



Liquides activés par jet de plasma froid pour le traitement sélectif du cancer colorectal : synthèse, caractérisation et essais thérapeutiques sur modèles cellulaires 3D in vitro et in vivo

Florian Judée

► To cite this version:

Florian Judée. Liquides activés par jet de plasma froid pour le traitement sélectif du cancer colorectal : synthèse, caractérisation et essais thérapeutiques sur modèles cellulaires 3D in vitro et in vivo. Plasmas. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30344 . tel-01764953

HAL Id: tel-01764953

<https://theses.hal.science/tel-01764953>

Submitted on 12 Apr 2018

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Florian JUDÉE

le lundi 14 novembre 2016

Titre :

Liquides activés par jet de plasma froid pour le traitement sélectif du cancer colorectal :
synthèse, caractérisation et essais thérapeutiques sur modèles cellulaires 3D in vitro et in vivo

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED GEET : Ingénierie des PLASMAS

Unité de recherche :

Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie (LAPLACE), UMR 5213

Directeur/trice(s) de Thèse :

N. MERBAHI, Professeur à l'Université de Toulouse, LAPLACE

G. WATTIEAUX, Maître de conférence à l'Université de Toulouse, LAPLACE

Jury :

E. ODIC	Professeur, CentraleSupélec, GeePs	Rapporteur
V. SOL	Professeur, Université de Limoges, LCSN	Rapporteur
N. Bonifaci	Chargé de recherche CNRS, G2Elab	Examineur
P. Vincendo	Directeur de recherche CNRS, IMRCP	Examineur
N. MERBAHI	Professeur, Université de Toulouse, LAPLACE	Directeur de thèse
G. WATTIEAUX	Maître de conférence, Université de Toulouse, LAPLACE	Directeur de thèse
M. Yousfi	Directeur de recherche CNRS, LAPLACE	Invité

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire Plasma et Conversion d’Energie (LAPLACE), unité mixte de recherche CNRS/Université de Toulouse 5213. Je tiens particulièrement à remercier son directeur, Monsieur le Professeur Christian Laurent de m’y avoir accueilli.

J’exprime ma très sincère reconnaissance à mes directeurs de thèse, le professeur Nofel Merbahi et maître de conférences Gaëtan Wattieaux de l’université de Toulouse, pour avoir assuré d’une manière irréprochable la direction de ce travail, et pour m’avoir transmis tant de qualités humaines et professionnelles.

À Madame la directrice de recherche à l’université de Toulouse Patricia Vicendo et Madame la chargée de recherche à l’université de Grenoble Nelly Bonifaci, j’exprime ma gratitude pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse et d’examiner ces travaux.

Je remercie vivement Messieurs Vincent Sol, Professeur à l’université de Limoges, et Emmanuel Odic, Professeur à Centrale Supélec d’avoir accepté d’être les rapporteurs de cette thèse. Je leur exprime toute ma gratitude pour l’intérêt qu’ils ont manifesté à l’égard de ce travail.

De même j’exprime une profonde reconnaissance à l’ensemble du personnel du laboratoire LAPLACE avec qui j’ai eu la chance d’interagir aussi bien pour des raisons techniques que pour des raisons administratives. Toute ma gratitude également aux différents partenaires que j’ai eu la chance de rencontrer lors de ces travaux :

- Madame le maître de conférences Marie-Pierre Castanié-Cornet et Monsieur Moïse Mansour du Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire (LMGM),
- Monsieur le professeur des universités – praticien hospitalier Bernard Ducommun, Madame le maître de conférences Valérie Lobjois, Madame Céline Frongia et Monsieur Jacques Rouquette de l’Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV),
- Madame la directrice de recherche Patricia Vicendo et Mademoiselle Alix Poinso du Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP),
- Monsieur Lionel Rechinat du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC),
- et finalement Madame la directrice de recherche Marie-Pierre Rols, Madame la chargée de recherche Muriel Golzio et Madame la chargée de recherche Laure Gibot de l’Institut

de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS).

Je ne saurais oublier mes nombreux compagnons de route : Moïse, Joseph, Julie, Zoé, Maëva, Jérémie, Hayat, Amel, Zenjebil, Guillaume et bien d'autres encore qui m'ont tant apporté durant ces trois années. Je leurs souhaite tout particulièrement une bonne réussite au diplôme, une bonne poursuite de carrière et finalement de continuer simplement à rester ce qu'ils sont humainement.

Pour finir je tiens à remercier particulièrement ma famille qui a toujours cru en moi et qui m'a tant aidé en particulier ma maman et ma sœur Coralie. Je ne peux également oublier tous mes amis qui m'ont permis sans cesse de m'échapper du monde de la recherche pour m'amuser et profiter de chaque moment. En ce sens je tiens particulièrement à remercier Ambre qui m'a permis de tenir les premières années et Louise qui m'a soutenue sans le savoir réellement durant les derniers instants de rédaction et ce jusqu'à la soutenance.

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	iii
Table des figures	vii
Liste des tableaux	xv
Introduction	1

Contexte de l'étude: La biologie du cancer et méthodes de traitement	5
---	----------

1 Physiopathologie du cancer et traitements	7
1.1 Le cancer en France	7
1.2 Caractéristiques des cellules tumorales	9
1.2.1 Développement des cellules tumorales	9
1.2.2 Caractéristiques des cellules tumorales	10
1.2.3 Définition, classification histologiques de la tumeur	17
1.3 Stratégies Thérapeutiques	17
1.3.1 La Résection	18
1.3.2 La chimiothérapie	19
1.3.3 La thérapie photodynamique	21
1.3.4 La radiothérapie	22
2 Plasmas froids à la pression atmosphérique et applications biomédicales	29
2.1 Caractéristiques des plasmas froids à la pression atmosphérique pour des applications biomédicales	29
2.2 Dispositifs générant des plasmas froids à la pression atmosphérique pour des applications biomédicales	31
2.2.1 Décharge couronne	31

2.2.2	Micro décharges à cathode creuse	32
2.2.3	Décharges à barrière diélectrique	34
2.2.4	Les jets de plasma	35
2.3	Action du plasma sur le vivant	38
2.3.1	Effet du champ électrique	39
2.3.2	Effet du rayonnement ultraviolet	40
2.3.3	Effet des espèces réactives	41
2.4	Bilan des applications biomédicales des plasmas froids	42
Matériels et méthodes		45
3	Supports biologiques et diagnostics	47
3.1	Caractéristiques des cellules	48
3.1.1	HCT 116: Cancer du colon	48
3.1.2	GM637: Fibroblaste	48
3.2	Méthode de culture	49
3.2.1	Culture cellulaire	49
3.2.2	Formation du sphéroïde pour les analyses <i>in vitro</i>	50
3.2.3	Formation des tumeurs pour les analyses <i>in vivo</i>	51
3.3	Diagnostics des sphéroïdes <i>in vitro</i>	51
3.3.1	Évaluation de l'efficacité du traitement plasma	51
3.3.2	Étape de fixation, découpe	52
3.3.3	Marquage immunofluorescent	53
3.3.4	Viabilité cellulaire	54
3.3.5	Perméabilisation cellulaire	55
3.3.6	Activation de l'apoptose	56
3.4	Diagnostics des tumeurs <i>in vivo</i>	56
3.4.1	Suivi de la croissance tumorale	56
3.4.2	Coupes histologiques	57
4	Détection et quantification des espèces générées par le plasma dans les milieux de culture	59
4.1	Diagnostic par résonance paramagnétique électronique	59
4.1.1	Effet Zeeman et interaction atome-molécule avec un champ magnétique	60
4.1.2	Spectromètre de résonance paramagnétique électronique	64
4.1.3	Analyse des spectres RPE	66
4.1.4	Méthode de piégeage d'un radical	68
4.2	Fluorométrie	70
4.2.1	Dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	71

4.3	Mesure d'absorbance pour le dosage des nitrates et nitrites	72
4.3.1	Dosage des nitrites et nitrates (NO_2/NO_3)	72
5	Caractérisation des jets de plasma froid	75
5.1	Outils de diagnostic optique	75
5.1.1	Le spectromètre	75
5.1.2	L'irradiance mètre UV-C	76
5.1.3	Caméra haute vitesse	76
5.2	Caractérisations optiques des jets de plasma	77
5.2.1	Estimation de l'irradiance UV-C	77
5.2.2	Estimation de la température apparente du jet de plasma	78
5.2.3	Température d'excitation	78
5.2.4	Densité électronique du plasma	81
5.2.5	Concentration d'oxygène atomique	82
5.2.6	Détermination de la longueur et de la vitesse de propagation du jet de plasma DBD	86
	Résultats expérimentaux	87
6	Traitements du cancer colorectal : investigation in-vitro	89
6.1	Activation du milieu par jet plasma et traitement cellulaire	90
6.2	Analyse de l'efficacité du PAM en fonction de la durée d'activation	91
6.3	Influence du temps de transfert sur les effets génotoxiques et cytotoxiques du PAM	92
6.4	Relation entre taux de dommage à l'ADN observé et temps d'activation/temps de transfert	95
6.5	Influence de la température de stockage du PAM	95
6.6	Rôle du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les dommages à l'ADN	97
6.7	Évaluation de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le PAM après traitement plasma	99
6.8	Analyse de la sélectivité PAM	103
6.9	Viabilité cellulaire	103
6.10	Identification du processus de mort cellulaire induit par le PAM	107
6.11	Effet du PAM lors d'un traitement avec un temps contact cours	110
6.12	Conclusion	112
7	Interaction entre le jet de plasma DBD hélium et le milieu de culture	115
7.1	Radical hydroxyle ($\bullet OH$) et anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)	116
7.1.1	Radical hydroxyle ($\bullet OH$)	116
7.1.2	Présence de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)	119

7.2	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	120
7.3	Oxygène singulet (1O_2)	122
7.4	Oxyde nitrique ($NO^\bullet$)	124
7.5	Nitrite/nitrate (NO_2/ NO_3)	127
7.6	Radical hydrogène ($H^\bullet$)	129
7.7	Mécanismes d'interaction PAM/cellules cancéreuses	130
7.8	Conclusion	131
 Développement et caractérisation d'un jet de plasma DBD Argon		133
8	Conception d'un jet de plasma d'argon	135
8.1	Configuration du générateur jet de plasma DBD d'argon	136
8.2	Distribution du champ électrique	138
8.3	Caractérisation électrique de la décharge	139
8.4	Caractérisation optique du jet de plasma	142
8.4.1	Identification des espèces radiatives	142
8.4.2	Analyses quantitatives basées sur l'émission du plasma	144
8.5	Longueur du jet de plasma et vitesse de la balle plasma	151
8.6	Traitement des sphéroïdes HCT 116	156
 Conclusions et perspectives		159
 Annexes		163
A	Influence de la présence de sérum de veau dans le milieu activé par plasma sur les dommages à l'ADN	165
B	Protocole de quantification de l'adenosine triphosphate dans le sphéroïde et le surnageant	167
 Bibliographie		169

Table des figures

1.1.1	Nombre de nouveaux cas de cancer par an par site de localisation chez les hommes (a) et chez les femmes (b), standardisé en âge, en France au cours de l'année 2012	24
1.1.2	Nombre de nouveaux cas de cancer colorectal par an par tranche d'âge en France au cours de l'année 2012	25
1.2.1	Les phases du cycle cellulaire d'après [1]	25
1.2.2	Mécanismes d'altérations conduisant à la cancérisation cellulaire, d'après [2]	26
1.3.1	Structures des adduits générés par l'alkylation de l'ADN (extrait de [3]).	26
1.3.2	Processus de thérapie photodynamique (extrait de [4])	26
1.3.3	Radiothérapie stéréotaxique utilisant le <i>gamma knife</i> . Direction des faisceaux d'irradiations (haut) et modulation d'intensité (bas) pour le traitement d'un paragangliome (extrait de [5])	27
2.2.1	Photographie d'une décharge corona multi-pointes pulsée au laboratoire LAPLACE. Conditions expérimentales : tension d'alimentation 8kV, durée d'impulsion 40µs, fréquence de répétition 100Hz, distance anode/cathode 8mm et rayon de courbure des pointes 25µm, 14 pointes disposées en deux rangées de 7 pointes. D'après [6]	32
2.2.2	Tension de claquage électrique dans l'air à la pression atmosphérique en fonction du gap anode/cathode séparant deux contacts métalliques de type pointe/pointe. Données expérimentales comparées à la loi de Paschen [7]	33
2.2.3	Vue en coupe d'un dispositif de micro décharge à cathode creuse . D'après [8].	34
2.2.4	Configurations classiques de décharges à barrières diélectrique extrait de [9] (a-d) et photographie d'une FE-DBD développée au laboratoire LAPLACE (e).	35
2.2.5	Schéma d'un jet DBD de plasma à basse température fonctionnant à pression atmosphérique (a) et photographie du jet de plasma avec sa protection électrique lors d'une utilisation d'hélium comme gaz porteur (b).	37
2.2.6	Schéma de principe du jet d'argon micro-onde utilisé pour le traitement de bactérie. D'après [10]	38

2.2.7	Photographie du jet de plasma micro-onde sans (a) et avec (b) refroidissement par air comprimé. Extrait de [11]	38
3.1.1	Micrographie fluorescente du cytosquelette cellulaire HCT116 : cellules cancéreuses du côlon. Distribution des microtubules (colorées en vert), des noyaux (colorés en bleu) et les micro-filaments d'actine (colorés en rouge)	49
3.1.2	Micrographie fluorescente de fibroblaste humain. Distribution des microtubules (colorées en vert), des noyaux (colorés en bleu) et les micro-filaments d'actine (colorés en rouge)	49
3.2.1	Cinétique de formation d'un sphéroïde issu de cellules cancéreuses HCT116 à 0, 1, 3 et 4 jours (a-d) après ensemencement de 1000 cellules par puits en plaque ultra Low-attachment à fond rond. D'après [12]. Échelle 500µm.	50
3.2.2	Injection sous cutanée de cellules HCT166 sur modèle murin anesthésié.	52
3.3.1	Marqueurs utilisés pour la détection de perméabilisation cellulaire obtenue par électroporation d'un sphéroïde composé de cellules cancéreuses HCT116. À gauche le marqueur Hoechst ($\lambda_{em} = 461$ nm) et à droite le marqueur iodure de propidium ($\lambda_{em} = 610$ nm). Échelle : 100 µm.	55
3.3.2	Fluorescence du substrat NucView 488 Caspase-3 d'un sphéroïde composé de cellules cancéreuses HCT116 24H après un traitement plasma. La fluorescence verte correspond à l'activité de caspase traduisant des mécanismes de mort apoptotique dans les cellules. Échelle: 100µm.	56
3.4.1	Marquage H&E d'un colon sain.	58
3.4.2	Coloration du colon au trichrome de Masson.	58
4.1.1	Éclatement des niveaux d'énergie d'une sous-couche atomique possédant un nombre quantique principal de moment angulaire total $j = 5/2$ en fonction de l'intensité du champ magnétique.	63
4.1.2	Principe général de fonctionnement d'un spectromètre RPE	66
4.1.3	Exemple de spectre RPE obtenu après exposition d'une solution de PBN au jet de plasma. La méthode permettant d'extraire les constantes de couplage est indiqué par la présence de flèches colorées.	67
4.1.4	Structure moléculaire du DMPO seul (a) et du DMPO ayant piégé le radical hydroxyde $\text{HO}^\bullet$ (b)	68
4.1.5	Structure moléculaire du PBN	69
4.1.6	Structure moléculaire du TEMP	69
4.2.1	Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène dans trois liquides.	72
4.3.1	Courbe d'étalonnage des nitrites (a) et des nitrates (b) dans trois liquides.	73
5.1.1	Rendement quantique de la photodiode UV-C d'après la documentation constructeur	76
5.2.1	Exemple de spectre d'émission d'un jet plasma d'argon	78

5.2.2	Spectre synthétique d'émission UV du radical OH (transition $A^2\Sigma, v = 0 \rightarrow X^2\Pi, v' = 0$) pour une température rotationnelle de 300 K, 650 K et 1000 K.	79
5.2.3	Calcul de l'élargissement de la raie H_β d'un plasma d'argon dans l'air à la pression atmosphérique, à une température de 800 K et une densité électronique de 10^{20} cm^{-3}	83
5.2.4	Proportion d'argon ($\bullet$) calculée à partir de la relation 5.2.16 et d'air ($\square$) le long de l'axe d'un jet Surfatron à la pression atmosphérique. $z = 0$ correspond à la sortie du tube. Conditions expérimentales : débit d'argon de 2 l/min et puissance micro-onde de 40 W.	85
5.2.5	Concentration d'oxygène atomique le long de l'axe d'un jet Surfatron à la pression atmosphérique calculée à partir de la relation 5.2.17. $z = 0$ correspond à la sortie du tube. Conditions expérimentales : débit d'argon de 2 l/min et puissance micro-onde de 40 W. On a considéré $\frac{\gamma_{852}}{\gamma_{844}} = 1$.	85
5.2.6	Imagerie grande vitesse en fausses couleurs d'un jet plasma DBD. Image du jet plasma pour une durée d'exposition de 10 s (a) et série de trois images (durée d'exposition 5 ns) acquises respectivement aux instants $t = 700 \text{ ns}$, 800 ns et 900 ns après le début du pulse de tension (b). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9.69 kHz, durée de l'impulsion 1 μs , gaz porteur Argon et débit de gaz de 2 L/min.	86
6.1.1	Étapes principales dans la production du PAM.	90
6.2.1	Croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM exposé 0 s, 60 s, 120 s et 240 s au jet de plasma DBD Hélium ($T_{\text{trans}} = 10 \text{ min}$). Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes.	92
6.2.2	Effet génotoxique du PAM observé pour différentes durées d'activation ($T_{\text{exp}} = 60 \text{ s}$, 120 s et 240 s). Les sphéroïdes sont transférés dans le PAM 2 heures après son activation. Immuno-détection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupes cryogéniques de 5 μm d'épaisseur 4 h après le début du traitement. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : 100 μm .	93

6.3.1	Inhibition de croissance et effets génotoxiques du PAM. (a) croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM ($T_{exp} = 120$ s) pour différents temps de transfert. Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du PAM détecté 4 h après le début du traitement. Immuno-detection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de 5 μ m d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : 100 μ m. . . .	94
6.4.1	Influence du temps de transfert (entre 15 min et 48 h) et du temps d'exposition (entre 60 s et 240 s) sur le pourcentage volumique de cellules positives aux dommages à l'ADN dans un sphéroïde traité par milieu activé par plasma. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD de 4 expériences indépendantes.	96
6.5.1	Inhibition de croissance et effets génotoxiques du PAM stocké à différentes températures. (a) croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM ($T_{exp} = 120$ s) et stockés 7 jours à différentes températures de stockage : $+37^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C et -80°C . Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours après le début du traitement. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du PAM ($T_{exp} = 120$ s, $T_{trans} = 7$ jours) détecté 4 h après le début du traitement. Immuno-detection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de 5 μ m d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : 100 μ m. . . .	98
6.6.1	Inhibition de croissance et effets génotoxiques du PAM en présence de catalase. (a) croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM ($T_{exp} = 120$ s) d'un milieu activé par plasma contenant de la catalase ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours après le début du traitement. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du PAM détecté 4 h après le début du traitement. Immuno-detection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de 5 μ m d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : 100 μ m.	100

