factor receptor 2 gene expression under relaxin-induced conditions in a novel murine wound model*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1041**: p. 398-414.
193. Kielland, A. and H. Carlsen, *Molecular imaging of transcriptional regulation during inflammation*. *J Inflamm (Lond)*, 2010. **7**: p. 20.
194. Habraken, Y. and J. Piette, *NF-kappaB activation by double-strand breaks*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(9): p. 1132-41.
195. Magne, N., et al., *[Biomodulation of transcriptional factor NF-kappa B by ionizing radiation]*. *Cancer Radiother.*, 2004. **8**(5): p. 315-21.

196. Karin, M., et al., *NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(4): p. 301-10.
197. Ahmed, K.M. and J.J. Li, *NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **44**(1): p. 1-13.
198. Ansaldi, D., et al., *Imaging pulmonary NF-kappaB activation and therapeutic effects of MLN120B and TDZD-8*. *PLoS One*, 2011. **6**(9): p. e25093.
199. Carlsen, H., et al., *In vivo imaging of NF-kappa B activity*. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1441-6.
200. Dothager, R.S., et al., *Advances in bioluminescence imaging of live animal models*. *Curr Opin Biotechnol*, 2009. **20**(1): p. 45-53.
201. Sadikot, R.T. and T.S. Blackwell, *Bioluminescence imaging*. *Proc Am Thorac Soc*, 2005. **2**(6): p. 537-40, 511-2.
202. Zhang, N., et al., *An inducible nitric oxide synthase-luciferase reporter system for in vivo testing of anti-inflammatory compounds in transgenic mice*. *J Immunol*, 2003. **170**(12): p. 6307-19.
203. Roda, A., et al., *Bioluminescence and chemiluminescence in drug screening*. *Anal Bioanal Chem*, 2003. **377**(5): p. 826-33.
204. Zhang, L., K.E. Hellstrom, and L. Chen, *Luciferase activity as a marker of tumor burden and as an indicator of tumor response to antineoplastic therapy in vivo*. *Clin Exp Metastasis*, 1994. **12**(2): p. 87-92.
205. Sweeney, T.J., et al., *Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(21): p. 12044-9.
206. Klerk, C.P., et al., *Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals*. *Biotechniques*, 2007. **43**(1 Suppl): p. 7-13, 30.
207. Wetterwald, A., et al., *Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(3): p. 1143-53.
208. Green, A.M. and N.D. Steinmetz, *Monitoring apoptosis in real time*. *Cancer J*, 2002. **8**(2): p. 82-92.
209. Schellenberger, E.A., et al., *Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy*. *Neoplasia*, 2003. **5**(3): p. 187-92.
210. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
211. Scabini, M., et al., *In vivo imaging of early stage apoptosis by measuring real-time caspase-3/7 activation*. *Apoptosis*, 2011. **16**(2): p. 198-207.

212. Liu, J.J., et al., *Bioluminescent imaging of TRAIL-induced apoptosis through detection of caspase activation following cleavage of DEVD-aminoluciferin. Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(8): p. 885-92.
213. Hickson, J., et al., *Noninvasive molecular imaging of apoptosis in vivo using a modified firefly luciferase substrate, Z-DEVD-aminoluciferin. Cell Death Differ*, 2010. **17**(6): p. 1003-10.
214. Pesnel, S., et al., *Quantitation in Bioluminescence Imaging by Correction of Tissue Absorption for Experimental Oncology. Mol Imaging Biol*, 2010.
215. Compton, K.T., *Electrical discharges in gases Part I. Survey of fundamental processes. Reviews of Modern Physics*, 1930. **2**(2): p. 0123-0242.
216. Zenker, M., *Argon plasma coagulation. GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 2008. **3**(1): p. Doc15.
217. Fridman, G., et al., *Applied plasma medicine. Plasma Processes and Polymers*, 2008. **5**(6): p. 503-533.
218. Heinlin, J., et al., *Plasma medicine: possible applications in dermatology. J Dtsch Dermatol Ges*, 2010. **8**(12): p. 968-76.
219. Fridman, A., A. Chirokov, and A. Gutsol, *Non-thermal atmospheric pressure discharges. Journal of Physics D-Applied Physics*, 2005. **38**(2): p. R1-R24.
220. Kong, M.G., et al., *Plasma medicine: an introductory review. New journal of physics*, 2009. **11**.
221. Kalghatgi, S., et al., *Effects of non-thermal plasma on Mammalian cells. PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16270.
222. Ayan, H., et al., *Heating Effect of Dielectric Barrier Discharges for Direct Medical Treatment. Ieee Transactions on Plasma Science*, 2009. **37**(1): p. 113-120.
223. Fridman, G., et al., *Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in Melanoma skin cancer cell lines. Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2007. **27**(2): p. 163-176.
224. Weltmann, K.D. and T. von Woedtke, *Basic requirements for plasma sources in medicine. European Physical Journal-Applied Physics*, 2011. **55**(1).
225. Karakas, E. and M. Laroussi, *Experimental studies on the plasma bullet propagation and its inhibition. Journal of Applied Physics*, 2010. **108**(6).
226. Robert, E., et al., *Experimental Study of a Compact Nanosecond Plasma Gun. Plasma processes and polymers*, 2009. **6**(12): p. 795-802.