6.7.1	Inhibition de croissance et effets génotoxiques du peroxyde d'hydrogène ajouté dans le milieu de culture des sphéroïdes (a) croissance relative des sphéroïdes après transfert dans un milieu contenant du peroxyde d'hydrogène. Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours après le début du traitement. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basées sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du peroxyde d'hydrogène détecte 4 h après le transfert. Immuno-detection des dommages à l'ADN (phopho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de 5 μ m d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : 100 μ m.	101
6.7.2	Influence de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture sur le pourcentage volumique de cellules positives aux dommages à l'ADN dans un sphéroïde. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes.	102
6.8.1	Absence d'effet génotoxique du PAM sur sphéroïdes de cellules fibroblastes (GM637) 4 h après transfert. Immuno-detection des dommages à l'ADN (phopho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de 5 μ m d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : 50 μ m.	104
6.9.1	Effet du PAM sur la viabilité cellulaire détecté après transfert des sphéroïdes dans du PAM (T_{trans} = 15 min, T_{exp} = 120 s). La viabilité cellulaire est évaluée par luminescence de l'ATP. En haut de la figure sont insérées des photographies en lumière transmises des sphéroïdes après leurs transfert dans le PAM.	105
6.9.2	Interaction entre les molécules générées par le PAM et l'ATP. La concentration initiale d'ATP lors de chaque exposition est de 10 nM.	106
6.9.3	Concentration en ATP présente dans le sphéroïde avec et sans le supernatant.	107
6.10.1	Effet du PAM sur la perméabilisation cellulaire et l'activation de l'apoptose détectés après transfert des sphéroïdes dans le PAM (T_{exp} = 120 s, T_{trans} = 15 min). La perméabilisation cellulaire est évaluée par la fluorescence de l'iodure de propidium (rouge) et les noyaux de cellules non perméabilisé sont marqués par du Hoechst (bleu). L'activation de l'apoptose et des caspases est évaluée par une fluorescence verte superposée avec une image de microscopie optique.	108
6.10.2	Évolution durant les 6 premières heures après transfert de sphéroïdes HCT116 dans le PAM des différents signaux normalisés d'ATP, PI, caspases et du volume des sphéroïde.	109

6.11.1 Profil de fluorescence des dommages à l'ADN dans le cas d'un temps de contact court avec le PAM (10 minutes) représentatif d'un traitement <i>in vivo</i> et contact long (4 heures). Conditions expérimentales : Texp = 120 s, Ttrans = 10 min.	111
6.11.2 Influence du temps de contact (10 minutes et 9 jours) sur la croissance des sphéroïdes HCT116 suite à un traitement par PAM.	112
7.1.1 Spectre RPE obtenu après exposition d'une solution eau + DMPO pendant 120 s au jet de plasma hélium	117
7.1.2 Décroissance en fonction du temps de l'intensité du signal DMPO-OH en fonction de la nature du liquide activé par jet de plasma DBD Hélium pendant une durée d'exposition de 150 s.	118
7.1.3 Évolution de la production de OH• dans différents milieux de culture en fonction du temps d'exposition. La seconde transition du quartet DMPO-OH est utilisée pour déterminer l'intensité du signal.	119
7.1.4 Intensité RPE de l'adduit DMPO-OH avec et sans ajout de superoxyde dismutase dans l'eau milliQ	120
7.2.1 Évolution de la production de H ₂ O ₂ dans différents liquides activés par plasma en fonction du temps d'exposition	122
7.3.1 (a) Spectre TEMP- ¹ O ₂ obtenu après 150s de traitement plasma dans l'eau milliQ. (b) Évolution de la production de ¹ O ₂ dans trois solvants en fonction du temps d'exposition. La première transition du spectre TEMP-O est utilisée pour déterminer l'intensité du signal.	123
7.4.1 Spectre RPE du C-PTIO dans l'eau avec et sans traitement plasma. (a) Spectre expérimental d'une solution d'eau milliQ contenant le piègeur C-PTIO après 60s de traitement par jet plasma DBD hélium. (b) Simulation RPE du signal C-PTIO. (c) Signal RPE du C-PTI résultant de l'interaction entre le C-PTIO et l'oxyde nitrique.	126
7.4.2 Évolution de la production d'oxyde nitrique (NO•) dans différents milieux de culture en fonction du temps d'exposition	127
7.5.1 Évolution de la production de nitrites et nitrates dans différents liquides activés par plasma en fonction du temps d'exposition	128
7.6.1 (a) Spectre RPE obtenu après activation d'une solution DMEM durant 150s au jet de plasma hélium. (b) Évolution de la production de radical hydrogène (H•) dans différents liquides en fonction du temps d'activation. La transition centrale du signal est utilisée pour déterminer l'intensité du signal.	130
7.7.1 Bilan des espèces générées dans un milieu de culture après exposition au jet de plasma DBD hélium et les réactions conduisant à des effets sur les cellules cancéreuses.	131

8.1.1	(a) Représentation schématique en coupe du générateur DBD de jet de plasma froid développé pour fonctionner avec de l'argon. La numérotation fait référence au tab. 8.1 (b) photographie du dispositif générant un jet de plasma en fonctionnement	137
8.2.1	a. Distribution du champ électrique géométrique pour les configurations S-DBD et D-DBD dans des conditions de puissances similaires. Tension appliquée entre les électrodes de : 6 kV (S-DBD) et 9 kV (D-DBD) correspondant à une puissance consommée par le plasma (voir tableau 8.2) de 5.32 W (S-DBD) et 5.12 W (D-DBD). Les électrodes sont coloriées en noir sur la figure. b. L'évolution du champ électrique radial dans les deux configurations DBD pour une position axiale de 24 mm.	140
8.2.2	Distribution du champ électrique géométrique pour les configurations S-DBD et D-DBD avec une tension appliquée aux électrodes de 9 kV dans les deux configurations pour une position axiale de 24 mm.	141
8.3.1	Forme d'onde typique de la tension appliquée et du courant anodique mesuré du jet de plasma DBD argon (en configuration simple et double barrière diélectrique). Alimentation à la fréquence de 9.69 kHz, durée de l'impulsion 1µs, débit d'argon de 2l/min et tension appliquée de 10kV.	141
8.3.2	Influence de la durée de l'impulsion de tension sur le courant de décharge négatif pour la configuration S-DBD (a) et D-DBD (b). Alimentation des jets de plasma à la fréquence de 9.69 kHz, un flux d'argon de 2 l/min et une tension de 10 kV.	143
8.4.1	Spectres UV-VIS-NIR à une distance de 0.1 cm de la sortie du tube de quartz composant le dispositif S-DBD. Conditions expérimentales : tension appliquée 10 kV, fréquence de répétition 9.69 kHz, durée de l'impulsion 1 µs, flux d'argon 2 l/min.	145
8.4.2	Concentration d'oxygène atomique en fonction de la tension inter-électrode et pour des débits d'argon de 1 l/min (●), 2 l/min (■) et 3 l/min (▲). Mesures effectuées à 0.1 cm de la sortie du tube de quartz en configuration S-DBD (a) et D-DBD (b). Conditions expérimentales : durée de l'impulsion 1 µs, fréquence de répétition 9.69 kHz.	149
8.4.3	Concentration en oxygène atomique dans l'axe du jet plasma D-DBD en fonction de la distance par rapport à la sortie du tube de quartz en comparaison avec un jet Surfatron micro-onde . Conditions expérimentales du jet Surfatron (MW) : puissance micro-onde 40W, flux d'argon 1 l/min, flux d'Air comprimé pour le refroidissement 22 l/min. Conditions expérimentales du jet plasma D-DBD : amplitude de la tension inter-électrode de 10 kV, durée de l'impulsion 1 µs, fréquence de répétition 9.69 kHz, flux d'argon de 2 l/min.	150

8.4.4	Évolution de l'irradiance UV-C en face du jet D-DBD à différentes distances de la sortie du tube de quartz en comparaison avec un jet Surfatron micro-onde. Conditions expérimentales du dispositif Surfatron : puissance micro-onde 40W, débit d'argon 1 l/min, débit d'air comprimé pour le refroidissement 22 l/min. Conditions expérimentales du dispositif D-DBD : amplitude des impulsions de tension 10 kV, durée d'une l'impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69 kHz, flux d'argon 2 l/min.	152
8.5.1	Développement du jet plasma DBD après la sortie du tube de quartz. La référence de temps ($t=0$) correspond au front positif de l'impulsion de tension. Conditions expérimentales : tension appliquée : 10kV, durée de l'impulsion : 1 μ s ; fréquence de répétition : 9.69 kHz, Débit d'argon : 2.25 l/min.	154
8.5.2	Photographies du jet de plasma dans la configuration D-DBD pour différents débits d'argon. Conditions expérimentales : Amplitude des impulsion de tension de 10 kV, durée de l'impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69 kHz.	154
8.5.3	Longueur de la plume plasma dans les deux configurations du jet de plasma en fonction du débit de gaz porteur et de la tension appliquée aux électrodes. Conditions expérimentales : durée de l'impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69 kHz.	155
8.6.1	Croissance relative des sphéroïdes après activation plasma du PAM avec le jet de plasma DBD hélium et le jet de plasma D-DBD argon ($T_{exp} = 120$ s et 240 s, $T_{trans} = 15$ min, $T_{stockage} = +37$ °C). Les sphéroïdes sont traités à $J=0$ et observés pendant les 9 jours suivants. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ écart-type évalués à partir de 4 expériences indépendantes.	158
8.0.1	Évolution du volume tumorale de xénogreffe hétérotopique de cellules colorectales sur modèle murin lors du traitement indirect par liquides activés par plasma froid DBD hélium. $\bigcirc$, tumeurs non traitées ; $\square$, injection de 50 μ L de milieu DMEM non exposé au plasma 3 fois par semaine ; $\triangle$, injection de 50 μ L de milieu DMEM exposé 120s au jet de plasma DBD hélium 3 fois par semaine.	161
A.0.1	Influence du sérum de veau dans le milieu activé par plasma sur les dommages à l'ADN. Temps d'exposition de 120s et stockage à $+37^{\circ}\text{C}$. Pas de variations significatives du taux de dommage à l'ADN en présence de sérum.	166
B.0.1	Protocole de quantification de l'adenosine triphosphate dans le sphéroïde et le surnageant.	167

Liste des tableaux

1.1	Les different grades d'une tumeur.	17
1.2	Classification TNM du cancer colorectal.	18
2.1	Concentrations des espèces générées en phase gazeuse par un plasma froid DBD dans l'air à la pression atmosphérique ayant une densité électronique comprise entre 10^9 et 10^{11} cm^{-3} et une concentration ionique positive comprise entre 10^{10} et 10^{12} cm^{-3} . La deuxième colonne est extraite de [13] . . .	42
4.1	Moments magnétiques orbitaux et de spin des particules élémentaires . . .	63
4.2	Structure moléculaire du (a) Carboxy-PTIO seul et (b) le carboxy-PTI résultant de la réaction du carboxy-PTIO avec le radical oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$)	70
5.1	Paramètres spectraux des raies Ar I considérées pour la réalisation des diagrammes de Boltzmann	80
5.2	Paramètres des différents élargissements des raies H_α et H_β dans un plasma d'argon	82
5.3	Paramètres spectroscopiques de l'oxygène et de l'argon pour les raies λ_{844} et λ_{852}	84
5.4	Sections efficaces de quenching de l'oxygène et de l'argon [11]. On a considéré $\sigma_{\text{Ar}-\text{N}_2} \approx \sigma_{\text{Ar}-\text{O}_2}$ et $\sigma_{\text{O}-\text{N}_2} \approx \sigma_{\text{O}-\text{O}_2}$	85
7.1	Durée de demi vie de l'adduit DMPO-OH en fonction du type de solvant .	118
7.2	Concentration en peroxyde d'hydrogène dans les liquides activés par plasma estimée à partir d'une analyse fluorimétrique et de deux méthodes biologiques basées sur l'analyse des dommages à l'ADN et du détachement cellulaire.	122
8.1	Caractéristiques des principaux composants du générateur DBD de jet de plasma d'argon. La numérotation fait référence à la fig. 8.1.1	136
8.2	Puissance consommée dans les deux configurations DBD en fonction de la durée de l'impulsion de tension. Conditions expérimentales : tension appliquée 10 kV, fréquence de 9.69 kHz, 2 L/min de flux d'argon.	142

8.3	Paramètres plasma pour les configurations S-DBD et D-DBD lors d'une consommation de puissance similaire (5W). Conditions expérimentales : Amplitude de la T tension inter-électrode de 9kV (D-DBD) et 6kV (S-DBD), durée de l'impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69kHz, flux d'argon 2l/min. Les analyses sont réalisées à 1mm près la sortie du tube de quartz exceptée l'irradiance UV-C mesurée à 17mm. La reproductibilité de chaque paramètre a été évaluée sur plusieurs heures.	146
8.4	Évolution de la température rotationnelle et de la température d'excitation en fonction de l'amplitude de la tension inter-électrode pour les configurations S-DBD et D-DBD. Fréquence de répétition des impulsions de tension de 9.69 kHz et durée d'impulsion de 1 μ s.	147
8.5	Évolution de la température rotationnelle et de la température d'excitation en fonction du flux d'argon pour les configurations S-DBD et D-DBD. Fréquence de répétition des impulsions de tension de 9.69 kHz et durée d'impulsion de 1 μ s.	147
8.6	Évolution de la longueur et de la vitesse de propagation de la balle plasma en fonction de la durée d'impulsion de tension. Conditions expérimentales : amplitude des impulsions de tension : 10kV, flux d'argon : 2 l/min, fréquence de répétition : 9.69 kHz.	156
8.7	Proportion de cellules positives aux dommages à l'ADN 4h après activation du liquide avec les dispositifs plasma utilisés (Les tumeurs ont été immergées dans le liquide 15 min après l'activation plasma de ce dernier). Conditions expérimentales : Amplitude des impulsions de tension de 10 kV, durée d'une impulsion de 1 μ s, fréquence de répétition de 9.69 kHz, flux d'argon de 3 l/min, distance de traitement de 2 cm pour le jet DBD hélium et 3 cm pour le jet D-DBD argon.	157

Introduction

Les plasmas sont des milieux gazeux ionisés, globalement neutres d'un point de vue électrique, résultant d'un apport d'énergie sous diverses formes (décharges électriques alimentées en tension continue, impulsionnelle ou en encore en mode RF ou micro onde, sans oublier l'énergie apportée par une source laser,...). L'énergie apportée au milieu gazeux permet d'arracher des électrons aux atomes et molécules et de produire de nombreuses espèces actives (ions, espèces excitées, radicaux, photons). On distingue deux types de plasmas : les plasmas à l'équilibre thermodynamique où toutes les espèces (neutres, électrons, ions) sont quasiment à la même température ; les plasmas hors équilibre où la température électronique est très élevée devant la température des neutres et des ions. Dans les plasmas froids hors équilibre thermodynamique, qui sont les plasmas les plus utilisés dans les applications biomédicales, la température du gaz (i.e. des neutres et des ions) est souvent très proche de la température ambiante alors que la température électronique peut atteindre des milliers de Kelvins.

Historiquement la première commercialisation des plasmas pour des applications biomédicales a été l'utilisation des plasmas thermiques en chirurgie ambulatoire pour la découpe de tissus humains. Dans ce type d'application, le procédé est très simple et se base uniquement sur les effets thermiques des plasmas en équilibre thermodynamique. Par conséquent l'utilisation de ces dispositifs peut entraîner de nombreux dommages sur les tissus organiques lors des traitements les rendant inaptes pour de nombreuses applications thermosensibles. Pour palier ces effets thermiques, de nombreuses équipes de recherche ont adapté les plasmas hors équilibre thermodynamique qui sont généralement produits à basse ou très basse pression pour permettre leur utilisation à la pression atmosphérique. La levée de ce verrou scientifique a ouvert de nouvelles possibilités d'applications aux plasmas froids proches de la température ambiante avec notamment des nouvelles applications biomédicales.

De nos jours les thématiques abordées sont relativement vastes avec la stérilisation de matériels médicaux, le traitement de plaies chroniques, le traitement de la peau, des applications dentaires et bien d'autres. Parmi ces applications, l'une des plus prometteuses est le traitement du cancer par les plasmas froids. Malgré de nombreuses recherches sur cette thématique la compréhension des effets biologiques observés et les modes d'actions des plasmas sont encore mal compris car ils nécessitent de nombreuses compétences dans divers domaines scientifiques aussi bien physique, biologique que chimique. De plus les modèles

utilisés pour ces recherches sont souvent trop éloignés d'un traitement clinique, c'est le cas par exemple du traitement de cellules en suspension dans un liquide. Inversement dans le cas de traitements de modèles trop complexes, par exemple lors d'expérimentation *in vivo*, il est pratiquement impossible d'identifier les mécanismes d'actions.

L'étude pluridisciplinaire présentée dans ce mémoire a par conséquent nécessité la collaboration entre plusieurs équipes de laboratoires différents :

- l'équipe Plasma Réactifs Hors Équilibre (PRHE) du laboratoire LAPLACE "Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie" Université de Toulouse, CNRS spécialisé dans l'ingénierie des plasmas (développement, caractérisation et utilisation des sources plasmas),
- l'équipe Innovation for the study of tumor cell Proliferation in 3D (IP3D) du laboratoire ITAV "Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant" Université de Toulouse, CNRS expert en biologie du cancer et plus particulièrement dans l'utilisation des substituts de tumeurs du colon,
- l'équipe Interfaces Dynamiques et Assemblages Stimulables (IDeAS) du laboratoire IMRCP "Laboratoire des Interactions Moléculaires et de la Réactivité chimique et Photochimiques" Université de Toulouse, CNRS. Son domaine d'expertise concerne principalement la chimie avec l'étude d'architectures moléculaires stimulables pour le traitement photochimique ainsi que la détection et la quantification d'espèces chimiques en phase liquide,
- l'équipe Cellular Biophysics du laboratoire IPBS "Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale" Université de Toulouse, CNRS dont l'objectif principal est l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques dans le domaine médical et plus particulièrement pour le traitement du cancer (*in vitro* et *in vivo*),
- la plateforme technologique de détection de radicaux par résonance paramagnétique électronique au laboratoire LCC "Laboratoire de Chimie de Coordination" Université de Toulouse, CNRS et de l'Université de Toulouse.

Dans cette thèse notre choix s'est porté sur l'utilisation de milieux activés par jets de plasma (en utilisant deux gaz : l'hélium et l'argon) pour le traitement de micro-tumeurs en utilisant des cellules de cancer du colon HCT116. L'objectif est d'une part d'identifier et de quantifier les espèces radicalaires produites lors de l'exposition de milieux de culture aux jets de plasma. D'autre part, d'analyser les effets cytotoxiques et genotoxiques de ces espèces radicalaires sur des micro-tumeurs. Le but final étant d'identifier les modes d'actions des jets de plasma sur des cellules cancéreuses. Entre cette introduction et la conclusion générale, le présent mémoire s'articule autour de quatre parties.