227. J.M. Pouvesle, C.C., A. Khacef, R. Viladrosa, E. Robert, S. Dozias, Patent : Transient plasma ball generation system at long distance in INPI, CNRS, Editor 2007: FR.
228. Kalyan Chakravarthy, et al., Cold Spark Discharge Plasma Treatment of Inflammatory Bowel Disease in an Animal Model of Ulcerative Colitis. *Plasma Medicine*, 2011. **1**(1): p. 93-108.
229. Bogle, M.A., K.A. Arndt, and J.S. Dover, Evaluation of plasma skin regeneration technology in low-energy full-facial rejuvenation. *Arch Dermatol*, 2007. **143**(2): p. 168-74.
230. Stoffels, E., Gas plasmas in biology and medicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 2006. **39**(16).
231. Palenik, C.J., M.L. Adams, and C.H. Miller, Effectiveness of steam autoclaving on the contents of sharps containers. *Am J Dent*, 1990. **3**(6): p. 239-44.
232. Sheldrake, M.A., et al., Effectiveness of three types of sterilization on the contents of sharps containers. *Quintessence Int*, 1995. **26**(11): p. 771-8.
233. Bremner, J., Ethylene oxide sterilization: safety and effectiveness. *Biomed Instrum Technol*, 2008. **42**(5): p. 399-400.
234. Mendes, G.C., T.R. Brandao, and C.L. Silva, Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review. *Am J Infect Control*, 2007. **35**(9): p. 574-81.
235. Ganzer, T., Status report on ozone sterilization. *J Healthc Mater Manage*, 1992. **10**(8): p. 58-9.
236. Karlson, E.L., Ozone sterilization. *J Healthc Mater Manage*, 1989. **7**(5): p. 43-5.
237. Brace, M.L. and K.D. Plummer, Practical denture disinfection. *J Prosthet Dent*, 1993. **70**(6): p. 538-40.
238. Fraise, A.P., Disinfection in endoscopy. *Lancet*, 1995. **346**(8978): p. 787-8.
239. da Cunha Mendes, G.C., T.R. da Silva Brandao, and C.L. Miranda Silva, Ethylene oxide potential toxicity. *Expert Rev Med Devices*, 2008. **5**(3): p. 323-8.
240. Laroussi, M., Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*, 1996. **24**(3): p. 1188-1191.
241. Laroussi, M., Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: Review, analysis, and prospects. *Ieee Transactions on Plasma Science*, 2002. **30**(4): p. 1409-1415.
242. Moisan, M., et al., Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 2001. **226**(1-2): p. 1-21.

243. Soloshenko, I.A., et al., Sterilization of medical products in low-pressure glow discharges. *Plasma Physics Reports*, 2000. **26**(9): p. 792-800.
244. Lee, M.H., et al., Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *New journal of physics*, 2009. **11**.
245. Deng, X.T., J.J. Shi, and M.G. Kong, Protein destruction by a helium atmospheric pressure glow discharge: Capability and mechanisms. *Journal of Applied Physics*, 2007. **101**(7).
246. Deng, S.B., et al., Inactivation of *Escherichia coli* on almonds using nonthermal plasma. *Journal of Food Science*, 2007. **72**(2): p. M62-M66.
247. Stoffels, E., "Tissue processing" with atmospheric plasmas. *Contributions to Plasma Physics*, 2007. **47**(1-2): p. 40-48.
248. Morfill, G.E., et al., Nosocomial infections-a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New journal of physics*, 2009. **11**: p. 115019-115029.
249. Miyagi, K., P.R. Sharma, and R.D. Price, Please close this skin wound. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2011. **72**(11): p. M162-5.
250. Heinlin, J., et al., Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2011. **25**(1): p. 1-11.
251. Isbary, G., et al., A first prospective randomized controlled trial to decrease bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients. *British Journal of Dermatology*, 2010. **163**(1): p. 78-82.
252. Perni, S., et al., Probing bactericidal mechanisms induced by cold atmospheric plasmas with *Escherichia coli* mutants. *Applied Physics Letters*, 2007. **90**(7).
253. Laroussi, M., Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. *Plasma Processes and Polymers*, 2005. **2**(5): p. 391-400.
254. Sladek, R.E.J., et al., Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma. *Letters in Applied Microbiology*, 2007. **45**(3): p. 318-323.
255. Laroussi, M., J.P. Richardson, and F.C. Dobbs, Effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology. *Applied Physics Letters*, 2002. **81**(4): p. 772-774.
256. Laroussi, M., Low-Temperature Plasmas for Medicine? *Ieee Transactions on Plasma Science*, 2009. **37**(6): p. 714-725.

257. Laroussi, M. and F. Leipold, Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2004. **233**(1-3): p. 81-86.
258. Ramabhadran, T.V. and J. Jagger, Mechanism of growth delay induced in *Escherichia coli* by near ultraviolet radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1976. **73**(1): p. 59-63.
259. Laroussi, M., D.A. Mendis, and M. Rosenberg, Plasma interaction with microbes. *New Journal of Physics*, 2003. **5**: p. 10.
260. Mendis, D.A., M. Rosenberg, and F. Azam, A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*, 2000. **28**(4): p. 1304-1306.
261. Stoffels, E., Y. Sakiyama, and D.B. Graves, Cold atmospheric plasma: Charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2008. **36**(4): p. 1441-1457.
262. Campanha, M.T., E.M. Mamizuka, and A.M. Carmona-Ribeiro, Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J Lipid Res*, 1999. **40**(8): p. 1495-500.
263. Kuyyakanond, T. and L.B. Quesnel, The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett*, 1992. **79**(1-3): p. 211-5.
264. Polk, C., Biological applications of large electric fields: Some history and fundamentals. *IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE*, 2000. **28**(1): p. 6-14.
265. Henle, E.S. and S. Linn, Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 1997. **272**(31): p. 19095-8.
266. Dobrynin, D., et al., Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New journal of physics*, 2009. **11**.
267. Schwentker, A., et al., Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*, 2002. **7**(1): p. 1-10.
268. Shekhter, A.B., et al., Experimental clinical substantiation of plasma dynamic therapy of wounds with nitric oxide. *Biull Eksp Biol Med*, 1998. **126**(8): p. 210-5.
269. Shulutko, A.M., N.V. Antropova, and A. Kriuger Iu, NO-therapy in the treatment of purulent and necrotic lesions of lower extremities in diabetic patients. *Khirurgiia (Mosk)*, 2004(12): p. 43-6.
270. Manner, H., Argon plasma coagulation therapy. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008. **24**(5): p. 612-6.
271. Manner, H., et al., Second-generation argon plasma coagulation: two-center experience with 600 patients. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23**(6): p. 872-8.

272. Manner, H., et al., Colon explosion during argon plasma coagulation. *Gastrointest Endosc*, 2008. **67**(7): p. 1123-7.
273. Fridman, G., et al., Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 2006. **26**(4): p. 425-442.
274. Kalghatgi, S.U., et al., Mechanism of blood coagulation by nonthermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 2007. **35**: p. 1559-1566.
275. Dobrynin, D., et al., Live Pig Skin Tissue and Wound Toxicity of Cold Plasma Treatment. *Plasma Medicine*, 2011. **1**(1): p. 93-108.
276. Kieft, I.E., et al., Electric discharge plasmas influence attachment of cultured CHO k1 cells. *Bioelectromagnetics*, 2004. **25**(5): p. 362-368.
277. Kieft, I.E., et al., Effect of plasma needle on cultured cells. *Proceedings of SPIE*, 2004. **5483**: p. 247-251.
278. Shashurin, A., et al., Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet. *Applied Physics Letters*, 2008. **93**(18): p. 3.
279. Stoffels, E., I.E. Kieft, and R.E.J. Sladek, Superficial treatment of mammalian cells using plasma needle. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 2003. **36**(23): p. 2908-2913.
280. Stoffels, E., A.J.M. Roks, and L.E. Deelmm, Delayed effects of cold atmospheric plasma on vascular cells. *Plasma Processes and Polymers*, 2008. **5**(6): p. 599-605.
281. Yonson, S., et al., Cell treatment and surface functionalization using a miniature atmospheric pressure glow discharge plasma torch. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 2006. **39**(16): p. 3508-3513.
282. Sakai, Y., et al., A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma. *Journal of Biotechnology*, 2006. **121**(3): p. 299-308.
283. Ogawa, Y., et al., An epoch-making application of discharge plasma phenomenon to gene-transfer. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005. **92**(7): p. 865-870.
284. Kieft, I.E., M. Kurdi, and E. Stoffels. Reattachment and apoptosis after plasma-needle treatment of cultured cells. in *4th International Symposium on Nonthermal Medical/Biological Treatments Using Electromagnetic Fields and Ionized Gases*. 2005. Portland, OR: Ieee-Inst Electrical Electronics Engineers Inc.
285. Kalghatgi, S., et al., Endothelial Cell Proliferation is Enhanced by Low Dose Non-Thermal Plasma Through Fibroblast Growth Factor-2 Release. *Annals of Biomedical Engineering*, 2010. **38**(3): p. 748-757.

286. Kalghatgi, S.U., et al. *Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge Plasma Treatment of Endothelial Cells. in 30th Annual International Conference of the IEEE-Engineering-in-Medicine-and-Biology-Society. 2008. Vancouver, CANADA: Ieee.*
287. Arjunan, K.P. and A.M. Clyne, *Hydroxyl Radical and Hydrogen Peroxide are Primarily Responsible for Dielectric Barrier Discharge Plasma-Induced Angiogenesis. Plasma processes and polymers, 2011. 8(12): p. 1154-1164.*
288. Kim, G.C., et al., *Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer. Journal of Physics D-Applied Physics, 2009. 42(3): p. 5.*
289. Knapp, S., et al., *Pulmonary lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits the LPS-induced lung inflammation in vivo. J Immunol, 2006. 176(5): p. 3189-95.*
290. Labussiere, M., et al., *Interest of liposomal doxorubicin as a radiosensitizer in malignant glioma xenografts. Anticancer Drugs, 2008. 19(10): p. 991-8.*
291. Tseng, W., X. Leong, and E. Engleman, *Orthotopic mouse model of colorectal cancer. J Vis Exp, 2007(10): p. 484.*
292. Buchler, P., et al., *Tumor hypoxia correlates with metastatic tumor growth of pancreatic cancer in an orthotopic murine model. J Surg Res, 2004. 120(2): p. 295-303.*
293. Weinstein, J.L., K. Ayyanar, and M.A. Watral, *Secondary neoplasms following treatment for brain tumors. Cancer Treat Res, 2009. 150: p. 239-73.*
294. Bredell, M.G., et al., *The application and challenges of clinical PD-PDT in the head and neck region: a short review. J Photochem Photobiol B, 2010. 101(3): p. 185-90.*
295. Lee, H.J., et al., *Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma. New journal of physics, 2009. 11.*
296. Georgescu, N. and A.R. Lupu, *Tumoral and Normal Cells Treatment With High-Voltage Pulsed Cold Atmospheric Plasma Jets. IEEE Transactions on Plasma Science, 2010. 38(8): p. 1949-1955.*
297. Sensenig, R., et al., *Non-thermal Plasma Induces Apoptosis in Melanoma Cells via Production of Intracellular Reactive Oxygen Species. Ann Biomed Eng, 2010.*
298. Zhang, X.H., et al., *Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle. Applied Physics Letters, 2008. 93(2).*
299. Yan, X., et al., *On the Mechanism of Plasma Inducing Cell Apoptosis. IEEE Transactions on Plasma Science, 2010. 38(9): p. 2451-2457.*