La première partie est composée de deux chapitres consacrés aux **études bibliographiques**. Le premier chapitre est dédié à la biologie du cancer et aux méthodes de traitement actuellement utilisées dans le milieu médical. Cette courte étude permettra de justifier le choix du cancer colorectal comme support de recherche. Dans la suite, les cellules cancéreuses seront caractérisées pour comprendre d'une part les mutations et l'ensemble des processus

biologiques qui conduisent des cellules dans un processus de cancérisation mais également de comprendre les méthodes d'action des stratégies thérapeutiques actuelles ou en cours de développement. Pour conclure, les principales stratégies thérapeutiques actuellement mises en place dans le milieu médical vont être décrites et analysées avec un intérêt particulier pour les traitements spécifiques au cancer colorectal. Le second chapitre présentera les sources de plasma froid à la pression atmosphérique et leurs applications biomédicales. Une présentation des plasmas et de leurs principales caractéristiques sera effectuée avant de décrire plus précisément les grandes familles de dispositifs plasmas utilisés dans le domaine biomédical avec une attention particulière sur les dispositifs de notre équipe de recherche. On présentera succinctement les différentes thématiques que regroupent les applications biomédicales des plasmas et nous effectuerons une synthèse des principaux facteurs physico-chimiques. L'objectif étant de démontrer la pertinence des traitements par plasmas froids dans le domaine de la médecine et de la biologie.

La seconde partie, dédiée aux **procédures expérimentales et matériels** utilisés, est composée des chapitres 3, 4 et 5 correspondant aux trois domaines scientifiques abordés lors de ces recherches que sont : la biologie, la chimie et la physique des plasmas. Le chapitre 3 commencera par décrire les procédures nécessaires à la création de substituts aux tumeurs pour des études *in vitro* tout en rappelant les avantages liés à l'utilisation d'une structure 3D. Suite à cela, l'ensemble des techniques d'analyse de modèles biologiques 3D sera décrite. Pour conclure ce chapitre, le protocole ainsi que les techniques d'analyses adoptées lors de campagnes de mesures *in vivo* seront développés (support de la conclusion générale des présents travaux). L'analyse des espèces chimiques générées par le jet de plasma dans un liquide est décrite dans le chapitre 4. La détection des espèces à courte durée de vie nécessite l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique. Dans un premier temps ce chapitre expliquera le principe physique de cette technique puis décrira dans un second temps les différents protocoles adoptés. Enfin les techniques plus classiques de détection des espèces stables comme la mesure d'absorbance, la luminescence et la fluorimétrie seront développées. Pour finir, le chapitre 5 regroupe l'ensemble des techniques de caractérisations associées à la physique des plasmas et utilisées pour caractériser un dispositif de jet de plasma développé durant la thèse. Ces techniques de diagnostic sont principalement basées sur l'analyse des spectres d'émission optique des plasmas.

La troisième partie est consacrée aux **résultats expérimentaux d'un traitement de micro-tumeurs par jet de plasma d'hélium**. Cette partie est divisée en deux chapitres respectivement pour l'analyse biologique dans le chapitre 6 et chimique dans le chapitre 7. Dans le chapitre 6 nous rappellerons le protocole de traitement relatif à l'activation de milieux de culture par exposition aux jets de plasma (*Plasma Activated Medium* ou PAM). Suite à cela toutes les grandeurs d'influences imputables au jet de plasma et au protocole de traitement indirect seront étudiées pour permettre l'optimisation du traitement par plasma notamment en terme d'inhibition de croissance tumorale. Ces expérimentations permettent de mettre en avant l'importance de certaines espèces chimiques dans les effets biologiques

observés suite au traitement par jet de plasma. De plus une étude comparative du traitement de micro tumeurs composées de cellules cancéreuses ou de cellules saines sera effectuée pour analyser les effets du PAM sur les cellules saines. Pour conclure, une analyse intracellulaire sera réalisée pour décrire de manière mécanistique les effets induits par le PAM dans les micro tumeurs de cellules cancéreuses du colon. Dans le chapitre 7 des espèces générées par l'interaction du jet de plasma et d'un liquide seront détectées et quantifiées. Les résultats donnés dans ce chapitre seront comparés aux résultats biologiques issus du traitement par plasma d'une micro-tumeur cancéreuse dans le but de proposer un processus réactionnel comportant les réactions chimiques et biologiques clés dans le traitement indirect de tumeurs par plasma froid.

La quatrième partie clôturera ce mémoire avec le **développement et la caractérisation d'un jet de plasma DBD Argon**. Cette partie du mémoire composée d'un seul chapitre sera consacrée à la conception d'un jet de plasma à partir des résultats biologiques et chimiques pour l'optimisation du traitement par jet de plasma. Le chapitre 8 permettra dans un premier temps de définir un cahier des charges relatif aux jets de plasma et aux traitements biomédicaux ainsi que la conception de ce nouveau jet. Une simulation préliminaire conclura sur le choix d'une géométrie du dispositif plasma par rapport au cahier des charges précédemment établi. Dans un second temps, une caractérisation physique du jet de plasma DBD argon pour les traitements biomédicaux sera réalisée. Dans ce contexte, l'ensemble des points établis dans le cahier des charges sera étudié pour justifier l'utilisation possible de ce dispositif dans des applications biomédicales. Dans un dernier temps, des expérimentations sur des substituts de tumeurs cancéreuses permettront de comparer les effets obtenus avec ce type de dispositif vis-à-vis des précédents résultats obtenus avec un jet de plasma DBD hélium.

Contexte de l'étude: La biologie du cancer et méthodes de traitement

“Soudain, il s'arrêta, comme foudroyé, devant l'entrée d'un immeuble ; un phénomène indicible venait de se produire devant ses yeux ; un carrosse s'arrêta devant l'entrée ; les portières s'ouvrirent ; un monsieur en uniforme en bondit, tout courbé, et courut pour gravir l'escalier. Quelle ne fut pas l'épouvante et en même temps la stupeur de Kovaliov quand il reconnut que c'était là son propre nez !”

(NIKOLAI GOGOL)

Chapitre 1

Physiopathologie du cancer et traitements

Les données statistiques présentées dans cette partie sont extraites des rapports “Les cancers en France, édition 2014” [14] édité par L’institut National du Cancer (INCa) et “Estimation nationale de l’incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012” [15] édité par l’Institut de Veille Sanitaire (InVS) sur la base d’une estimation faite en 2012. Ces données sont le fruit d’une collaboration entre le réseau français des registres des cancers (Francim), le Service de biostatistique des Hospices Civils de Lyon (HCL), l’Institut de Veille Sanitaire et l’institut National du Cancer. Les registres généraux de cancers en France correspondent au Bas-Rhin, le Calvados, le Doubs, la Gironde, le Haut-Rhin, l’Hérault, l’Isère, Lille et sa région, Pays de Loire atlantique et de Vendée, la Manche, la Martinique, la Somme, le Tarn, le Limousin, la Guadeloupe et la Guyane. Il existe également 12 registres spécialisés de cancer. Dans la suite de ce mémoire, la dénomination « en France » fera référence aux données issues des registres du réseau Francim.

1.1 Le cancer en France

Le cancer est une maladie bien connue du grand public. On estime qu’un homme sur deux et une femme sur trois se verra diagnostiquer un cancer avant l’âge de 85 ans [16].

Malgré les avancées scientifiques et médicales le taux de guérison moyen est de 60% pour les cancers traités et diagnostiqués à temps. Le gouvernement français en a par conséquent fait une cause nationale avec la mise en place du « plan cancer 2014-2019 » [17]. L’ambition de ce plan est de rendre dans un premier temps plus accessible et de manière plus précoce les diagnostics de cette maladie ainsi que de fournir une meilleure prise en charge des personnes malades et de leur entourage. La sensibilisation et la réglementation sont des thèmes principaux du plan cancer avec la mise en place de programmes éducatifs et de nouvelles normes relatives à la protection des personnes au quotidien aussi bien sur le lieu de travail qu’à leur domicile. En effet, les choix individuels (comportements à risques, mode

de vie, ...) ou collectifs (pollution, environnement, ...) que nous faisons peuvent accroître le risque de développer un cancer et on appelle facteurs de risques validés l'ensemble des éléments humains, environnementaux ou liés à un mode de vie qui, validés par des études épidémiologiques, augmentent la probabilité de développer une maladie ou un traumatisme. Naturellement, l'amélioration des thérapies et la recherche contre le cancer mais aussi la formation des personnels soignants font également partis de ce vaste chantier.

Durant l'année 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer en France est estimé à environ 355 354 et le nombre de décès liés au cancer à 148 378 [15]. On a recensé 200 000 nouveaux cas de cancer chez l'homme et 155 000 chez la femme. La mortalité liée au cancer sur la même période est estimée à 85 000 pour la population masculine et 63 000 pour la population féminine.

La figure 1.1.1 donne le nombre de nouveaux cas de cancer recensés durant l'année 2012 par site de localisation chez les hommes (figure 1.1.1.a) et chez les femmes (figure 1.1.1.b) en France [15]. On constate que les sites ou les sièges anatomiques du corps où se développe le cancer sont différents selon le sexe. En effet, chez l'homme les trois premiers sites de développement des cancers sont la prostate (56 841 cas en 2012), les poumons (28 211 cas en 2012) et le colon-rectum (23 266 cas en 2012) tandis que chez la femme, on recense le cancer du sein (48 763 cas en 2012), du colon-rectum (18 926 cas en 2012) et du poumon (11 284 cas en 2012) [15].

Les risques de développer un cancer sont liés à des facteurs qui peuvent être de plusieurs types. Ces facteurs risques peuvent être endogènes ou exogènes et sont différents selon les types de cancers. Dans cette partie sont regroupés quelques facteurs de risques exogènes les plus recensés :

- Prostate : l'âge, les antécédents familiaux et les origines ethniques ;
- Sein : les antécédents familiaux, le nombre de cycle menstruels, les facteurs hormonaux et hyper œstrogène, le surpoids, le tabagisme et l'alcool ;
- Côlon-rectum : l'âge (voir figure 1.1.2), les polypes de plus de 1cm de diamètre, les antécédents familiaux, les maladies inflammatoires de l'intestin, certaines maladies génétiques, le surpoids et les comportements alimentaires ainsi que le tabagisme et l'alcool ;
- Poumon : le tabagisme et le tabagisme passif, l'exposition au radon, l'exposition à l'amiante et aux rayonnements ionisants mais également l'exposition au goudron, au chrome ou au nickel.

Un des facteurs risques important est également la zone géographique de résidence. Pour le cancer du poumon par exemple, le taux d'incidence régional est significativement différent entre les régions du sud et les régions du nord, nord-est. Le Nord-Pas-de-Calais par exemple présente un taux d'incidence de 63.5/100 000 alors que le limousin enregistre un taux de 42.7/100 000 [14]. Les choix collectifs d'une région notamment l'implantation industrielle et l'histoire (régions minières) peuvent influencer les taux d'incidences de certains cancers.

Pour pouvoir traiter efficacement le cancer et minimiser les risques de reprise tumorale il

est primordial de comprendre les mécanismes qui conduisent les cellules à une cancérisation. Cela permettra dans un premier temps d'optimiser les méthodes de traitements actuelles puis dans un second temps d'en développer de nouvelles.

La suite de ce chapitre abordera dans la section 1.2 la définition du cancer ainsi que les changements induits dans une cellule pouvant conduire à un processus de cancérisation. La section 1.3 portera quant à elle sur les différentes stratégies thérapeutiques et leurs évolutions.

Dans un souci de cohérence avec le travail accompli lors de cette thèse, les travaux de recherche que nous allons présenter dans ce chapitre porteront sur le cancer colorectal, le second cancer en terme de mortalité tous sexes confondus. Ainsi les sections suivantes concernant les stratégies thérapeutiques seront décrites de manière générale et comporteront des informations supplémentaires sur le cancer colorectal lorsque cela est pertinent.

1.2 Caractéristiques des cellules tumorales

Le mot cancer désigne une prolifération cellulaire surexprimée (ensemble important de cellules dérivant d'une seule cellule initiale) et incontrôlée conduisant à une masse tissulaire ressemblant plus ou moins au tissu normal d'origine (différenciation). La masse formée est appelée tumeur maligne si la cause est cancéreuse. Cette masse cellulaire a tendance à persister et à croître au court du temps témoignant d'une autonomie biologique particulière. Cette autonomie découle de différentes altérations qui conduisent les cellules saines à une cancérisation cellulaire.

1.2.1 Développement des cellules tumorales

Au cours de sa vie une cellule normale ou cellule saine passe par différentes étapes. Ces phases sont décrites dans le cycle cellulaire (fig. 1.2.1) et sont réparties en 4 étapes successives principales :

- **Phase croissance (G1)** : pendant laquelle une cellule nouvellement formée va d'une part remplir l'ensemble des fonctions nécessaires à son fonctionnement mais va également se préparer pour une nouvelle division cellulaire. Lors de cette phase la cellule copie ses organes internes appelés organelles (à l'exception de l'ADN) et produit également les protéines ressources nécessaires à sa division future. Du fait de cette duplication la cellule va augmenter en volume. Cette étape peut durer de 8 H à plusieurs mois en fonction du type de cellule.
- **Phase réplication de l'ADN (S)** : la cellule duplique son ADN en créant ainsi deux paires de chromosomes chacun servant par la suite pour une nouvelle cellule. Cette phase dure généralement entre 6 et 8 H.
- **Phase croissance (G2)** : Cette étape consiste en un deuxième gonflement pendant lequel la cellule va majoritairement préparer l'ensemble des protéines nécessaires à la

division cellulaire. La durée est comprise entre 2 et 5 H.

- **Phase division (M)** : est à proprement parlé la séparation de l'ensemble des composants d'une cellule mère pour donner naissance à deux cellules filles. C'est ce que l'on appelle la Mitose. Elle comporte quatre phases dénommées prophase, métaphase, anaphase et télophase. En résumé, lors de la mitose les éléments vont migrer chacun à l'extrémité de la cellule avant que l'enveloppe nucléaire ne se referme donnant naissance aux cellules filles. Cette étape prend de 1 à 3 H et produit des cellules aptes à entrer de nouveau dans un cycle cellulaire.

Il existe également une phase très importante hors du cycle cellulaire appelée **état de quiescence (G0)**. Cette phase peut être atteinte par les cellules après la mitose ou en début de phase G1. Dans cet état la cellule réalise l'ensemble des fonctions nécessaires à sa survie mais sans division cellulaire. Malgré tout, lorsqu'elle reçoit des signaux prolifératifs elle peut de nouveau entrer dans la phase G1 et entreprendre de nouvelles divisions.

Dans un organisme, les cellules dites normales sont pour la plupart à l'état de quiescence et elles peuvent rester plusieurs années dans cet état. L'apparition du cancer, lié aux facteurs risques endogènes, est due à la perturbation de l'homéostasie tissulaire qui peut induire l'apparition du cancer par la prolifération anarchique et incontrôlée des cellules [18]. La progression dans le cycle cellulaire et la sortie de l'état de quiescence nécessite toute une série de protéines (transcription de leur gène, traduction des transcrits...) [19]. Une ou plusieurs mutations dans l'un des gènes codant peut être à l'origine d'un cancer engendrant une prolifération cellulaire incontrôlée [20].

1.2.2 Caractéristiques des cellules tumorales

Les mécanismes moléculaires observés dans les cellules normales au cours de leur transformation en cellules cancéreuses permettent la compréhension de la biologie des tumeurs et les voies de signalisation lors de la transformation des cellules normales. Hanahan et Weinberg ont identifié les modifications essentielles dans la physiologie des cellules qui régissent la transformation de cellules normales en tumeurs malignes de la plupart (probablement tous) des cancers humains. En 2000, Hanahan et Weinberg ont mis en évidence six modifications [21] : L'autosuffisance en signaux de croissance, la résistance aux signaux antiprolifératifs, la réplication cellulaire illimitée, la résistance aux signaux de mort, l'induction de l'angiogenèse et activation de l'invasion et métastase. En 2011, Hanahan et Weinberg ont identifié deux caractéristiques supplémentaires : la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire [2]. Ces caractéristiques sont regroupées dans la figure 1.2.2. Selon Hanahan et Weinberg, ces huit capacités sont essentielles pour le développement d'une tumeur maligne et leurs acquisitions est due à l'instabilité du génome, l'inflammation et au microenvironnement des cellules cancéreuses.

Autosuffisance en facteurs de croissance

Dans un organisme les cellules dites normales sont pour la plupart à l'état de quiescence et elles peuvent rester plusieurs années dans cet état sans aucune division. Malgré tout, lorsqu'elles reçoivent des signaux prolifératifs elles peuvent de nouveau entrer dans la phase G1 et entreprendre de nouvelles divisions. Cet écartement du cycle cellulaire est strictement régulé afin de garder l'homéostasie¹ du nombre de cellules. Le passage d'un état de quiescence au cycle de prolifération est géré via des facteurs de croissance qui se diffusent dans l'organisme. Ces facteurs de croissance sont très variés et peuvent être des signaux de croissance ou des éléments nutritifs, notamment des vitamines, des protéines, peptides, acides gras, etc.

Lorsqu'un organisme vivant, ici les cellules, a besoin d'apport particulier en facteurs de croissance on parle d'auxotrophie. Inversement, certains organismes ont développé la capacité de synthétiser eux même les facteurs de croissance nécessaires à leur développement. C'est ce qu'on appelle la prototrophie qui est une particularité caractéristique des cellules cancéreuses. À la suite de diverses mutations elles sont alors capables de générer elles-mêmes les facteurs de croissance nécessaires au passage de l'état de quiescence au cycle de division cellulaire. De ce fait l'homéostasie n'est plus respectée ce qui conduit au développement d'une masse cellulaire importante : une tumeur.

Résistance aux signaux antiprolifératifs

Pour garder l'homéostasie la plus parfaite possible, l'organisme dispose de systèmes de régulation tels que les facteurs de croissance décrits précédemment. La gestion du nombre de cellules dans l'organisme est régulée par un processus mettant en œuvre des signaux antiprolifératifs dont le but est de réguler négativement la prolifération de certaines cellules. Il s'agit de mécanismes naturels pour limiter le développement incontrôlé des cellules cancéreuses. La plupart de ces mécanismes sont régulés par des gènes suppresseurs de tumeurs dont notamment le gène p53 qui est la protéine de transcription la plus étudiée en oncologie depuis sa découverte en 1979. p53 est une protéine de transcription dont le but premier est de se fixer sur les régions régulatrices des gènes afin de contrôler leur expression [22]. En l'absence de tout stress, le niveau de cette protéine est relativement bas (destruction par l'enzyme mdm2) [22]. L'activation de cette protéine peut être causée par de nombreux stress dont l'hypoxie, les dommages à l'ADN, les défauts de division ou encore le stress oxydatif [23]. Cette première phase dénommée "phase d'activation" va permettre l'augmentation de la concentration de la protéine p53 dans la cellule. Dans une seconde phase dite de "modification", la protéine va subir de multiples modifications afin d'activer sa fonction de transcription. Enfin dans la dernière phase dite "phase de réponse", la protéine va activer la transcription d'un très grand nombre de gènes afin d'adapter la réponse aux types de stress

1. L'homéostasie est un phénomène par lequel un facteur clé (par exemple la température) est maintenu autour d'une valeur bénéfique pour le système considéré, grâce à un processus de régulation

qui l'ont générés et de protéger la cellule. Suite à l'activation de p53 on assiste soit à un arrêt du cycle cellulaire avec des réparations ou bien à l'entrée de la cellule en apoptose ou sénescence (deux types de mort cellulaire) suivant la gravité des dommages supportés par la cellule [22].

L'induction de p53 a été relevée lors du traitement par radiations ionisantes [24]. Cette induction est causée par l'interaction des rayonnements avec les brins d'ADN. Les cassures simple ou double brin qui en résultent vont permettre le recrutement sur site de l'histone H2AX activant alors deux autres protéines ATM et ATR capables de phosphoryler la protéine p53 dans la phase de "modification" [22]. Elle est alors apte à jouer son rôle de transcription et va dans la plupart des cas induire une mort cellulaire par apoptose radio-induite. Toutefois, la mutation des gènes suppresseurs de tumeur, dont fait partie p53, empêche l'arrêt cellulaire et le déclenchement de l'apoptose pour les cellules ayant subi des dommages. Cela conduit donc à une résistance accrue de ces cellules tumorales aux traitements de radiothérapie et chimiothérapie [25, 26]. On retrouve dans plus de 50% des cellules tumorales une mutation de la protéine p53 [27] ce qui en fait un facteur de pronostic extrêmement prometteur [28].

Réplication cellulaire illimitée

Les cellules humaines saines possèdent un nombre de réplication limité biologiquement c'est à dire un nombre de cycles de division fini. À l'extrémité de chaque chromosome se situe une région hautement répétitive et non codante de l'ADN appelée télomère. Même si ce n'est pas le seul facteur impactant [29], la longueur des télomères diminue à chaque nouvelle division cellulaire conduisant à une perte progressive des informations des derniers gènes codés sur le chromosome. Cette longueur initiale permet donc de prédire le nombre de divisions que les cellules sont capables de réaliser avant que les télomères deviennent trop court et ne puissent plus remplir leurs fonctions. Dans le cycle cellulaire la perte d'information sur l'ADN va provoquer une entrée de la cellule en sénescence [30].

Cet effet est particulièrement observé en culture *in vitro*. Les cellules saines en culture prolifèrent pendant un nombre limité de divisions avant de rentrer en arrêt de croissance. Ce plateau est la limite de Hayflick ou plateau de sénescence répliative [31]. Il est observé sur les cellules saines mais non sur les cellules cancéreuses [31].

Dans les cellules tumorales, une enzyme, la télomérase, est capable d'ajouter des fragments de télomère lors de chaque division cellulaire. Cette enzyme présente dans 90% des cas de cancer [32] permet donc une réplication cellulaire quasiment illimitée conduisant ainsi à des masses tumorales importantes à partir de seulement quelques cellules mutantes.

Résistance aux signaux de mort

Pour maintenir l'homéostasie cellulaire l'organisme peut diriger les cellules les moins viables vers quatre grands types de mort cellulaire.

- **Nécrose** : la membrane plasmique perd son intégrité ce qui conduit au relargage du contenu intracellulaire dans le micro-environnement de la cellule [33]. L'agression que cela représente conduit à une réponse inflammatoire avec activation de moyen de défense comme les phagocytes (cellules pouvant ingérer, traiter et détruire des microbes ou des éléments intracellulaire éjectés) et leucocytes (appelés aussi globules blancs qui permettent l'élimination de corps étrangers dans l'organisme) [33]. Souvent considérée comme un processus accidentel la nécrose peut être dans certain cas contrôlée de manière précise et peut également prendre la place de l'apoptose lorsque celle-ci est inhibée [34, 35].
- **Autophagie** : En cas de stress cellulaire comme l'hypoxie ou en cas de déficience importante en nutriments, une des possibilités offertes à la cellule est l'autophagie. Dans ce cas, une partie des éléments présents dans cellule va être dégradée ou recyclée par des organes internes à la cellule appelés lysosomes afin de lui apporter les besoins énergétiques prioritaires [36]. Cette mort cellulaire permet donc le maintien de l'homéostasie mais également la survie dans des conditions de stress important.
- **Catastrophe mitotique** : la catastrophe mitotique est un processus de mort cellulaire qui n'a lieu que dans la phase de mitose. Si la cellule procède à une mitose incorrecte [37] (mauvaise ségrégation des chromosomes), une entrée prématurée dans la phase de mitose ou des dommages à l'ADN beaucoup trop importants pour être réparés [38], la cellule va s'autodétruire. Dans cette mort programmée la cellule va former des noyaux multiples dans lesquels les chromosomes ne sont pas condensés contrairement aux autres types de mort.
- **Apoptose** : l'apoptose est un mécanisme interne à la cellule qui lui permet une autodestruction "propre" suite à un signal intra ou extracellulaire. Dans ce processus la cellule va fragmenter de façon régulière l'ADN et donner naissance à des corps apoptotiques [39]. Ces corps sont composés d'une partie de l'ADN ainsi que d'une partie des organelles de la cellule mère le tout solidement enclavé dans une membrane plasmique contrairement à la nécrose [39]. Après la formation des corps apoptotiques la membrane plasmique va exposer des éléments de son feuillet interne à l'extérieur de la cellule. Cette action provoque des signaux pour les défenses immunitaires que sont les phagocytes. De cette manière les phagocytes vont pouvoir éliminer les corps apoptotiques [39] sans aucune inflammation des tissus [33] puisqu'il n'y a pas externalisation des organelles et du cytoplasme. L'apoptose est régulée par des enzymes que l'on appelle les caspases présentes naturellement dans le cytoplasme de manière inactive. Deux voies peuvent induire l'apoptose d'une cellule. La première est déclenchée par des signaux extracellulaires alors que la seconde est entièrement interne. Pour la voie externe, dites extrinsèque, des signaux externes vont activer des récepteurs à domaine de mort qui se situent à la surface de la cellule. Ces récepteurs vont pouvoir activer les caspases activatrices (caspases 2, 8, 9, 10, ...) qui vont activer à leur tour les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7, ...). Ces dernières ont pour rôle l'exécution

effective de l'apoptose avec le clivage des protéines nécessaires. La voie intrinsèque est quant à elle plus dépendante des protéines présentes dans le cytoplasme et plus particulièrement de la mitochondrie. La perméabilisation de la mitochondrie est dirigée en partie par des protéines anti-apoptotiques et des protéines pro-apoptotiques dont Bax et Bak sont les plus connues. Si les protéines pro-apoptotiques sont sur-exprimées, ce qui est le cas lors de dommage à l'ADN important (activation de p53 conduisant à la production de Bid et de Bax [40]), la mitochondrie va se perméabiliser libérant ainsi du cytochrome c capable de cliver les caspases et donc de démarrer l'apoptose [40].

La mutation de seulement quelques protéines permet aux cellules une résistance particulière face à une ou plusieurs morts cellulaires existantes. Ces mutations peuvent conduire d'une part à la cancérisation des cellules mais elles les rendent également plus résistantes aux stratégies de thérapies anti-tumorales.

Induction de l'angiogenèse

Le développement cellulaire est dans un premier temps contrôlé par des processus intracellulaires propres à la cellule comme nous l'avons observé dans les parties précédentes. Mais ce développement dépend également des interactions entre les cellules et leur microenvironnement.

L'ensemble des réactions chimiques nécessaires à la survie d'une cellule nécessite des apports du milieu externe (oxygène, nutriments, ...) mais demande également d'évacuer une partie des résidus produits (résidus de réactions métaboliques et CO_2). Ces échanges se font principalement via le système vasculaire. Par conséquent le développement d'une tumeur est limité dans l'espace en l'absence de vascularisation [41]. D'autre part, la pression exercée par les cellules les unes sur les autres induit un gradient d'oxygène au sein de la tumeur entraînant un gradient de prolifération cellulaire [42].

Le passage d'une tumeur dite en phase latente, sans développement important, en une tumeur dite agressive ayant un développement rapide est lié à une néo vascularisation de la tumeur. L'ensemble des processus qui permettent le développement et la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins est appelé angiogenèse. Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins est contrôlé comme pour le cycle cellulaire par des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Lorsque l'équilibre entre les deux est bouleversé et que ces facteurs se diffusent de la tumeur vers le micro-environnement le réseau sanguin proche en est modifié.

L'angiogenèse des cellules tumorales conduit à un réseau vasculaire relativement anarchique. Cette distribution n'étant pas normalisée. Il existe de nombreuses zones dans la tumeur en condition d'hypoxie ce qui limite l'efficacité des thérapies anti tumorales par une faible distribution des substances cytotoxiques de la chimiothérapie ou simplement par la présence d'une concentration insuffisante en oxygène nécessaire aux stratégies anti tumorales.

Activation de l'invasion et métastases

Une métastase est la croissance d'une cellule tumorale à distance de son site initial. Cette invasion est responsable de la plupart des décès liés aux cancers [43]. Pour le cancer colorectal on peut notamment évoquer les métastases pulmonaires dont on a récemment constaté qu'elles sont responsables d'un taux de mortalité très élevé [44]. Le processus d'invasion et de métastase est le suivant :

- Une invasion locale du stroma (réseau conjonctif de support d'une cellule, tissu ou organe).
- 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 dans un capillaire.
- Une extravasation² des cellules avec des mécanismes similaires à l'invasion locale.
- La prolifération des cellules tumorales dans le parenchyme de l'organe (la somme des tissus constituant les parties fonctionnelles d'un organe, opposé au réseau conjonctif "stroma").
- La mise en place d'une vascularisation.

Chaque processus nécessite des capacités particulières que les cellules tumorales ont acquises de manière innées ou obtenues suites à des mutations.

Reprogrammation du métabolisme énergétique

Pour produire une prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses dans l'organisme il est nécessaire d'avoir une dérégulation du contrôle de la prolifération mais également une adaptation du métabolisme énergétique.

Dans des conditions aérobies, les cellules normales transforment le glucose en pyruvate via la glycolyse dans le cytosol et par la suite en dioxyde de carbone dans les mitochondries. Dans des conditions anaérobies, la glycolyse est favorisée et relativement peu de pyruvate est envoyé aux mitochondries qui consomment de l'oxygène. Dans les travaux de Warburg il a été observé que même en présence d'oxygène (aérobie), les cellules cancéreuses étaient capables de reprogrammer leur métabolisme du glucose, donc de production d'énergie, en limitant leur métabolisme énergétique en grande partie à la glycolyse, conduisant à un état qui a été appelé « glycolyse aérobie » [2].

L'énergie des cellules transite sous la forme d'une molécule appelée Adénosine Triphosphate (ATP) celle-ci est produite par phosphorylation oxydative mitochondriale ainsi que par la glycolyse mais avec une efficacité 18 fois moins importante [45]. Ainsi il est apparemment paradoxal de choisir un processus de glycolyse en présence d'oxygène et de fait une justification fonctionnelle a été difficile à atteindre. Une hypothèse postulée par [46] et ré-

2. Une extravasation est le passage anormal d'un liquide de son canal adducteur vers les tissus environnants, soit par rupture du canal, soit par diffusion.

cemment complétée par [47] suggère que l'augmentation de la glycolyse permet de détourner une partie des molécules intermédiaires de la glycolyse dans diverses voies de biosynthèse y compris celles qui génèrent les nucléosides (éléments constitutifs de l'ADN et ARN) et les acides aminés. Ceci facilite à son tour la biosynthèse des macromolécules et des organites requis pour l'assemblage de nouvelles cellules. Les cellules embryonnaires ayant un pouvoir de prolifération important sont dans un métabolisme de Warburg : la Glycolyse aérobie. Ainsi les cellules cancéreuses concentrent leurs métabolisme sur les programmes de biosynthèse permettant la prolifération rapide des cellules cancéreuses.

Échappement au système immunitaire

Le système immunitaire est un ensemble d'éléments en veille dans l'organisme responsable de la surveillance, la reconnaissance et l'élimination de la majorité des microbes et substances environnementales étrangères au corps [48]. De la même manière le système immunitaire tend à éliminer la majorité des cellules cancéreuses et tumeurs naissantes. La présence de tumeurs ayant échappées à cette veille du système immunitaire semble indiquer que les cellules ont acquis des compétences qui leur permettent d'échapper à la détection par les différentes branches du système immunitaire ou sont capables de limiter l'effet de mise à mort immunologique. De récentes études ont montré une hausse importante de l'incidence de certains cancers chez les personnes immunodéprimées [49].

Ces dernières années, un nombre croissant de preuves suggère que le système immunitaire fonctionne comme une barrière significative à la formation et à la progression de la tumeur, du moins dans certaines formes de cancer qui ne sont pas induit par des virus. Pour valider ces observations, des souris ont été génétiquement modifiées pour les rendre immunodéficientes [50, 51]. Ainsi, il a été observé une augmentation de l'incidence cancéreuse et/ou un développement plus rapide des tumeurs chez les souris immunodéficientes [50, 51]. Par conséquent le système immunitaire inné et adaptatif contribue de manière importante dans la surveillance et l'élimination des tumeurs [52, 53]. L'immunodéficiency des patients est par conséquent un facteur risque important dans le développement de cancer. Cette observation est également validée par des expériences de transplantation durant lesquelles il a été montré que les cellules cancéreuses provenant de souris immunodéficientes n'arrivaient pas à initier la formation de tumeurs secondaires chez un hôte immunocompétent. À l'inverse les cellules cancéreuses provenant d'un donneur immunocompétent sont capables d'induire la formation de tumeurs secondaires chez un receveur de manière indifférente chez les individus immunodéficient ou immunocompétent [52, 54].

Certaines études cliniques ont également montré d'une part un meilleur pronostic chez des patients atteints de cancer colorectal et ovarien en présence d'un système immunitaire compétent (infiltration importante des cellules CTL et NK) [55, 56] et d'autre part, l'augmentation lors de transplantation chez des receveurs immunodéprimés de développement de cancers dérivés des donneurs [57]. Ces observations cliniques tendent à confirmer les hypothèses sur

modèle murin quant à la capacité du système immunitaire à limiter le développement des cellules cancéreuses.

1.2.3 Définition, classification histologiques de la tumeur

Le cancer est considéré comme une maladie car la prolifération cellulaire qui le caractérise, associée à un tissu sain, est telle que la survie du tissu d'origine est menacée. Chaque cancer peut être classé suivants différents critères dont les plus fréquemment utilisés sont d'une part le grade et d'autre part le stade d'un cancer.

- Le grade (tableau 1.1) se base sur le degré de différenciation cellulaire c'est-à-dire la capacité d'une tumeur à ressembler en termes d'apparence et de fonction au tissu dont elle est issue. Plus la ressemblance est nette et homogène, plus on parle de cellule dites différenciées sachant que les tumeurs composées de cellules cancéreuses bien différenciées ont tendance à se développer moins rapidement et donc à être moins agressives.

GX		Impossible d'évaluer le grade
G1	Bien différenciée	Bas grade
G2	Modérément différenciée	Grade intermédiaire
G3	Peu différenciée	Haut grade
G3	Indifférenciée	Haut grade

TABLE 1.1 – Les different grades d'une tumeur.

- Le stade ou degré d'extension se fonde sur le système TNM : (T) la taille de la tumeur primitives et/ou de ses extensions aux tissus et organes de voisinage, (N) l'importance de la dissémination aux ganglions lymphatiques régionaux et (M) la présence ou l'absence de métastases. Chacune des lettres est suivie d'un chiffre variant de 0 (en cas d'absence) à 4 (stade avancé) ou d'un X lorsqu'il y a impossibilité d'évaluation. Le score TNM permet ensuite de déterminer le stade de la tumeur entre 0 et IV pour les plus dangereuses. Chaque type de cancer possède sa propre classification TNM notamment en fonction de la lettre T traduisant la taille de la tumeur primitives et/ou de ces extensions ainsi que pour la lettre N. Le tableau 1.2 regroupe la classification TNM relative au cancer colorectal.

1.3 Stratégies Thérapeutiques

La stratégie thérapeutique pour le traitement du cancer dépend de différents paramètres : stade du cancer, l'emplacement et l'étendue de la tumeur, l'état de santé global du patient. Les traitements du cancer passent nécessairement par la chirurgie appelée également résection. L'objectif est d'extraire la tumeur du patient et donc la majorité des cellules cancéreuses

Tumeurs primitives (T)

TX	Impossible d'évaluer la tumeur primitive
T0	Aucun signe de tumeur
Tis	Tumeur limitée au revêtement interne ou à la couche du tissu conjonctif de la muqueuse du côlon et du rectum
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculaires
T3	Tumeur envahissant la couche appelée sous-séreuse ou bien le tissu entourant le côlon et le rectum
T4	Tumeur envahissant directement d'autres organes ou structures ou qui passe à travers la membrane qui recouvre l'extérieur des organes

Ganglions lymphatiques régionaux (N)

NX	Impossible d'évaluer les ganglions lymphatiques régionaux
N0	Absence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux
N1	Présence de métastases dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N2	Présence de métastases dans au moins 4 ganglions lymphatiques régionaux

Métastases à distance (M)

M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

TABLE 1.2 – Classification TNM du cancer colorectal.

de son corps. Cependant, différents cas de figure peuvent se poser et nécessiter des traitements adjuvants qui sont de plus en plus sélectifs afin d'agir uniquement sur les cellules cancéreuses. Cela permet de diminuer les effets secondaires liés aux traitements. On associe souvent différentes stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer. Dans cette partie, les différents traitements actuellement utilisés ainsi que leurs modes d'actions seront abordés. Une attention particulière sera apportée aux traitements spécifiques au cancer colorectal.

1.3.1 La Résection

Le but de la chirurgie est d'abord un contrôle local du développement tumoral avec la suppression d'une partie ou de la totalité des cellules cancéreuses. Cela permet également de réaliser différentes analyses sur les cellules afin de déterminer les mutations que les cellules ont subies et ainsi sélectionner les voies de thérapies adjuvantes à privilégier.

La principale difficulté de la chirurgie est d'estimer les marges de sûreté à prendre en compte lors de l'exérèse³. En effet, des marges trop faibles peuvent laisser des cellules cancéreuses sur l'organe et conduiront probablement à une récurrence locale. À l'inverse, une marge trop importante peut endommager l'organe sur lequel est présente la tumeur et donc conduire à des pertes de fonctionnalité.

3. Une exérèse est une intervention chirurgicale consistant à retirer de l'organisme un élément qui lui est nuisible ou inutile (organe, tumeur, corps étranger, etc.).

La résection est également envisagée après un premier traitement adjuvant. Celui-ci est utilisé avec l'intention de diminuer le volume tumoral et donc de faciliter la marge de manœuvre lors de la résection. Le traitement peut également diminuer la vascularisation tumorale ce qui facilitera également l'exérèse.

Pour faciliter le travail de chirurgie, de nombreuses imageries médicales sont réalisées afin d'avoir une idée précise de la localisation de la tumeur.

La résection est différente de la biopsie dans le sens que cette dernière est une exérèse très limitée en quantité d'une partie de la tumeur qui sera analysée afin d'identifier les mutations des cellules mais également, suite à une analyse histologique, de déterminer le grade de la tumeur.

1.3.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'usage de substances chimiques pour traiter une maladie. Aujourd'hui le terme est de plus en plus associé au traitement spécifique du cancer. La plupart des chimiothérapies anticancéreuses sont destinées à arrêter la prolifération cellulaire en inhibant la mitose. Cette opération est réalisée en attaquant directement l'ADN des cellules cancéreuses. De nouvelles stratégies sont mises en place en tenant compte de la biologie des tumeurs en visant notamment les altérations particulières évoquées dans la section précédente 1.2. Ces stratégies sont par conséquent de plus en plus personnalisées ce qui permet d'utiliser le type de chimiothérapie le mieux adapté et de limiter également les doses de traitement.