300. Kim, C.H., et al., *Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells. J Biotechnol*, 2010.
301. Kim, C.H., et al., *Effects of atmospheric nonthermal plasma on invasion of colorectal cancer cells. Applied Physics Letters*, 2010. **96**(24).
302. Huang, J., et al., *Deactivation of A549 cancer cells in vitro by a dielectric barrier discharge plasma needle. Journal of Applied Physics*, 2011. **109**(5).
303. Kim, S.J., et al., *Induction of apoptosis in human breast cancer cells by a pulsed atmospheric pressure plasma jet. Applied Physics Letters*, 2010. **97**(2).
304. Ahn, H.J., et al., *Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals. PLoS One*, 2011. **6**(11).
305. Nurse, P., *Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature*, 1990. **344**(6266): p. 503-8.
306. Yang, K., M. Hitomi, and D.W. Stacey, *Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. Cell Div*, 2006. **1**: p. 32.
307. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
308. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky, *Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death Differ*, 2008. **15**(7): p. 1153-62.
309. Huang, X. and Z. Darzynkiewicz, *Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. Methods Mol Biol*, 2006. **314**: p. 73-80.
310. Huang, X., et al., *Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. Cell Prolif*, 2005. **38**(4): p. 223-43.
311. Ptasinska, S., et al., *DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet. Phys Chem Chem Phys*, 2010. **12**(28): p. 7779-81.
312. Evans, M.D., M. Dizdaroglu, and M.S. Cooke, *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat Res*, 2004. **567**(1): p. 1-61.
313. Stadtman, E.R., *Importance of individuality in oxidative stress and aging. Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(5): p. 597-604.
314. Kim, K., et al., *Atmospheric-pressure plasma-jet from micronozzle array and its biological effects on living cells for cancer therapy. Applied Physics Letters*, 2011. **98**(7).

315. Gebicki, S. and J.M. Gebicki, Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem J*, 1993. **289** (Pt 3): p. 743-9.
316. Harada, H., et al., Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. *Oncogene*, 2007. **26**(54): p. 7508-16.
317. Moeller, B.J., et al., Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*, 2005. **8**(2): p. 99-110.
318. Vilenchik, M.M. and A.G. Knudson, Radiation dose-rate effects, endogenous DNA damage, and signaling resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(47): p. 17874-9.
319. Zmyślony, M. and M. Pawlaczyk-Łuszczynska, Reactive Oxygen Species Produced by Physical Agents. *Comments on Toxicology*, 2003. **9**(1): p. 49.
320. Karin, M. and M. Delhase, The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 85-98.
321. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res*, 2011. **21**(1): p. 103-15.
322. Perkins, N.D. and T.D. Gilmore, Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(5): p. 759-72.
323. Szatrowski, T.P. and C.F. Nathan, Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*, 1991. **51**(3): p. 794-8.
324. Chen, Q., et al., Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(38): p. 13604-9.
325. Kim, J.Y., et al., 15 mu m-sized single-cellular-level and cell-manipulatable microplasma jet in cancer therapies. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010. **26**(2): p. 555-559.
326. Keidar, M., et al., Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br J Cancer*, 2011. **105**(9): p. 1295-301.
327. Kim, J.Y., et al., Single-Cell-Level Microplasma Cancer Therapy. *Small*, 2011. **7**(16): p. 2291-2295.
328. Feinendegen, L.E., Reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Hum Exp Toxicol*, 2002. **21**(2): p. 85-90.
329. Batista, L.F.Z., et al., How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, 2009. **681**(2-3): p. 197-208.

330. Batista, L.F.Z., et al., p53 Mutant Human Glioma Cells Are Sensitive to UV-C-Induced Apoptosis Due to Impaired Cyclobutane Pyrimidine Dimer Removal. *Molecular Cancer Research*, 2009. **7**(2): p. 237-246.
331. Anderson, R.R. and J.A. Parrish, *THE OPTICS OF HUMAN-SKIN*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1981. **77**(1): p. 13-19.
332. Hildebrandt, B., et al., *The cellular and molecular basis of hyperthermia*. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 2002. **43**(1): p. 33-56.
333. Song, C.W., et al., *Improvement of tumor oxygenation status by mild temperature hyperthermia alone or in combination with carbogen*. *Semin Oncol*, 1997. **24**(6): p. 626-32.
334. Kirson, E.D., et al., *Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(24): p. 10152-10157.
335. Kirson, E.D., et al., *Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields*. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3288-95.
336. Vincent, A., et al., *Pancreatic cancer*. *Lancet*, 2011. **378**(9791): p. 607-20.
337. Blanchard, P., F. Huguet, and T. Andre, *[Gemcitabine and digestive carcinomas]*. *Bull Cancer*, 2007. **94** *Spec No Actualites*: p. S104-15.
338. Shewach, D.S. and T.S. Lawrence, *Gemcitabine and radiosensitization in human tumor cells*. *Invest New Drugs*, 1996. **14**(3): p. 257-63.
339. Leduc, M., et al., *Cell permeabilization using a non-thermal plasma*. *New journal of physics*, 2009. **11**.