Il est possible de classer les principales chimiothérapies en cinq catégories suivant leur mode d'action :

- **Agents alkylants** : sont utilisés comme première étape de traitement. L'action de ces substances repose sur le transfert de groupements alkyles dans l'ADN ou dans les protéines des cellules cancéreuses. Cette alkylation au niveau de l'ADN se fait par accroche d'un groupement moléculaire sur les nucléotides guanines (et plus rarement l'adénine, la thymine et la cytosine) [3]. Il peut donc exister différentes configurations (voir figure 1.3.1) dont : l'accroche du groupement sur un seul nucléotide (mono-adduit), l'accroche du groupement sur deux nucléotides du même brin d'ADN (pontage intra-brin), l'accroche du groupement sur un nucléotide de chaque brin d'ADN (pontage inter-brin) ou les pontages de protéines sur un brin d'ADN [58]. Une fois ces pontages réalisés, les deux brins d'ADN ne peuvent alors plus être séparés ni déroulés. Cette modification empêche les processus essentiels de la cellule que sont notamment la duplication de l'ADN pour la division cellulaire ou la transcription de l'ADN nécessaire pour l'assemblage des acides aminés en protéines [3]. Les mécanismes de détection et de réparation vont alors se mettre en place en provoquant l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, G2 et M à travers l'expression des protéines p53 et p21 puis la mort de la cellule par apoptose à travers l'activation des caspases [59] ;

- **Antimétabolites** : les antimétabolites constituent une famille de molécules anti tumorales dont le principe est d'interférer le plus possible avec la synthèse des constituants de l'ADN. Les bases nucléiques de l'ADN sont constituées soit d'un groupe Pyrimidine ($C_4H_4N_2$) formant ainsi la cytosine, la thymine et l'uracile, soit d'un groupe Pyrimidine($C_4H_4N_2$) combiné à un groupe imidazole ($C_3H_4N_2$) pour former les Purines que sont l'adénine et la guanine. Ce type de traitement consiste à utiliser des structures de bases puriques ou pyrimidiques dont la structure est analogue à celle des bases nucléiques dans le but de générer des acides nucléiques anormaux [60] et donc empêcher la synthèse d'ADN et la division cellulaire. Une seconde voie d'action est l'utilisation d'analogues foliques [60] (acide folique plus connu sous le nom de vitamine B₉). L'acide folique une fois activé est essentiel à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Ainsi en intercalant des analogues foliques, la synthèse des acides nucléiques est empêchée ce qui conduit à un arrêt de prolifération ;
- **Alcaloïdes végétaux** : les alcaloïdes végétaux sont des molécules à bases azotées dérivées des végétaux qui empêchent la mitose cellulaire. Dans les cellules il existe des fibres appelées microtubules (composées de tubuline) qui participent entre autre à la formation du fuseau mitotique dans la phase de mitose. Ce fuseau permet le déplacement aux pôles de la cellule des chromosomes avant la division cellulaire [61]. En empêchant la formation de microtubules ou en modifiant leurs dynamiques il est impossible à la cellule de se diviser et elle rentre alors dans une phase de mort cellulaire par apoptose ;
- **Topoisomérases de type I et II** : les topoisomérases sont des enzymes qui participent à la structure de l'ADN. Généralement en plus de la formation en double hélice il existe des supertours causés par l'ajout de tours supplémentaire dans un ADN circulaire. Les enzymes topo-isomérases I et II permettent le découpage d'un ou des deux brins de l'ADN afin de dérouler la double hélice et de séparer les deux brins. Cette étape est particulièrement importante dans la réplication de l'ADN et pour la transcription en ARN. Ces enzymes sont également utiles lors de la recombinaison de l'ADN mais aussi des réparations [62, 63]. Une stratégie thérapeutique commune est donc d'injecter au patient des inhibiteurs de topoisomérases qui vont cibler prioritairement les cellules cancéreuses afin de causer des cassures dans l'ADN de ces dernières et induire une mort par apoptose à la suite de l'arrêt du cycle cellulaire ;
- **Thérapies ciblées** : les thérapies ciblées se concentrent sur la compréhension et l'identification des différentes altérations des cellules cancéreuses ainsi que des potentiels dérèglements dans les voies de signalisation. Dans cette stratégie thérapeutique on utilise généralement des anticorps ayant la capacité de se fixer à certains récepteurs et donc de bloquer l'induction du signal qui lui est associé.

Aujourd'hui il existe bon nombre de chimiothérapies utilisées dans le domaine médical pour le traitement du cancer colorectal. En voici une liste non-exhaustive :

- Agents alkylants : oxaliplatine[64] ;

- Antimétabolites : 5-fluorouracile, capétabiline, uracile-tégafur, acide folinique, raltitrexel ;
- Inhibiteurs topoisomérases : irinotecan [65] ;
- Thérapies ciblées : cétuximab, bevacizumab ;
- Combinaisons de produits : FOLFOX [66], FOLFIRI [67].

1.3.3 La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) dite aussi photochimiothérapie fonctionne à partir de deux composants non toxiques. Le premier est une substance chimique photosensibilisante qui doit dans un premier temps atteindre les cellules cancéreuses avant d'être activée. Le photosensibilisant doit dans l'idéal être non toxique et ne pas posséder d'activité thérapeutique propre. Le second composant est une source lumineuse dont la longueur d'onde correspond exactement à l'excitation du photosensibilisant. Cette lumière peut être transportée jusqu'à la zone de traitement par voie endoscopique ce qui rend le traitement peu invasif. L'irradiation interne de la zone à traiter permet de limiter également la détérioration des cellules saines dans le corps.

L'excitation du photosensibilisant va conduire à deux types de réactions photochimiques majeures. La première consiste à une oxydoréduction des molécules biologiques lors du retour à l'état fondamental du photosensibilisant. Dans ce cas, différents radicaux vont être générés conduisant à une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle ($\bullet OH$). La seconde réaction est le transfert d'énergie sur l'oxygène moléculaire représenté figure 1.3.2. Ce transfert permet la formation de l'oxygène singulet excité (1O_2) dont la toxicité est importante dans son environnement proche [68]. Cette molécule a une durée de vie très courte dans les milieux organiques (inférieure à 40 nanosecondes [69]) ce qui correspond à un rayon d'action d'environ 20 nm [69]. Dans les deux cas la présence d'oxygène dans les tissus est essentielle pour la production de ROS.

L'action de destruction des tumeurs par photochimiothérapie est contrôlée par trois principaux mécanismes pouvant interagir entre-eux [70] :

- Action directe : **production de ROS et d'oxygène singulet** à l'intérieur des cellules cancéreuses induisant d'importants dommages à l'ensemble des organites présents dans le cytoplasme mais également aux différentes membranes. En fonction du type et de la sévérité des dommages les processus de mort peuvent être l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie. La présence d'oxygène mais également de photosensibilisant en quantité suffisante dans les cellules est primordiale pour une bonne efficacité du traitement. Des recherches ont montré que la distribution en photosensibilisant dans les cellules est inversement proportionnelle à la distance séparant les cellules du plus proche système vasculaire [71] ;
- Action indirecte : **destruction de la vascularisation tumorale**. La thérapie pho-

todynamique induit des dommages vasculaires dus à une vasoconstriction immédiate des vaisseaux suivie quelques heures plus tard d'un collapsus [72]. Sans afflux sanguin, les cellules cancéreuses passent alors en hypoxie et en anoxie avant de mourir [73] ;

- Action indirecte : **Réponse inflammatoire induite par PDT**. Suite à un traitement photodynamique des infiltrations de lymphocytes, leucocytes et macrophages ont été observées dans les tissus traités [74, 75]. En comparant l'effet du traitement sur des souris immunocompétentes et immunodéprimées, Korbélik *et al.* ont constaté un effet immédiat similaire pour les deux populations de souris mais un effet à long terme en défaveur des souris immunodéprimées avec une reprise tumorale [74, 75].

1.3.4 La radiothérapie

La radiothérapie (RT) est une stratégie thérapeutique impliquant l'utilisation de radiations pour détruire des cellules cancéreuses. Cette stratégie est l'une des plus anciennes et l'une des plus utilisées en complément de la chirurgie. On définit le Transfert d'Énergie Linéaire (LET) pour caractériser la dose, c'est-à-dire la quantité d'énergie que reçoit une cible. L'augmentation de cette énergie se traduit par une augmentation des dommages induits par ces radiations. Le LET décrit également la capacité de pénétration des rayonnements dans les tissus humains. Les radiations utilisées sont de toutes sortes : rayons X, gamma, radiations avec protons, neutrons, électrons, ions carbone

Il existe deux catégories de radiothérapie : la radiothérapie interne et la radiothérapie externe. La radiothérapie externe (ou trans-cutanée) utilise une source de radiation (généralement gamma) placée à l'extérieur du patient. La source utilisée était anciennement un télécobalt à base de cobalt 60. Plus récemment les accélérateurs linéaires de particules se sont imposés. Les rayonnements émis par la source sont dirigés sur le patient dont ils traversent la peau afin d'atteindre la tumeur où ils sont focalisés. Le principal effet secondaire de la radiothérapie est l'irradiation de cellules et de tissus sains. Afin de limiter cela, de nouvelles technologies dite de radiothérapies conformationnelles 3D permettent de faire correspondre le plus précisément possible le volume de la tumeur et la distribution des radiations sur le patient. Nombre d'examen médicaux sont réalisés (scanners, IRM...) dans le but d'obtenir une image en 3D la plus fidèle possible de la tumeur mais également des organes sains qui lui sont proches. Ces données permettent ainsi de réaliser un traitement plus sécurisé pour le patient tout en réduisant l'exposition des tissus sains aux radiations. Il en résulte un taux de survie beaucoup plus élevé qu'avec une méthode conventionnelle [76].

A partir d'une démarche similaire, une nouvelle stratégie a été développée : la RT stéréotaxique. Pour cette technique il est impératif d'avoir la représentation en 3D de la tumeur et des organes proches. Les radiations gamma ne sont plus émises par une seule source mais par 201 (ou 192 suivant la date de fabrication) sources de cobalt 60 de plus basse intensité et réparties autour du patient. Un logiciel optimise l'orientation et la focalisation de chaque source afin d'adapter la zone irradiée à la morphologie de la tumeur. Ainsi, les zones saines

proches de la tumeur ne reçoivent que peu de radiations alors que la tumeur reçoit une dose extrêmement importante. On peut observer une représentation de ce mode de traitement et l'estimation de la dose reçue sur la figure 1.3.3. On estime ainsi que la zone de focalisation des radiations reçoit une dose environ mille fois supérieure à la dose reçue par les cellules saines alentours. Cette technique est particulièrement indiquée pour le traitement de tumeurs à risques où la chirurgie et les autres modes de radiothérapie sont trop risqués ce qui est notamment le cas des tumeurs sur la moelle épinière [77].

Le second mode de traitement, dit interne, consiste à utiliser une source de rayonnement (généralement une source radioactive) à l'intérieur du patient ou à proximité immédiate des cellules cancéreuses. La méthode la plus couramment utilisée est la Curiethérapie. Différentes sources radioactives sont utilisées dont : l'iridium 192, l'iode 125 et le césium 137. L'implantation de ces sources se fait sous la forme de billes et de petits fils pour une durée limitée (dans le cas de traitements à forte dose) ou permanente (traitement à bas débit de dose) dans le corps du patient.

Les radiations ionisantes vont permettre un certain nombre d'interactions avec les atomes des milieux visés. Ainsi par transfert d'énergie et même par ionisation, les molécules irradiées vont induire des dommages à l'ADN des cellules et altérer les protéines de leur environnement. La cellule étant composée principalement d'eau, la génération de radicaux libres par radiation ionisante va conduire *in fine* à des dommages importants pour la cellule. On peut donc facilement comprendre que la présence d'oxygène est importante pour la génération des radicaux oxygénés utilisés par la radiothérapie pour le traitement des cellules cancéreuses.

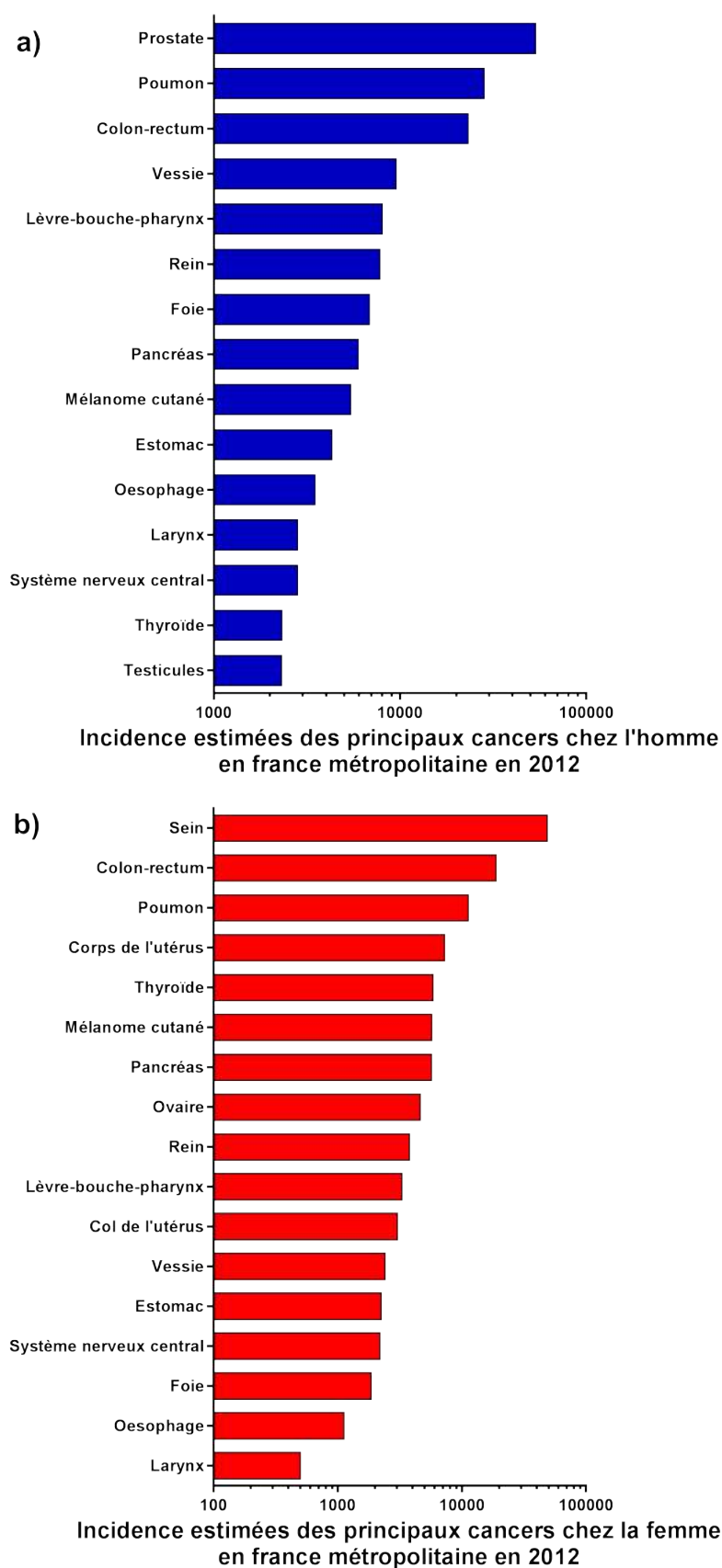


FIGURE 1.1.1 – Nombre de nouveaux cas de cancer par an par site de localisation chez les hommes (a) et chez les femmes (b), standardisé en âge, en France au cours de l'année 2012

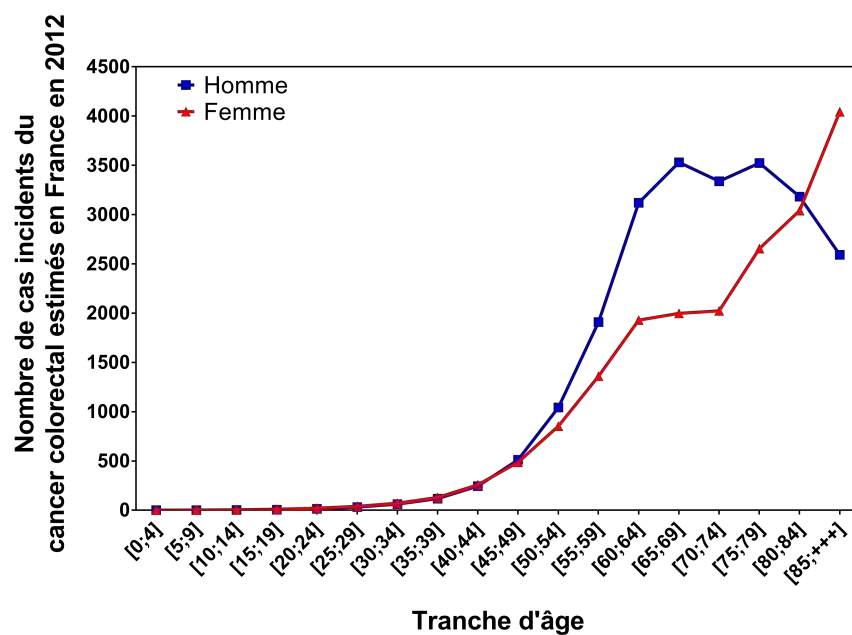


FIGURE 1.1.2 – Nombre de nouveaux cas de cancer colorectal par an par tranche d'âge en France au cours de l'année 2012

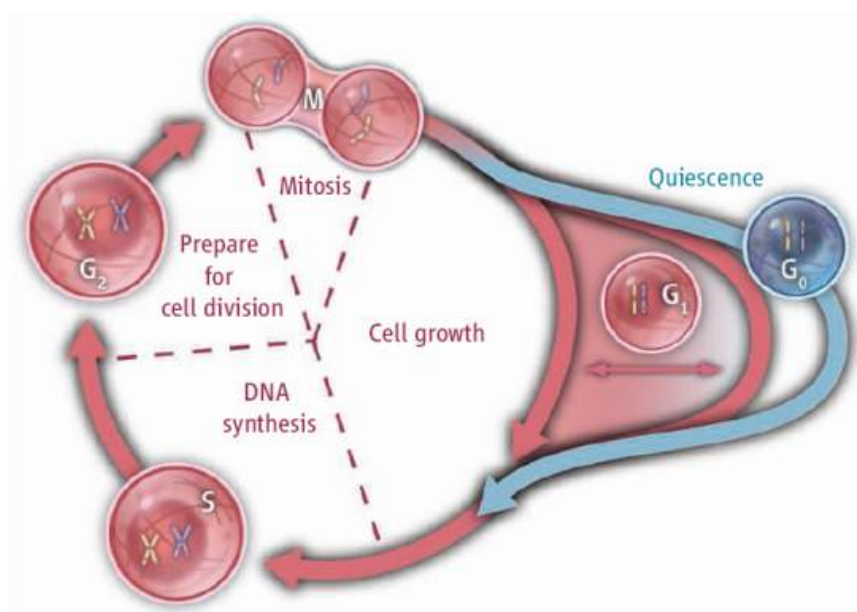


FIGURE 1.2.1 – Les phases du cycle cellulaire d'après [1]

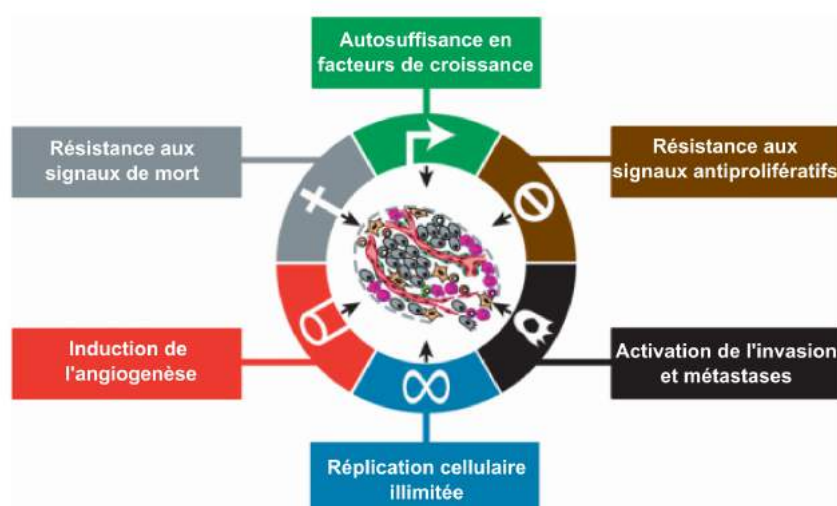


FIGURE 1.2.2 – Mécanismes d'altérations conduisant à la cancérisation cellulaire, d'après [2]

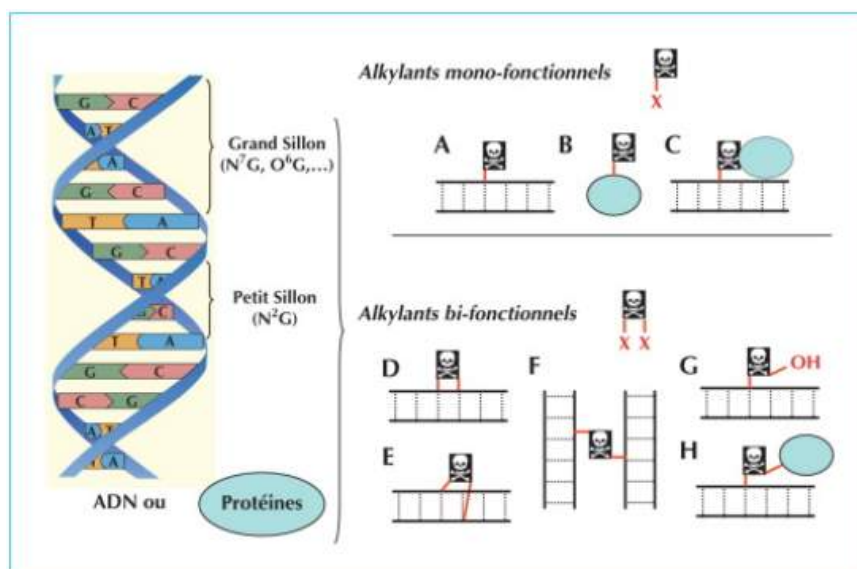


FIGURE 1.3.1 – Structures des adduits générés par l'alkylation de l'ADN (extrait de [3]).

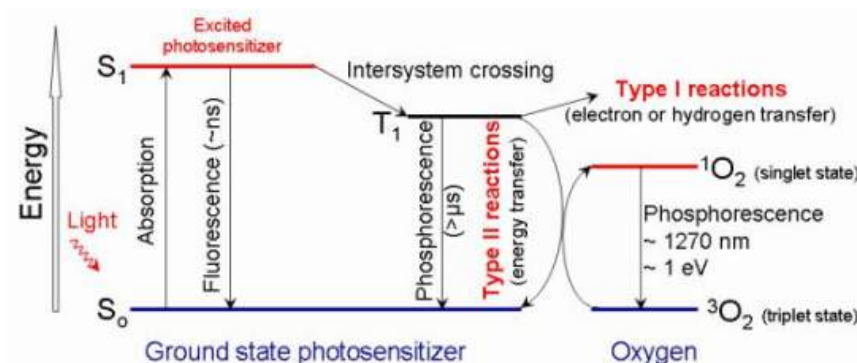


FIGURE 1.3.2 – Processus de thérapie photodynamique (extrait de [4])

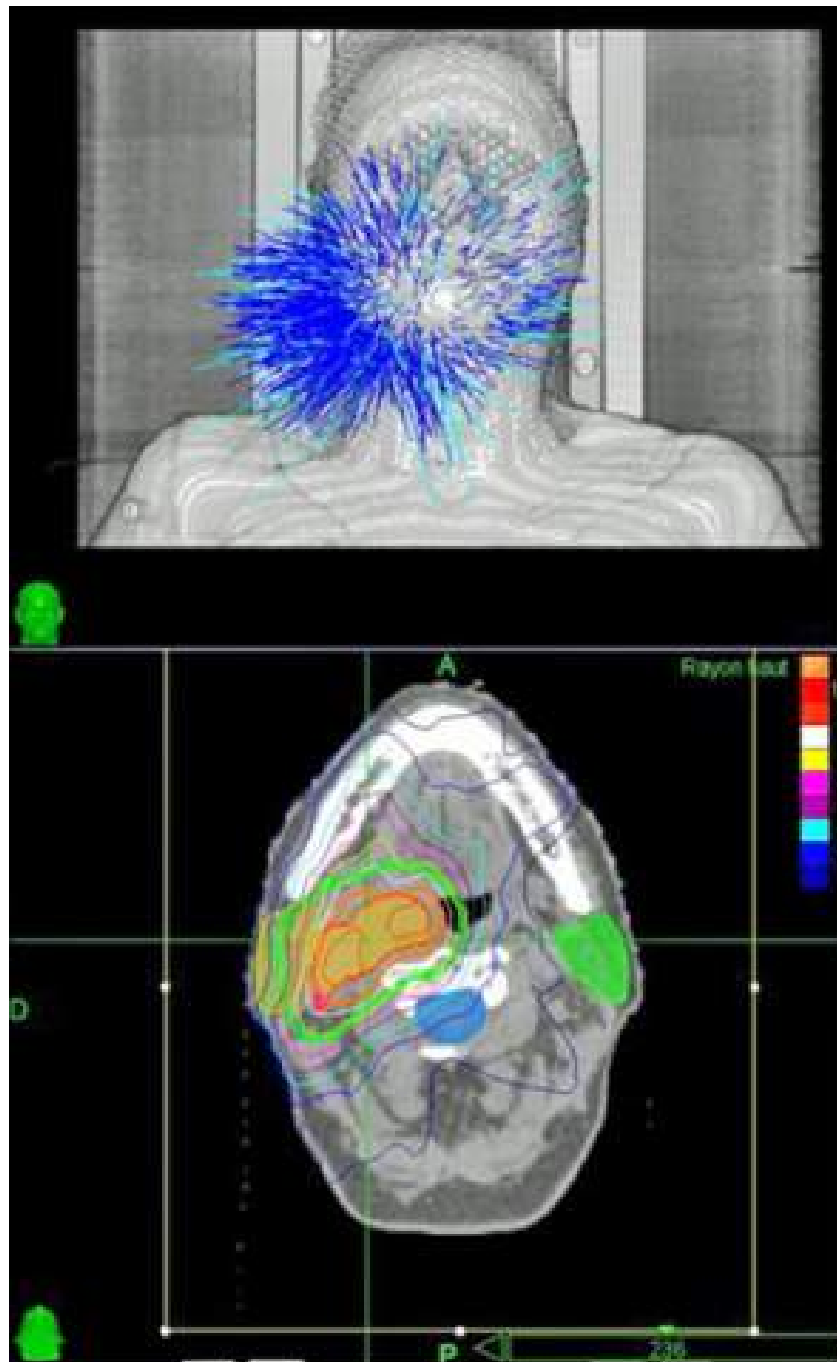


FIGURE 1.3.3 – Radiothérapie stéréotaxique utilisant le *gamma knife*. Direction des faisceaux d'irradiations (haut) et modulation d'intensité (bas) pour le traitement d'un paragangliome (extrait de [5])

Chapitre 2

Plasmas froids à la pression atmosphérique et applications biomédicales

Le plasma est un état de la matière composé d'électrons, d'ions et d'espèces neutres électriquement mais pouvant être dans un état d'énergie fondamental ou excités. Bien que le milieu plasma soit électriquement neutre à une échelle macroscopique, il est constitué d'éléments porteurs de charges électriques ce qui en fait par conséquent un milieu électriquement conducteur. Le plasma génère également des photons couvrant une région du spectre électromagnétique allant des rayons X à l'infrarouge lointain ainsi qu'un champ électrique.

Les dispositifs utilisés pour générer des plasmas froids sont généralement de nature électrique. Ils peuvent opérer sous différentes conditions de pressions, avec différents modes d'excitation (continu, alternatif, impulsionnel) et sur une plage de fréquences très large allant du régime continu au domaine micro-onde. Ainsi les compositions et les propriétés des plasmas froids sont très variables d'un dispositif à un autre. Les dispositifs générant des plasmas froids sont utilisés pour de nombreuses applications parmi lesquelles on peut citer la modification de surface, la propulsion spatiale, la découpe de matériaux, le traitement de gaz pollué et enfin la thématique sur laquelle portent ces travaux de thèse : les applications biomédicales et plus particulièrement le traitement de cancer colorectal.

Ce chapitre a pour objectif de présenter différentes sources de plasma froid couramment utilisées pour des applications biomédicales à la pression atmosphérique.

2.1 Caractéristiques des plasmas froids à la pression atmosphérique pour des applications biomédicales

Le terme plasma regroupe l'ensemble des gaz en partie ou en totalité ionisés. Pour pouvoir réaliser une classification plus précise, nous disposons de nombreux critères :

- Le degré d'ionisation α (Eq2.1.1) par exemple compare la concentration des électrons libres (n_e : nombre d'électrons libres par unité de volume) par rapport à celle des éléments neutres (n_0). La génération de ces porteurs de charges électriques à partir d'un gaz composé uniquement d'éléments neutres électriquement demande une énergie suffisamment importante pour pouvoir modifier la structure électronique des espèces produisant ainsi des espèces excitées puis des espèces ionisées. Le degré d'ionisation peut ainsi varier de 10^{-8} pour des gaz très faiblement ionisés comme le plasma interstellaire jusqu'à 1 pour un gaz complètement ionisé rencontré dans le cœur des étoiles ou les plasmas de fusion nucléaire. Les plasmas utilisés pour des applications médicales à la pression atmosphérique ont un degré d'ionisation généralement compris entre 10^{-7} et 10^{-4} .

$$\alpha = \frac{n_e}{n_e + n_0} \quad (2.1.1)$$

- La température des plasmas est un critère complexe dans le domaine des plasmas. En effet, dans un plasma, il peut exister une seule et unique température pour toutes les espèces¹ composant ce dernier comme il peut en exister une multitude. Suivant la nature des transferts d'énergie entre les particules du plasma, chacune des espèces peut avoir une distribution d'énergie (à laquelle on associe une température) qui lui est propre ou qui est commune avec les autres espèces. Ainsi on classe généralement les plasmas en deux grandes catégories : les plasmas à l'équilibre thermodynamique ou les plasmas hors équilibre thermodynamique. Dans le cas de l'équilibre thermodynamique les particules possèdent une température identique $T = T_e = T_i = T_n$ (avec pour indice e correspondant aux électrons, i aux ions et n pour les neutres). A l'inverse, pour des plasmas hors équilibre thermodynamique, les électrons ont généralement une énergie moyenne (et donc une température) beaucoup plus élevée que celle des autres espèces du plasma (ions et neutres). Ces plasmas, généralement faiblement ionisés, présentent un intérêt certain pour les applications biomédicales car leur température apparente est proche de la température ambiante. Leur dénomination la plus courante est « plasmas froids ».
- La pression n'est pas à proprement dit une propriété du plasma mais est au contraire un paramètre qui va conditionner en partie le type de plasma obtenu. En effet, à basse pression les collisions sont relativement peu nombreuses et le transfert de quantité de mouvement entre les électrons et les atomes reste faible. Ainsi le plasma n'est pas à l'équilibre thermodynamique avec une température des électrons bien supérieure (d'un à deux ordres de grandeur) par rapport à la température des espèces lourdes. En augmentant la pression, le libre parcours moyen entre les particules du plasma diminue, le nombre de collisions augmente et les différentes températures se rapprochent faisant tendre le plasma vers l'équilibre thermodynamique.

Alors que la température élevée que l'on peut obtenir avec un plasma à l'équilibre ther-

1. On entend par « espèce » : les électrons, les ions et les atomes et molécules neutres électriquement

modynamique est essentielle pour un grand nombre d'applications, la plupart (pour ne pas dire la totalité) des applications biomédicales nécessite au contraire des températures relativement basses pour ne pas porter atteinte aux tissus biologiques ou au matériel médical exposés au plasma. Cette contrainte de température va de paire avec la pression. En effet, si un plasma basse pression peut être utilisé pour la stérilisation de matériel médical, il n'est pas envisageable de soumettre un patient à la basse pression. C'est pourquoi de nombreuses techniques ont été développées pour générer des plasmas froids à la pression atmosphérique. Nous dresserons dans la suite de ce chapitre une liste non exhaustive des sources plasmas utilisées pour des applications biomédicales à la pression atmosphérique en mettant en avant les sources de plasma qui ont été utilisées au cours de ces travaux. Nous aborderons ensuite l'action indirecte des plasmas froids à la pression atmosphérique sur le vivant.

2.2 Dispositifs générant des plasmas froids à la pression atmosphérique pour des applications biomédicales

Pour les applications biomédicales à la pression atmosphérique, on recense quatre grandes familles de dispositifs plasma : Les décharges couronnes, les micro-décharges à cathode creuse, les décharges à barrière diélectrique (DBD) et les jets de plasma froid. Ces dispositifs et leurs applications biomédicales vont être détaillés dans la suite de cette section.

2.2.1 Décharge couronne

L'effet couronne ou effet corona correspond à une décharge partielle (sans passage à l'arc) dans un fluide neutre, généralement de l'air, où règne un fort champ électrique. Ce champ électrique peut être induit entre deux électrodes reliées à un générateur de haute tension continue, alternative ou pulsée. L'effet couronne se produit avec des électrodes dissymétriques. On distingue les configurations, pointe-plan, fil-cylindre et fil-plan (voir fig.2.2.1). Si l'électrode ayant le rayon de courbure le plus faible (la pointe ou le fil) est alimentée avec une tension continue positive par rapport à l'autre électrode, on parle de décharge couronne positive et de décharge couronne négative dans le cas contraire. Cette distinction est particulièrement importante car les phénomènes induits lors de la décharge diffèrent significativement tant par leur nature que par la quantité des espèces chimiques formées par la décharge. Par exemple, une décharge couronne négative produit une concentration beaucoup plus importante d'ozone qu'une décharge couronne positive. Plus de précisions pourront être trouvées dans les références suivantes [78, 79].

L'inconvénient majeur des décharges couronnes continues est le risque de passage à l'arc entre les deux électrodes si la tension appliquée entre ces dernières est trop importante². Il en résulte une forte détérioration des pointes dans les configurations pointe-plan, une

2. On augmente la tension afin de produire davantage d'espèces chimiques

contamination de l'environnement à proximité de la pointe et un échauffement du gaz qui peut devenir significatif. Afin de réduire le risque d'apparition de ce phénomène et pour produire davantage d'espèces chimiques, on alimente les électrodes avec un générateur haute tension alternative avec une fréquence de quelques kHz généralement ou mieux encore, en utilisant un générateur de tension impulsivonne dont la durée d'impulsion est choisie de sorte que la tension inter-électrode repasse à zéro avant l'apparition d'un arc électrique inter-électrode.

Les décharges corona sont utilisées depuis plus de 100 ans pour générer de l'ozone. On les retrouve dans des dispositifs pour purifier l'eau ou les circuits de ventilation. Concernant les applications médicales des décharges corona, de nombreux travaux ont été menés avec différents types de décharges couronne. On peut citer par exemple des travaux sur la stérilisation de surface par le traitement de bactéries [80, 81, 82, 83] et de biofilms bactériens [84, 85, 86, 87] ou bien encore des expériences sur des cellules cancéreuses *in vitro* [88].



FIGURE 2.2.1 – Photographie d'une décharge corona multi-pointes pulsée au laboratoire LAPLACE. Conditions expérimentales : tension d'alimentation 8kV, durée d'impulsion 40 μ s, fréquence de répétition 100Hz, distance anode/cathode 8mm et rayon de courbure des pointes 25 μ m, 14 pointes disposées en deux rangées de 7 pointes. D'après[6]

2.2.2 Micro décharges à cathode creuse

La tension de claquage est une caractéristique propre à chaque gaz dépendant d'un produit pression $\times$ distance. Cette relation est généralement connue sous le nom de courbe de Paschen dont un exemple est donné figure 2.2.2 pour l'air à la pression atmosphérique.

Contrairement aux prédictions de cette loi, la tension de claquage n'augmente pas exponentiellement pour de très faibles distances inter-électrode. En effet, Slade *et al* ont montré que, pour des distances inter-électrodes très faibles (globalement inférieure à 5 μm et à la pression atmosphérique), la tension de claquage est proportionnelle à la distance inter-électrode [7]. Il est donc possible de former des plasmas à la pression atmosphérique avec des tensions d'alimentations relativement basses en diminuant l'espace inter-électrodes. C'est le principe d'une catégorie de plasmas froids référencée sous le terme Micro Décharge à Cathode Creuse (*Micro Hollow Cathode Discharges*) dont un dispositif est représenté figure 2.2.3. Avec ces dispositifs, il est possible d'obtenir des plasmas froids d'un rayon de quelques centaines de micromètres dans des gaz très variés parmi lesquels l'argon, l'air, le néon et xénon sont les plus étudiés avec ce type de dispositif [89].

L'inconvénient majeur de ces dispositifs pour les applications biomédicales concerne les dimensions géométriques limitées des dispositifs qui imposent une multiplication des cellules élémentaires afin d'obtenir une surface suffisante de traitement [90]. La taille réduite de plasma oblige également à prendre en compte le déplacement du dispositif lors du traitement pour obtenir un résultat homogène.

Ce type de dispositif a été utilisé dans des applications biomédicales traitant particulièrement de l'inactivation de bactéries [91, 92, 93] ou du blanchiment des dents [94, 95].