ANNEXES

Publications :

M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, J. M. Pouvesle et A. L. Pape. Les plasmas non thermiques, nouvelle stratégie thérapeutique en cancérologie ? *Médecine Sciences* 2012, 28(2): 154-156.

M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J. M. Pouvesle et A. L. Pape. ROS implication in a new antitumor strategy based on Non Thermal Plasma. *International Journal of Cancer* 2012, 130 (9): 2185-2194.

M. Vandamme, E. Robert, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape et J. M. Pouvesle. Response of human glioma U87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment. *Plasma Medicine* 2011; 1: 27-43.

M. Vandamme, E. Robert, S. Pesnel, E. Barbosa, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. Le Pape et J. M. Pouvesle. Antitumor effect of plasma irradiation on U87 glioma xenografts: preliminary results. *Plasma Processes and Polymer* 2010, 7 (3-4): 264-273.

E. Robert, E. Barbosa, S. Dozias, M. Vandamme, C. Cachoncinlle, R. Viladrosa et J. M. Pouvesle. Experimental study of a Compact Nanosecond Plasma Gun. *Plasma Processes and Polymer* 2009; 6: 795-802.

Communications :

M. Vandamme, Eric Robert, Julien Sobilo, Vanessa Sarron, Delphine Ries, Sébastien Dozias, Stéphanie Lerondel, Jean-Michel Pouvesle, Alain Le Pape. Assessment of non-thermal plasma induced inflammation using transgenic NF-kB luc mice and bioluminescence imaging. Journée thématique GDR IMAGIV « Imagerie In Vivo ». Paris, France, décembre 2011.

M. Vandamme, Eric Robert, Julien Sobilo, Vanessa Sarron, Delphine Ries, Sébastien Dozias, Stéphanie Lerondel, Jean-Michel Pouvesle, Alain Le Pape. Evaluation of antitumor activity and tolerance of non-thermal plasma using bioluminescence imaging modalities. Workshop "Apoptosis,

Angiogenesis & Hypoxia in Tumor Microenvironment: Biological aspects and Imaging”. Berder Island, France, Octobre 2011.

M. Vandamme, E. Robert, J. Sobilo, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, B. Legrain, S. Lerondel, A. Le Pape, J.M. Pouvesle. In situ application of non-thermal plasma: preliminary investigations for colorectal and lung tolerance. ISPC20 – International Symposium on Plasma Chemistry. Philadelphie, USA, juillet 2011.

M. Vandamme, E. Robert, J. Sobilo, V. Sarron, S. Dozias, B. Legrain, S. Lerondel, A. Lepape, J.M. Pouvesle. Apoptosis induction by non thermal plasma: contribution of bioluminescence imaging. Journée thématique GDR IMAGIV « Imagerie In Vivo ». Marseille, France, septembre 2010.

M. Vandamme, E. Robert, J. Sobilo, V. Sarron, S. Dozias, S. Lerondel, A. Lepape, J.M. Pouvesle. In vitro and in vivo antitumor effect of non thermal plasma. ICPM3 – 3rd International Conference on Plasma Medicine. Greifswald, Allemagne, septembre 2010.

M. Vandamme, E. Robert, S. Dozias, S. Lerondel, A. Lepape, J.M. Pouvesle. Antitumor effect of DBD based plasma treatment on U87 glioma bearing mice. Philadelphia – Orleans meeting on biomedical applications of non thermal plasmas. GREMI - Université d’Orléans, novembre 2009

M. Vandamme, E. Barbosa, E. Robert, S. Dozias, S. Lerondel, J.M. Pouvesle, A. Lepape. Gas plasma induces antitumor effect on U87 glioma cells. 3rd workshop “Targeting and Imaging of the Tumor Microenvironment”. Berder Island, France, Septembre 2009.

S. Pesnel, M. Vandamme, S. Lerondel, A. Le Pape, E. Robert, S. Dozias, E. Barbosa, J.M. Pouvesle. Antitumor effect of plasma exposure: preliminary results in a mouse model. ICPM-2, the Second International Conference on Plasma Medicine. San Antonio, USA, Mars 2009.

Communications (posters)

M. Vandamme, L. Brullé, D. Riès, E. Robert, V. Sarron, S. Dozias, S. Lerondel, J.M. Pouvesle et A. Le Pape. “Antitumor activity on colorectal and pancreatic tumors of a new strategy based on ROS generation by non-thermal plasma”. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Chicago, USA, Avril 2012 (Poster # 2839),

M. Vandamme, E. Robert, J. Sobilo, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, S.Lerondel, A. Le Pape, J.M. Pouvesle. Antitumor activity of non-thermal plasma: mechanisms analyses and preliminary approach using micro endoscopic plasma gun. IWM6 – International Workshop on Microplasmas. Paris, France, avril 2011.

M. Vandamme, L. Fauconnier, B. Ryffel, E. Robert, J.M. Pouvesle, V. Quesniaux. “Inflammatory response to cold plasma in normal skin”. ICPM3 – 3rd International Conferentce on Plasma Medicine. Greifswald, Allemagne, septembre 2010.

M. Vandamme, E. Robert, J. Sobilo, V. Sarron, S. Dozias, S. Lerondel, J.M. Pouvesle, A. Le Pape. “Plasma treatment induces apoptosis in U87 cells in vitro and in vivo”. 101st Annual Meeting of the American Association for Cancer Research. Washington, USA, Avril 2010.

Les plasmas non thermiques

Nouvelle stratégie thérapeutique en cancérologie ?