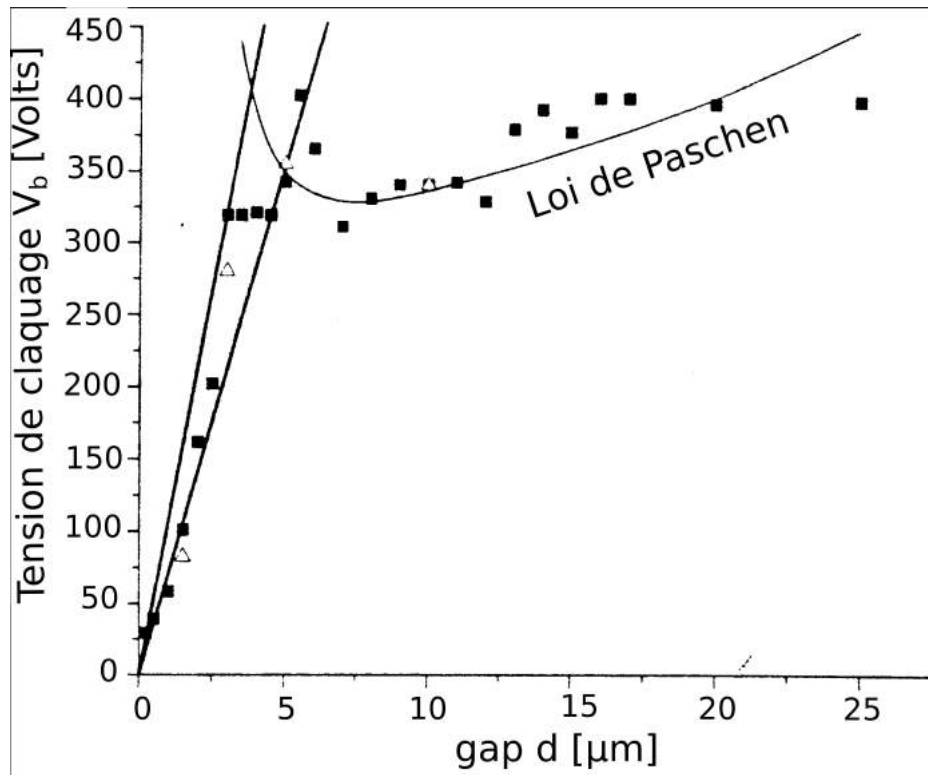


FIGURE 2.2.2 – Tension de claquage électrique dans l'air à la pression atmosphérique en fonction du gap anode/cathode séparant deux contacts métalliques de type pointe/pointe. Données expérimentales comparées à la loi de Paschen [7]

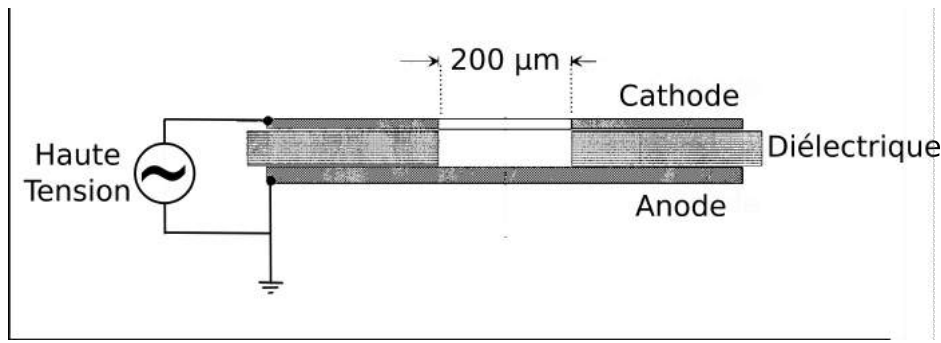


FIGURE 2.2.3 – Vue en coupe d'un dispositif de micro décharge à cathode creuse . D'après [8].

2.2.3 Décharges à barrière diélectrique

La contrainte majeure dans la conception d'un dispositif de plasma froid est d'éviter le passage à un régime d'arc électrique. Une des solutions les plus utilisées consiste à intercaler au moins une barrière diélectrique entre les électrodes du dispositif. Lorsque le champ électrique induit par une différence de potentiel électrique imposée entre les électrodes est suffisamment élevé on assiste à la formation d'un canal conducteur d'une électrode vers l'autre à travers le gaz. Alors que le déplacement des charges électriques dans le gaz produit une avalanche électronique, un diélectrique, placé entre les deux électrodes, accumule les charges qui atteignent sa surface. Il en résulte un champ électrique qui, étant opposé au champ géométrique, empêche l'apparition de l'arc électrique et conduit à l'extinction de la décharge. La durée de vie du canal conducteur étant un phénomène estimé à une centaine de nanosecondes, il n'y a pas suffisamment de collisions entre les espèces chargées et les neutres pour générer un échauffement significatif du gaz [96]. En raison du caractère transitoire de ce type de décharge, il est indispensable d'utiliser une alimentation alternative pour permettre la génération successive de décharges.

Les dispositifs fonctionnant sur le principe des décharges à barrière diélectrique ont généralement une configuration plan-plan ou cylindre-cylindre (voir figure 2.2.4.a) avec au minimum un diélectrique solide recouvrant l'une des électrodes. La configuration plan-plan est privilégiée dans le cas de traitement de surface alors que la configuration cylindrique est plus adaptée aux traitements d'effluents gazeux. Les dimensions caractéristiques du dispositif DBD sont conditionnées par le produit pression $\times$ distance. Ce type de décharge peut facilement avoir lieu à pression atmosphérique avec une distance inter-électrode généralement de l'ordre du millimètre au centimètre en fonction du type de gaz et de la source de tension utilisés.

Le principal inconvénient de ce type de dispositif est lié au caractère filamentaire de ces décharges produisant par conséquent des inhomogénéités de traitement. Cependant il est possible de générer des plasmas homogènes ou diffus dans l'espace inter-électrodes dans certaines conditions [97, 98]. Il est également possible de remplacer la contre électrode reliée à

la masse de l'alimentation par un corps humain ou tout support suffisamment conducteur. Ce type de dispositif se retrouve sous le terme FE-DBD dans la littérature pour « Floating Electrode - Dielectric Barrier Discharge ». Un exemple de ce dispositif est donné figure 2.2.4.b avec un support biologique conducteur faisant office de contre électrode. L'utilisation d'un tel dispositif offre de nombreux avantages. Le premier est de pouvoir placer l'élément à traiter directement au contact du plasma. Ceci permet un traitement en profitant d'un champ électrique important et un flux de particules chargées pouvant apporter une contribution significative lors d'un traitement biomédical. Le second intérêt est que, dans ce type de décharge, l'énergie dissipée est importante ce qui entraîne une forte réactivité chimique. C'est la raison pour laquelle ce type de décharge a été étudié pour la première fois par la société Siemens au milieu du XIX^{ème} siècle afin d'augmenter la synthèse de l'ozone [99].

Les applications biomédicales des décharges à barrière diélectrique sont essentiellement orientées sur le traitement de graines avec un intérêt pour la décontamination et un autre pour favoriser la germination [100, 101]. Les DBD à électrodes flottantes sont quand à elles plus adaptées pour le traitement de la peau [102, 103, 104].

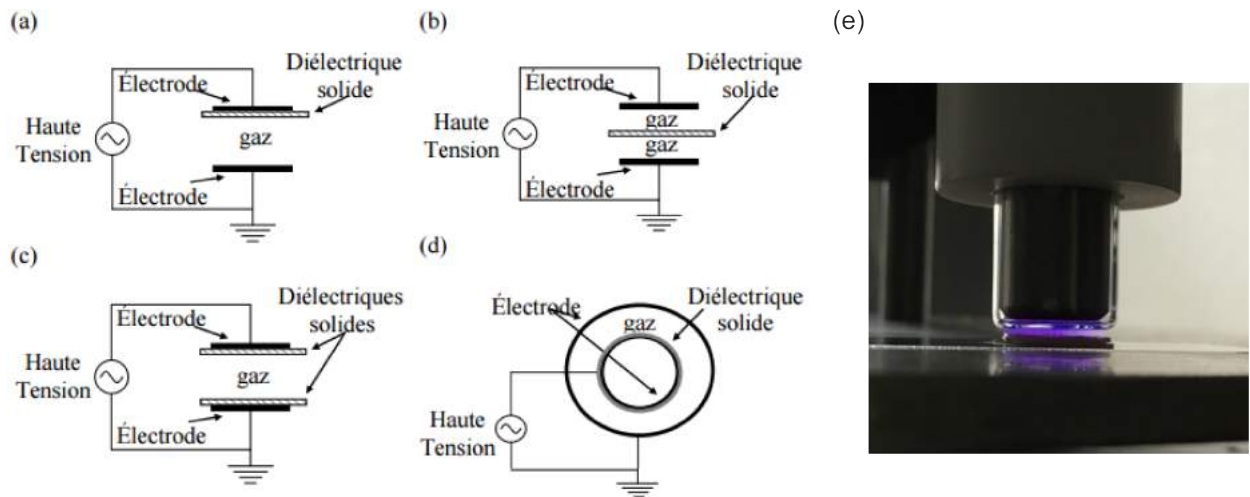


FIGURE 2.2.4 – Configurations classiques de décharges à barrières diélectriques extrait de [9] (a-d) et photographie d'une FE-DBD développée au laboratoire LAPLACE (e).

2.2.4 Les jets de plasma

Il existe de très nombreuses configurations de jets de plasma avec ou sans barrière diélectrique actuellement en développement dans les laboratoires. Nous allons en présenter deux types : le jet DBD et le jet surfatron.

2.2.4.1 Jets de plasma DBD

Ce jet de plasma sera utilisé dans les chapitres 6 et 7 pour des applications de traitement de cellules cancéreuses. De plus, le chapitre 7 traitera du développement d'un jet de plasma

fonctionnant avec de l'argon et une configuration d'électrode différente.

Un exemple de jet plasma DBD est montré sur la figure 2.2.5. La configuration de ce jet est relativement commune (voir par exemple [105, 106]). Des électrodes en aluminium sont enroulées autour d'un tube de quartz de petit diamètre (2 mm de diamètre intérieur et diamètre extérieur de 4 mm). Elles sont séparées par un espace de 10 mm. De l'hélium est injecté dans le tube de quartz avec un débit de quelques litres.min⁻¹. Des impulsions carrées de haute tension sont appliquées entre les électrodes avec une intensité, une fréquence de répétition, et un rapport cyclique ajustables. L'alimentation qui permet d'obtenir des tensions pulsées utilise un circuit push-pull approprié alimenté par un générateur de haute tension continue. Les caractéristiques typiques du signal à haute tension sont les suivantes : temps de montée et de descente de 80 ns à plusieurs centaines de nanosecondes, tension continue allant jusqu'à 10 kV, fréquence de répétition de 1 Hz à 9.69 kHz et largeur d'impulsion de 250 ns à 1.75 s.

Ce genre de dispositif présente l'avantage d'une flexibilité importante permettant le traitement de tissus ou de surfaces. En effet, la géométrie des dispositifs peut être adaptée aux différentes applications. On peut citer par exemple la combinaison de plusieurs jets plasma DBD pour augmenter la surface de traitement et également certaines propriétés [107, 108] ainsi que des dispositifs générant un rideau de plasma pour le traitement de surface [109].

Un second avantage est que, contrairement aux DBD classiques de type plan-plan, la propagation du plasma en dehors du dispositif va provoquer l'excitation des molécules contenues dans l'air dans une zone que l'on appelle la plume plasma. Ainsi, une faible quantité de gaz plasmagène est suffisante pour déclencher des réactions chimiques dans l'air menant à la formation d'une quantité significative d'espèces oxydantes particulièrement intéressantes dans un contexte biomédical.

2.2.4.2 Jets de plasma Surfatron

Un dispositif Surfatron [110, 111, 112] génère des ondes de surface (généralement dans le domaine micro-onde et plus particulièrement à 2.45 GHz) qui sont capables d'initier une décharge dans un gaz circulant à l'intérieur d'un tube en matériau diélectrique (par exemple du quartz) comme indiqué sur la figure 2.2.6. À la pression atmosphérique, le plasma ne remplit pas toute la section transversale du tube de quartz (voir la figure 2.2.7.a).

L'inconvénient majeur concernant ces dispositifs est la température du jet de plasma qui est trop élevée pour traiter sans dommages des supports thermosensibles. Pour parer à ce problème, on fait circuler de l'air comprimé autour du tube de quartz 2.2.6. Cela présente l'avantage de refroidir le tube et de créer des turbulences au niveau de la sortie du tube où le jet de plasma émerge dans l'air ambiant. Ces turbulences, en se mélangeant avec le jet de plasma, permettent d'abaisser significativement la température apparente du jet de plasma. En effet, cette méthode permet de maintenir la température apparente du jet au dessous de 325 K au voisinage de la sortie du tube de quartz alors qu'en l'absence de

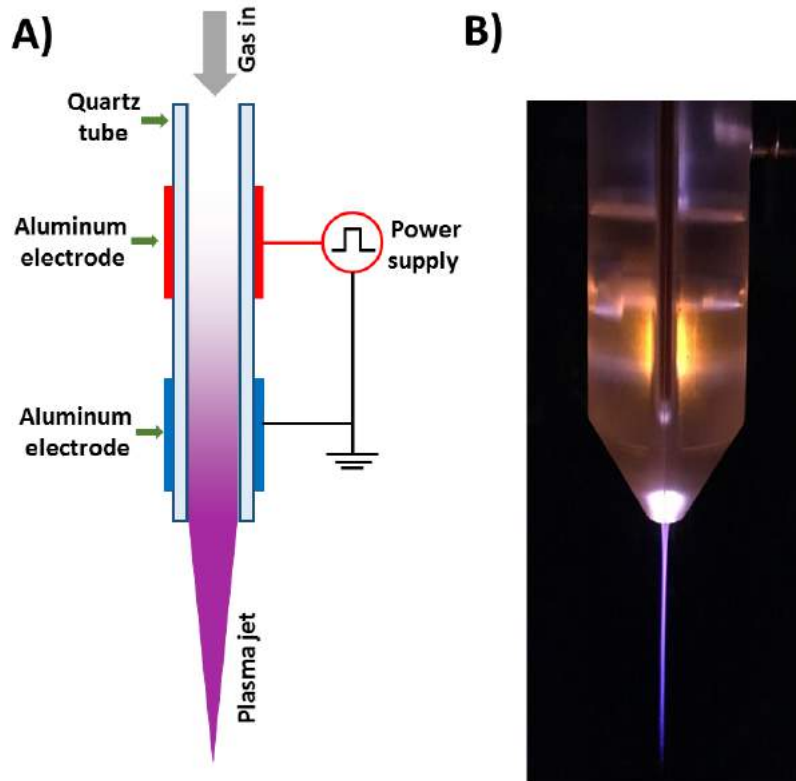


FIGURE 2.2.5 – Schéma d'un jet DBD de plasma à basse température fonctionnant à pression atmosphérique (a) et photographie du jet de plasma avec sa protection électrique lors d'une utilisation d'hélium comme gaz porteur (b).

refroidissement, le jet émerge dans l'air avec une température avoisinant les 1000 K [11]. Il est à noter également que la structure du jet de plasma est modifiée avec le refroidissement par air comprimé. On assiste alors à l'apparition aléatoire de structures filamenteuses comme observées figure 2.2.7.b.

Les dispositifs Surfatron sont particulièrement flexibles et permettent de générer des jets de plasma (ou des flux d'espèces chimiques créées par plasma) à base de mélanges gazeux très variés et sur une très large plage de pression allant de quelques dixièmes de mbar jusqu'à plusieurs bars. La géométrie du dispositif est également modulable. En effet, bien que la plupart des dispositifs Surfatron utilisent un tube de quelques mm de diamètre, il est possible de générer, dans des conditions particulières, un plasma avec un Surfatron dont le tube a un diamètre de 25 cm.

Même si la majorité des applications biomédicales des jets de plasma Surfatron a été réalisée à basse pression (cf. par exemple [113]), des essais à la pression atmosphérique ont donné des résultats intéressants, en particuliers en ce qui concerne la décontamination de bactéries par plasma [10, 114, 115].

2.2.4.3 Applications biomédicales des jets de plasma

Les jets de plasma DBD fonctionnant avec de l'hélium et de l'argon comme gaz porteur sont, dans la littérature, les dispositifs plasma les plus utilisés pour les traitements

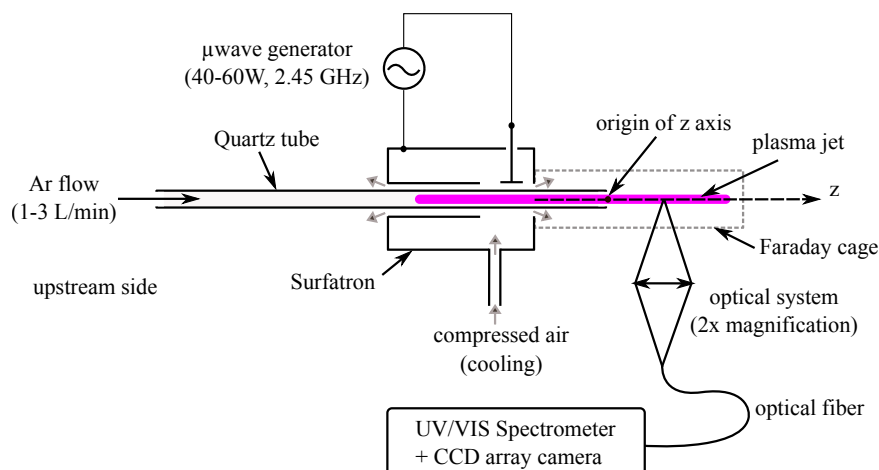


FIGURE 2.2.6 – Schéma de principe du jet d'argon micro-onde utilisé pour le traitement de bactérie. D'après [10]

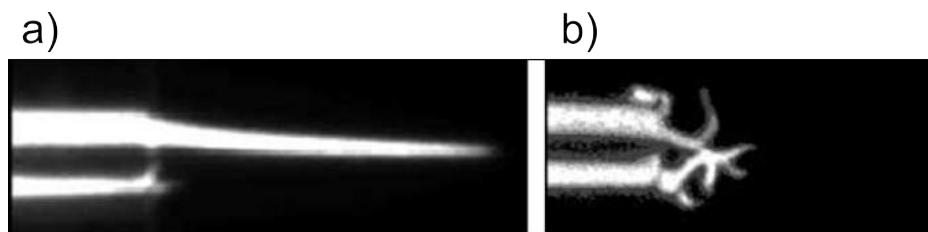


FIGURE 2.2.7 – Photographie du jet de plasma micro-onde sans (a) et avec (b) refroidissement par air comprimé. Extrait de [11]

biomédicaux. On peut citer de manière non exhaustive :

- La décontamination, traitement de bactérie, stérilisation [10, 54, 116, 117] ;
- Le blanchiment ou les soins des dents [106, 118, 119, 120, 121] ;
- La coagulation du sang [102, 122, 123, 124] ;
- Le traitement des ulcères et des plaies chroniques [125, 126, 127, 128] ;
- La modification de surface de matériaux biomédicaux [129, 130, 131] ;
- Le traitement de cellules cancéreuses [132, 133, 134] ;
- Le traitement de fruits et légumes pour augmenter la durée de conservation [135, 136, 137] ;
- Le traitement de graines pour favoriser la germination et la productivité [138, 139, 140].

2.3 Action du plasma sur le vivant

De nombreux processus physiques et chimiques interviennent dans un plasma, en particuliers lorsque ce dernier est en contact direct avec des cellules vivantes ou indirect par l'intermédiaire d'un liquide activé par plasma. Dans cette partie, nous avons recensé les principaux mécanismes dont l'activité sur le vivant est (ou est supposée) significative. Ces différents mécanismes ont une part très variable d'un dispositif plasma à un autre dans

l'efficacité du traitement réalisé. En effet, la nature et la quantité des espèces produites par un plasma dépendent énormément des conditions opératoires ce qui rend particulièrement délicate la comparaison des différents jets de plasma. Nous écarterons d'emblée le rôle direct de l'élévation de la température due au plasma car les jets de plasma froids utilisés pour des applications biomédicales n'induisent pas une augmentation significative de la température des objets traités. Toutefois, l'efficacité d'un traitement plasma peut être améliorée en augmentant la température de l'échantillon exposé au plasma [113].

2.3.1 Effet du champ électrique

Le mouvement des espèces chargées dans le plasma ainsi que le champ géométrique des dispositifs peuvent conduire à un champ électrique localement important au niveau d'un support biologique exposé au plasma. De nombreux groupes de recherche suggèrent par conséquent que l'effet du champ électrique généré par un plasma sur les cellules et les bactéries n'est pas négligeable [141] et pourrait même être, dans certaines configurations particulières, le vecteur principal de stérilisation [142, 143]. À partir de résultats extraits des travaux de Laroussi *et al* [143], Mendis *et al* proposent un scénario connu sous le nom de disruption électrostatique de la membrane cellulaire [142]. Ce phénomène se produit lors de l'accumulation de charges électriques à la surface d'une cellule à un niveau tel que la résistance à la traction de la membrane n'est plus assez importante pour garantir l'intégrité membranaire. L'inégalité suivante est proposée comme condition nécessaire à la disruption de la membrane cellulaire :

$$|\Phi(V)| \geq 0.2 \sqrt{r(\mu\text{m}) \Delta(\mu\text{m}) F_T(\text{dynes.cm}^{-2})} \quad (2.3.1)$$

Cette formule traduit le fait que le potentiel Φ à la surface de la cellule dépend du produit du rayon de courbure local r de la membrane cellulaire, de l'épaisseur de la membrane Δ et de la force de traction de la membrane F_T . De nombreuses simulations ont montré que le potentiel à la surface des cellules peut être suffisamment élevé pour surpasser la résistance à la traction de la membrane [141]. Cette formule reste cependant difficile à utiliser car la force de traction de la membrane n'est pas une donnée connue à ce jour. Cependant, compte tenu de l'estimation de ce facteur par Mendis *et al* [142], il est envisageable que le champ électrique induit un effet au niveau cellulaire notamment sur les cellules Gram négatif dont la membrane possède des irrégularités diminuant ainsi le rayon de courbure local.

Si le champ électrique peut éventuellement produire un effet lors de l'exposition directe de supports biologiques au plasma, sa contribution est discutable dans le cas de traitements indirects au cours desquels les cellules ne sont pas exposées au plasma ce qui, nous le verrons plus tard, est le cas des applications biomédicales réalisées lors de cette thèse.

2.3.2 Effet du rayonnement ultraviolet

Le rayonnement UV-C (190-280 nm) est particulièrement efficace pour induire des dommages à l'ADN, ce dernier étant très absorbant sur cette plage de longueurs d'ondes. C'est donc une solution intéressante pour inhiber le développement d'une infection bactérienne lors d'une opération chirurgicale ou d'une préparation d'échantillons microbiologiques [144, 145]. Fort de ce constat, l'entreprise Steril-Aire Inc. a développé un dispositif à base de rayonnement UV-C permettant de réduire très fortement la contamination par des micro-organismes (biofilm gram-positif et négatif, champignons) des installations de chauffage, ventilation et climatisation. Jusqu'à très récemment, on ne trouvait pratiquement que des lampes contenant du mercure (dont une transition radiative se trouve à 253 nm) pour générer des rayonnements UV-C. Ces dernières sont désormais concurrencées par l'arrivée de la dernière génération de LED UV-C qui comble toutes les lacunes qui empêchaient les précédentes générations de LED de s'imposer sur ce secteur.

Un autre moyen de produire un rayonnement UV-C est de générer un plasma. Plus précisément, il s'agit d'un plasma dans lequel se trouvent des molécules excitées de monoxyde d'azote (NO) qui produisent un spectre caractéristique dans l'UV-C. A la pression atmosphérique, les plasmas à base d'argon sont généralement plus efficaces que ceux à base d'hélium ou d'air pour produire un rayonnement UV-C à partir des impuretés du gaz plasmagène et/ou du mélange de ce dernier avec l'air ambiant.

Lors d'expériences préliminaires, nous avons déterminé qu'un jet de plasma Surfatron à base d'argon projeté dans l'air ambiant était capable de générer une irradiance UV-C de $46 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$ à une distance de 17 mm de la sortie du tube amenant le gaz plasmagène. Cela correspond, pour une durée de traitement de 300 secondes, à un niveau d'exposition de $14 \text{ mJ}.\text{cm}^{-2}$ [10]. Ce niveau d'exposition UV-C étant, d'après les travaux de Guo *et al*, capable d'induire 5 log de diminution relative de la population (0.001% des bactéries toujours viables après traitement) de la souche sauvage de la bactérie *E. coli* à l'état planctonique [146]. Toutefois lors de nos travaux, la réduction bactérienne observée n'était que d'environ 1 log (10% de survie), la différence étant probablement imputable à la concentration bactérienne initiale qui était mille fois plus importante dans notre cas³ [10]. Nous avons également constaté que la part de mortalité bactérienne induite uniquement par le rayonnement UV-C du jet Surfatron sur des bactéries *E. coli* était d'environ 84% dans nos conditions expérimentales [10].

L'effet des radiations émises par le plasma n'est *a priori* envisageable que pour des expositions directes de supports biologiques au plasma. Cependant, le rayonnement ultraviolet contribue à la production d'électrons germes dans le plasma et favorise également la production de certaines espèces chimiques très actives sur le vivant et à longue durée de vie comme c'est le cas par exemple de l'ozone.

3. Cet exemple illustre parfaitement une difficulté supplémentaire pour comparer différents traitements par plasma car l'efficacité de décontamination bactérienne dépend de la concentration initiale des bactéries.

2.3.3 Effet des espèces réactives

Le plasma est une excellente source d'espèces réactives chargées électriquement (électrons, ions) ou neutres. Pour les applications biomédicales des plasmas, ces espèces neutres sont souvent classées en deux catégories : les espèces réactives oxygénées et les espèces réactives nitrogénées. Un exemple de concentrations des principales espèces réactives dans un plasma froid de type DBD est donné tableau 2.1 à partir des résultats de Kalghatgi *et al* [13]. La concentration de ces espèces réactives varie en fonction de la configuration du plasma mais la liste des espèces est quant à elle relativement commune dans les DBDs et les jets de plasmas à la pression atmosphérique. Ces espèces, présentes en phase gazeuse, sont connues pour produire des effets importants sur les cellules du vivant. Les radicaux superoxyde et hydroxyle, l'oxygène singulet et l'oxyde nitrique font d'ailleurs partie des éléments clés de la thérapie photodynamique et de la radiothérapie pour le traitement du cancer (cf. chapitre 1).

Pour un traitement de supports biologiques en suspension dans un liquide, les espèces réactives du plasma vont se solubiliser et entraîner à leur tour la formation d'espèces secondaires à la suite de réactions chimiques avec les composants du liquide traité. Il est également envisageable que les espèces produites par le plasma interagissent entre-elles une fois solubilisées. L'ensemble des produits issus de l'interaction entre le plasma et un liquide a une durée de vie limitée. On définit alors deux catégories qui sont les espèces à courte durée de vie telles que les radicaux dont la durée de vie après l'arrêt du plasma ne dépasse généralement pas la seconde et les espèces à longue durée de vie telles que le peroxyde d'hydrogène, l'ozone et les nitrites/nitrates dont la durée de vie dans le liquide activé peut atteindre plusieurs jours (tab. 2.1).

Cependant, les espèces à courte durée de vie ont un rôle essentiel dans le cas d'un traitement indirect par l'intermédiaire d'un liquide activé par plasma car elles sont très fréquemment à la base des mécanismes de formation des espèces à longue durée de vie.

Pour finir, il convient également de prendre en compte le taux de solubilisation d'une espèce initialement en phase gazeuse vers un liquide. La solubilité d'un gaz dans un liquide est généralement décrite par la loi de Henry qui établit que la solubilité d'un gaz dans un liquide est proportionnelle à la pression du gaz sur ce liquide. Par exemple l'ozone, qui est réputée assez difficile à dissoudre dans l'eau, a une solubilité qui dépend de la température, du pH du liquide et de la nature de ce dernier. Le taux de solubilité des espèces actives formées dans un plasma est par conséquent un paramètre particulièrement difficile à déterminer d'autant plus que la loi de Henry ne s'applique pas aux molécules qui réagissent chimiquement avec le liquide. Il s'agit donc d'un paramètre qui reste malheureusement inconnu la plupart du temps.

TABLE 2.1 – Concentrations des espèces générées en phase gazeuse par un plasma froid DBD dans l’air à la pression atmosphérique ayant une densité électronique comprise entre 10^9 et 10^{11} cm^{-3} et une concentration ionique positive comprise entre 10^{10} et 10^{12} cm^{-3} . La deuxième colonne est extraite de [13]

Espèces générées dans le plasma	Concentration dans le plasma (cm^{-3})	Durée de demi vie après solubilisation	Solubilité dans l’eau
Superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	10^{10} - 10^{12}	$\sim \text{s}$ [147]	N/A
Radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$)	10^{15} - 10^{17}	$\sim \mu\text{s}$ [148]	N/A
Peroxyde d’hydrogène(H_2O_2)	10^{14} - 10^{16}	8 heures-20 jours [149]	$10^6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [150]
Oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)	10^{14} - 10^{16}	$\sim \mu\text{s}$ [151]	N/A
Ozone (O_3)	10^{15} - 10^{17}	$\sim \text{min}$ [152]	$0.266 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \times [\text{O}_3]_{\text{gaz}}$ [153]
Oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$)	10^{13} - 10^{14}	$\sim \text{s}$ [154]	$58 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ [155]

2.4 Bilan des applications biomédicales des plasmas froids

Au cours de ce chapitre nous avons vu que les plasmas froids sont capables de générer un champ électrique local, un rayonnement UV-C ainsi que des espèces réactives. De nombreux chercheurs étudient actuellement la possibilité de mettre en œuvre des plasmas froids pour des applications biomédicales relativement variées allant de la modification de surface pour des matériaux médicaux aux traitements des ulcères et des plaies.

On remarque néanmoins que la contribution et la nature des espèces réactives initiées par plasma reste assez peu détaillée dans la littérature. La plupart des auteurs se contentent de mentionner la présence, la plupart du temps supposée, d’espèces réactives oxygénées (ROS) et d’espèces réactives nitrogénées (RNS) pour expliquer les effets de leur dispositif plasma sur le vivant.

Un des objectifs de ce travail de thèse est par conséquent d’identifier les espèces réactives produites dans un liquide activé par plasma puis de relier leur présence aux effets observés sur des supports biologiques, des tumeurs dans notre cas. Plus précisément, nous avons choisi d’utiliser des cellules du cancer colorectal HCT116. Alors que la plupart des essais de traitement plasma sur des tumeurs ont été réalisés sur des modèles *in vitro* 2D, nous avons eu l’opportunité de prendre en compte la morphologie des tumeurs en utilisant un modèle *in vitro* 3D. Cette approche permet généralement une meilleure anticipation de l’efficacité du traitement final. À la fin de ce mémoire, nous présenterons un essai de traitement sur modèle *in vivo* qui sera comparé aux quelques études portant sur le traitement *in-vivo* de cellules cancéreuses par plasma [156, 134, 157, 158].

Afin de ne considérer que l’effet des espèces réactives à longue durée de vie initiées par plasma, nous avons effectué des traitements de manière indirecte en plongeant les tumeurs dans une solution liquide préalablement activée par un jet de plasma. Cette approche est réaliste pour le traitement de cancer en situation réelle où, bien souvent, il est impossible d’exposer directement la tumeur à un jet de plasma.

Le dispositif plasma utilisé pour l'activation des liquides de traitement est identique à celui décrit dans la sous-section 2.2.4.1 et dans la figure 2.2.5. Ce choix a été fortement influencé par le nombre important de publications sur le traitement du cancer avec une configuration de jet plasma similaire à celle développée au sein du groupe PRHE.

Dans la suite de ce mémoire, le chapitre 3 présentera la culture et la mise en forme en 3D des modèles de tumeurs. Dans ce chapitre, seront également abordées les techniques de diagnostic propres aux traitements du cancer que sont par exemple la recherche de dommages à l'ADN et de la mort cellulaire par apoptose. Le chapitre 4 est dédié aux techniques de détection des espèces dans le liquide activé par plasma avec une attention particulière sur la détection et la quantification des espèces radicalaires à faible durée de vie. Enfin, le chapitre 5 décrira l'ensemble des techniques utilisées dans le domaine des plasmas froids pour caractériser les jets de plasma dans l'objectif de concevoir un dispositif plasma optimisé pour les traitements biomédicaux.

Matériels et méthodes

“Trouver n'est rien, c'est le plan
qui est difficile.”

(FIODOR DOSTOÏEVSKI)

Chapitre 3

Supports biologiques et diagnostics

Pour étudier la réponse de cellules saines ou cancéreuses à l'action des jets de plasma froids, diverses méthodes existent notamment l'étude sur cellules plates appelées aussi modèle 2D. Ce type de méthode consiste à observer la réponse de cellules en suspension dans un milieu de culture, ces cellules étant isolées ou en faible interaction les unes par rapport aux autres.

Récemment une méthode alternative utilisant des modèles en 3D de tumeurs *in vitro* (sphéroïdes) a été développée par diverses équipes de part le monde dont notamment l'Institut des Technologies Avancées en sciences du Vivant (ITAV) dont une équipe a participé aux travaux présentés dans cette thèse. Ce nouveau modèle permet une approche plus réelle de l'interaction plasma-cellules [159]. En effet, plusieurs expériences ont montré que les réponses des sphéroïdes à divers traitements notamment de radiothérapie donnent des résultats très proches de ceux observés sur xénogreffes¹ [160, 161]. Inversement, les résultats sur cellules monocouche ne donnent qu'une idée approximative des effets attendus dans la réalité. Le sphéroïde est donc un modèle *in vitro* plus adapté pour prédire l'effet d'un traitement sur une tumeur *in vivo*. Ces micro-tumeurs dénommées sphéroïdes permettent de prendre en compte des paramètres déterminants dans la prolifération cellulaire que sont l'hétérogénéité cellulaire au sein d'une tumeur mais aussi les interactions entre les cellules et leurs micro-environnements [162]. L'amas de cellules (saines ou cancéreuses) de ces micro-tumeurs reproduit l'organisation spatiale tridimensionnelle d'une tumeur non vascularisée pouvant nous apporter des informations concernant la limite de pénétration de nos traitements plasma. Au cours de sa croissance, cette structure va voir apparaître des gradients d'oxygène et de nutriment en son sein conduisant à un gradient de prolifération [42, 163, 164]. De part l'établissement de ces gradients, les cellules en prolifération seront situées sur la couche périphérique du sphéroïde [165]. Plus profondément sont localisées des cellules en état de quiescence c'est-à-dire en phase de repos sans division cellulaire. Enfin lorsque les sphéroïdes deviennent relativement important en terme de volume, les régions centrales sont

1. La xénogreffe désigne la transplantation d'un greffon (organe par exemple) où le donneur est d'une espèce biologique différente de celle du receveur.

alors privées d'oxygène et de nutriment entraînant un processus de mort cellulaire de ces dernières par nécrose.

La culture et la mise en forme des sphéroïdes nécessite diverses manipulations pour garantir des résultats fiables. Les parties suivantes seront donc consacrées à l'ensemble des procédures nécessaires à l'élaboration des sphéroïdes mais aussi aux étapes qui permettent de les préparer aux divers diagnostics pratiqués, ce protocole n'étant pas le même que pour les analyses classiques réalisées sur modèles 2D. On commencera par présenter les caractéristiques des cellules utilisées.

3.1 Caractéristiques des cellules

3.1.1 HCT 116 : Cancer du colon

La lignée cellulaire HCT116 est issue de tumeurs humaines du colon possédant une haute capacité proliférative (population doublant en approximativement 21H [166]). Présente chez l'homme, ces cellules peuvent entraîner l'apparition d'une tumeur maligne dénommée adénocarcinome colorectal. HCT116 exprime un gène particulier appelé antigène carcino-embryonnaire (ou ACE). Cette protéine impliquée dans l'adhésion cellulaire est un marqueur tumoral du cancer colorectal [167]. Il s'agit d'une protéine produite par le fœtus lors de son développement et qui disparaît après la naissance. Elle peut être cependant présente en faible quantité à la surface des cellules de quelques organes dont le côlon, le rectum, l'intestin grêle mais aussi les poumons [168].

Ce type de cellule cancéreuse est dite à morphologie épithéliale c'est-à-dire dont les cellules sont étroitement juxtaposées ou jointives (voir fig. 3.1.1) et aucune matrice extracellulaire ni aucune fibre ne peuvent les séparer. En culture ce type de lignée est particulièrement adhérente et nécessite donc des interventions particulières pour les détacher de la surface du flasque de culture. De plus, l'obtention et la conservation de sphères 3D utilisables nécessite d'utiliser des plaques de 96 puits traitées au Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (poly-HEMA) qui est un hydrogel évitant l'adhésion des cellules sur les puits.

3.1.2 GM637 : Fibroblaste

Les fibroblastes sont d'origine mésenchymateuse c'est-à-dire dérivant de cellules souches présentes dans l'embryon. Surnommées parfois « cellules de soutien » elles constituent le groupe cellulaire le plus présent dans le derme. L'un de leurs rôles majeurs est d'organiser les éléments présents dans la matrice extracellulaire. L'une des méthodes de discrimination la plus utilisée est une analyse morphologique de ces cellules dont la forme est décrite comme étoilée et dotée de longs prolongements généralement fins venant au contact d'autres cellules (Fig 3.1.2) [169]. Contrairement aux cellules cancéreuses HCT116 il peut donc exister des espaces entre ces cellules.

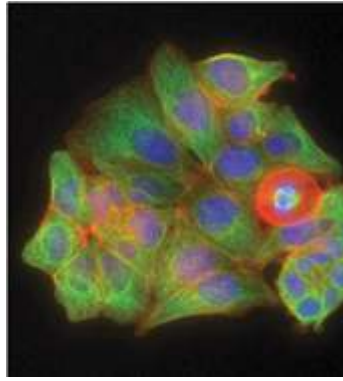


FIGURE 3.1.1 – Micrographie fluorescente du cytosquelette cellulaire HCT116 : cellules cancéreuses du côlon. Distribution des microtubules (colorées en vert), des noyaux (colorés en bleu) et les micro-filaments d'actine (colorés en rouge)

Cette lignée cellulaire nous servira de support pour l'analyse de l'interaction entre les jets de plasma froid et les cellules saines dans le but d'étudier la sélectivité du traitement par plasma. Contrairement aux sphéroïdes de cellules HCT116, l'index prolifératif des sphéroïdes réalisés à partir de fibroblastes est très faible. Il a été démontré que, lors de réponse aux dommages environnants et particulièrement lors de la cicatrisation et de l'inflammation, la prolifération de ces cellules peut être très rapide [170].

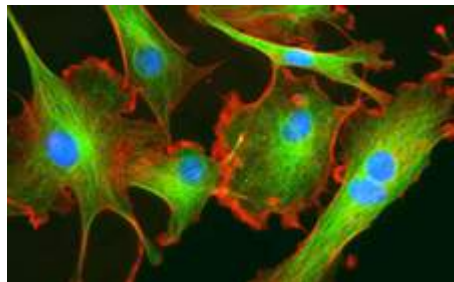


FIGURE 3.1.2 – Micrographie fluorescente de fibroblaste humain. Distribution des microtubules (colorées en vert), des noyaux (colorés en bleu) et les micro-filaments d'actine (colorés en rouge)

3.2 Méthode de culture

3.2.1 Culture cellulaire

Les deux souches de cellules utilisées lors de nos expériences nécessitent pour leur développement d'être gardées dans un incubateur à une température de 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Elles ont également besoin d'un milieu de culture de type « milieu minimum essentiel de Eagle » modifié par