Marc Vandamme^{1,2,3}, Éric Robert³, Stéphanie Lerondel², Jean-Michel Pouvesle³, Alain Le Pape^{2,4}

Les plasmas froids

Un plasma, en physique, est un gaz ionisé obtenu par l'excitation de ce gaz via un apport d'énergie sous forme thermique, radiative ou électrique. À ce titre, il est considéré comme le 4^e état de la matière. Ce milieu présente, en général, une grande réactivité. En effet, les électrons générés entrent en collision avec les atomes et les molécules de gaz et les activent. Il se produit alors une ionisation. Le plasma contient de nombreuses charges, des radicaux, des molécules excitées, et il génère des rayonnements ultraviolets ainsi qu'un champ électrique transitoire.

Les avancées récentes réalisées dans le développement des plasmas ont conduit à la production de plasmas non thermiques, générés à pression atmosphérique et à température ambiante, au contraire des plasmas thermiques qui sont employés dans l'électro-

cautérisation, l'hémostase ou la section de tissus dont le fonctionnement repose sur l'utilisation de la chaleur. Dans le plasma non thermique, les espèces moléculaires en présence seraient à l'origine de l'activité thérapeutique et la tolérance des tissus traités serait meilleure [1]. Ainsi, le développement des plasmas froids a conduit à l'émergence d'un nouveau champ d'application, appelé « plasma médecine ».

Pour obtenir des plasmas froids, on utilise un courant électrique produit par un générateur haute tension ; celui-ci excite le gaz sélectionné et le fait passer de l'état gazeux à l'état de plasma. Cet état excité du gaz disparaît dès l'arrêt de l'apport de courant. Différentes sources peuvent être utilisées pour générer un plasma froid atmosphérique et permettre une application *in situ*. La plus courante est la décharge à barrière diélectrique

¹ Germitec SAS, 30, rue Mozart, 92110 Clichy, France ;

² CIPA TAAM (Transgénèse et archivage d'animaux modèles) UPS 44 CNRS, 3, rue de la Férollerie, 45071 Orléans Cedex ;

³ GREMI (Groupe de recherches sur l'énergétique des milieux ionisés) UMR-6606 CNRS, université d'Orléans, 14, rue d'Issoudun - BP 6744, 45067 Orléans Cedex 2, France ;

⁴ Inserm U618, université François Rabelais, Tours, France.

marc.vandamme@cns-orleans.fr

(DBD) qui permet d'exciter le gaz se situant entre le tissu à traiter et la sonde d'application (Figure 1). D'autres types de source tels que le plasma *gun* permettent la production de plasma dans des tubes capillaires par excitation d'un gaz rare (hélium ou néon) via un courant électrique. Le plasma chemine sur une distance plus ou moins longue jusqu'à la zone à traiter (Figure 1) [2]. L'ensemble du dispositif est présenté sur la Figure 2. La nature du gaz excité varie : il s'agit soit de l'air ambiant dans le cas de la DBD, soit de gaz noble (argon, hélium, néon) pour le plasma *gun*. Il est aussi possible d'utiliser des mélanges de gaz (par exemple argon avec 5 % d'oxygène), qui permettent d'adapter aux besoins les espèces excitées qui seront formées dans le plasma.

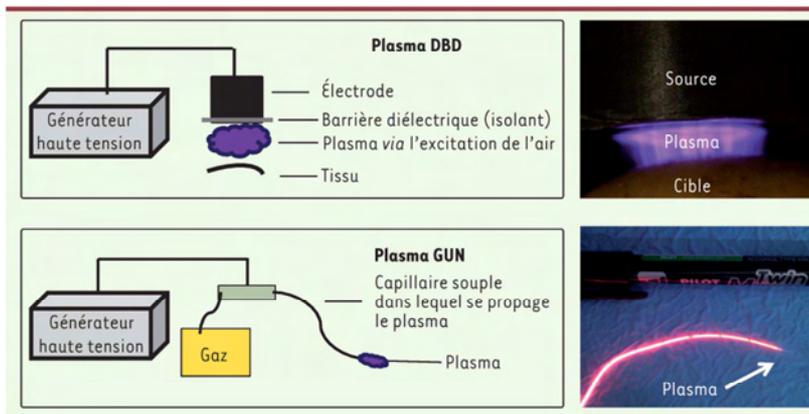


Figure 1. Les deux dispositifs de plasmas froids. En haut, un plasma froid généré par DBD (décharge à barrière diélectrique), la surface de traitement peut être adaptée en fonction de la cible. En bas, le plasma *gun* permet de générer un plasma froid à la sortie de capillaires de différents diamètres permettant d'envisager le traitement de tumeurs difficiles d'accès comme des dysplasies pulmonaires par voie endoscopique.



Figure 2. Photo de l'ensemble du dispositif plasma gun.

Applications des « plasmas médecine » en cancérologie

Actuellement, le principal champ d'application du plasma froid est la décontamination : le plasma a en effet une activité sur de nombreuses variétés de souches bactériennes et de virus [3]. La facilité d'utilisation des plasmas froids à pression atmosphérique permet d'envisager leur utilisation pour la décontamination d'instruments médicaux fragiles, mais aussi de tissus vivants¹. Des études de tolérance ont montré qu'à faibles doses (temps de traitement d'environ 1 min), le plasma ne présente aucun danger et peut être appliqué sur la peau sans induire de dommages [4]. Le pouvoir décontaminant du plasma pourrait, entre autres, être utilisé pour la décontamination des mains du personnel médical en milieu hospitalier² [5].

D'autres champs d'application sont explorés comme l'hémostase, ou encore l'amélioration de la cicatrisation. Le plasma, s'il est délivré à forte dose

(temps de traitement d'environ 5 à 6 min), est capable d'induire l'apoptose (mort cellulaire programmée) de cellules cancéreuses *in vitro* [6] et des études aux résultats prometteurs dans le domaine de la cancérologie laissent présager de l'intérêt du plasma comme nouvelle stratégie thérapeutique. Dans un article récemment publié [7], nous avons observé une activité antitumorale significative du plasma froid *in vitro* vis-à-vis de différentes lignées cellulaires cancéreuses et en particulier d'une lignée de cellules de glioblastome humain (U87-MG), très résistantes aux chimiothérapies classiques ainsi qu'à la radiothérapie. L'étude mécanistique de cet effet antitumoral montre que le principal promoteur est la génération d'espèces actives de l'oxygène (ÉAO) - principalement le H_2O_2 ou encore le O_2^- - dans la zone traitée. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de ces espèces montre une annulation des effets antitumoraux. Le plasma agit principalement sur les cellules cancéreuses en induisant des cassures dans l'ADN par l'intermédiaire de ces ÉAO. Comme dans le cas d'autres traitements anticancéreux tels que la radiothérapie, la formation de ces dommages à l'ADN induit l'arrêt de la prolifération des cellules, le cycle cellulaire étant bloqué pendant la tentative de réparation de l'ADN. Dans la plupart des cas, ces cassures sont létales pour les cellules et conduisent à une apoptose

massive ; un tel phénomène a été observé après traitement au plasma. Ces données *in vitro* ont conduit à l'évaluation de l'effet antitumoral du plasma *in vivo*, dans un modèle de greffe sous cutanée de cellules cancéreuses humaines chez la souris *nude*. Préalablement, des études de tolérance ont montré que l'exposition au plasma n'engendrait aucun effet secondaire chez la souris, ni cardiorespiratoire ni cutané [8]. Nous avons confirmé l'effet antitumoral *in vivo*, puisque le traitement quotidien des tumeurs par plasma pendant cinq jours consécutifs permet d'en réduire significativement le volume par rapport aux tumeurs non traitées. Cet effet, observable dès la fin du cycle de traitement, aboutit à une augmentation significative (environ 60 %) de la survie des animaux [9]. Cette réponse résulte en partie d'un arrêt du cycle cellulaire *in vivo* mais également d'une induction d'apoptose dans l'ensemble de la tumeur. Cette étude démontre pour la première fois le potentiel antitumoral *in vivo* des plasmas froids, même si de nombreuses questions restent à élucider : mécanismes d'action, pénétration du plasma, diffusion des ÉAO dans la zone traitée. Ces résultats très encourageants permettent d'envisager le traitement de tumeurs en utilisant un plasma « fibré ». Il est en effet possible de générer des plasmas froids à la sortie d'un tube capillaire de n'importe quel diamètre, et ainsi de pouvoir envisager une application locale, au contact direct de tumeurs particulièrement difficiles d'accès.

Cette approche thérapeutique semble d'autant plus intéressante qu'elle pourra être couplée à la mise en œuvre simultanée de l'imagerie par fluorescence dans le proche infrarouge qui va être exploitable à court terme en imagerie per-opératoire à champ ouvert, ou par fibroscopie ou cœlioscopie [10]. Elle requiert l'utilisation de « sondes intelligentes » couplées à un agent de contraste fluorescent dans le proche infrarouge, et devrait permettre de localiser des biomarqueurs tumoraux

¹ Les Allemands sont en phase I/II d'évaluation du plasma froid pour la décontamination/cicatrisation d'ulcères. Les résultats paraissent prometteurs, la charge bactérienne de la plaie étant diminuée après le traitement ; le plasma semble aussi promouvoir les processus de cicatrisation. Évidemment, il s'agit de doses inférieures à celle que l'on utilise dans le cadre des expérimentations en cancérologie.

² Un prototype est actuellement développé par une équipe américaine et est en cours d'évaluation pour la stérilisation des mains (en milieu hospitalier). Il suffit de passer ses mains quelques secondes dans un plasma pour les décontaminer. Cette approche permet un gain de temps important par rapport au lavage classique pour une efficacité importante.

(protéase du type cathepsine³, intégrines ou antigène tumoral) et donc améliorer la sensibilité et la spécificité de la détection des foyers tumoraux en guidant dans le même temps une application du plasma fibré. Le champ d'application envisagé concerne plus particulièrement les récurrences colorectales, les tumeurs intracanalaires papillaires du pancréas, les plages de dysplasie oropharyngée ou pulmonaire. Si ce plasma fibré présente effectivement un potentiel antitumoral important, il

³ Par exemple, dans le cancer du côlon, la sonde moléculaire peut être une molécule clivable par la cathepsine B surexprimée par les cellules néoplasiques des muqueuses digestives. La sonde est couplée à un fluorophore dont l'émission infrarouge à 700nm est bloquée sur la molécule intacte, mais émise lorsque la sonde est clivée dans la tumeur.

constituera peut-être dans les années à venir une nouvelle alternative dans la prise en charge de ces pathologies. ♦

Non thermal plasmas, a new strategy in oncology?

CONFLIT D'INTÉRÊTS

M. Vandamme déclare avoir des liens durables ou permanents avec l'entreprise Germitec SAS. É. Robert, S. Lerondel, J.M. Pouvesle, A. Le Pape déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Fridman G, Friedman G, Gutsol A, et al. Applied plasma medicine. *Plasma Process Polym* 2008 ; 5 : 503-33.
2. Robert E, Barbosa E, Dozias S, et al. Experimental study of a compact nanosecond plasma gun. *Plasma Process Polym* 2009 ; 6 : 795-802.
3. Laroussi M. Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art. *Plasma Process Polym* 2005 ; 2 : 391-400.
4. Dobrynin D, Wu A, Kalghatgi S, et al. Live pig skin tissue and wound toxicity of cold plasma treatment. *Plasma Medicine* 2011 ; 1 : 93-108.
5. Marfill GE, Shimizu T, Steffes B, Schmidt HU. Nosocomial infections—a new approach towards preventive medicine using plasmas. *New J Phys* 2009 ; 11 : 115019-29.
6. Fridman G, Shereshevsky A, Jost MM, et al. Floating electrode dielectric barrier discharge plasma in air promoting apoptotic behavior in melanoma skin cancer cell lines. *Plasma Chem Plasma Process* 2007 ; 27 : 163-76.
7. Vandamme M, Robert E, Lerondel S, et al. ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int J Cancer* 2011, 23 juin (online).
8. Vandamme M, Robert E, Pesnel S, et al. Antitumor effect of plasma treatment on U87 glioma xenografts: preliminary results. *Plasma Process Polym* 2010 ; 7 : 264-73.
9. Vandamme M, Robert E, Dozias S, et al. Response of human glioma U87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment. *Plasma Medicine* 2011 ; 1 : 27-43.
10. Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2003 ; 7 : 626-34.

Marc VANDAMME

LES PLASMAS FROIDS, NOUVELLE STRATEGIE THERAPEUTIQUE EN CANCEROLOGIE

Résumé :

Dans la recherche de thérapie antitumorale de plus en plus innovante, nous avons évalué un traitement local basé sur l'utilisation de plasma froid. Le plasma froid (dans ce cas, <40°C) est un gaz ionisé par un apport d'énergie. Il contient des charges (électrons, ions), des radicaux libres et des molécules excitées. Il peut être généré à l'extrémité de cathéter permettant un traitement locorégional comme le traitement de dysplasie ou encore de tumeurs non résecables. Une activité antitumorale importante du plasma a été mise en évidence *in vitro* sur diverses lignées tumorales (colorectale, pulmonaire, pancréatique et cérébrale). Par ailleurs les cellules tumorales sont plus sensibles au plasma que les cellules normales. Les ROS générés sont à l'origine des principaux mécanismes d'action du plasma. Ils induisent de nombreux dommages à l'ADN, suivi d'un arrêt du cycle cellulaire conduisant à l'apoptose des cellules. Les études de tolérance ont mis en évidence l'innocuité de faibles doses de plasma sur le tissu traité permettant de définir les doses de plasmas utilisable dans le cadre de traitements antitumoraux. En utilisant des tumeurs xénogreffées en sous cutané et l'imagerie de bioluminescence, une activité antitumorale du plasma froid a été mise en évidence pour la première fois *in vivo* avec une augmentation de la survie des souris traitées d'environ 60%. Le traitement induit un arrêt de la prolifération tumoral avec une induction d'apoptose dans l'ensemble de la tumeur sans augmenter la surface de nécrose. L'effet antitumoral a également été démontré en utilisant le plasma gun sur un modèle de tumeurs colique et pancréatique en situation orthotopique chez la souris avec une augmentation de la survie (115%) accompagné d'une diminution de la métastase. Ces résultats obtenues dans une démarche de recherche translationnelle montrent l'intérêt potentiel du plasma comme nouvel agent antitumoral.

Mots clés : cancérologie, plasmas froids, imagerie *in vivo*, traitement antitumoral, ROS.

Non Thermal Plasma, a new strategy in oncology

Summary:

In the context of new innovated antitumor treatment discovery, we evaluated the efficacy of a new local treatment based on non-thermal plasma (NTP). NTP is a cold (in this case, <40°C) ionized gas (a ir or noble gas) thanks to an electric discharge. It contains free charges (electrons, ions), free radicals and excited molecules. It can be generated at the end of a catheter allowing a local treatment that is compatible with usual endoscopes for dysplasia or non resectable tumors. We showed that NTP has a significant antitumor effect *in vitro* on various cell lines including colorectal, pancreatic, lung and brain tumor cells. The major action mechanisms of NTP was linked to a high rate generation of ROS in the vicinity of tumors cells and others plasma components have a minor implications. These ROS induce lethal DNA damages leading to a multiphase cell cycle arrest and finally to apoptosis. *In vivo*, a good tolerance of plasma treatment was highlighted and NTP treatment parameter was defined. Using subcutaneous xenografts and bioluminescence imaging, we showed a major antitumor effect of plasma *in vivo* with a 60% increase of mice life span. NTP treatments of tumor induce a tumor cell cycle arrest with a significant apoptosis induction in the whole tumor without increase of necrotic area. This *in vivo* antitumor effect was also observed with an *in situ* treatment using plasma gun of colorectal and pancreatic orthotopic tumor xenografts. A significant increase of mice lifespan (115%) was obtained together with a metastasis decrease. These results obtained in translational research showed the potential antitumor activity of NTP as a new type of treatment for cancer treatment.

Keywords : Oncology, non thermal plasma, *in vivo* imaging, antitumor treatment, ROS.



GREMI UMR 7344, Université d'Orléans
14 rue d'Issoudun, BP 6744 - 45067 ORLEANS



CIPA TAAM UPS 44, UPS44 CNRS
3B rue de la Férollerie, 45071 ORLEANS cedex



Germitec SAS, 30 rue Mozart, 92110 CLICHY

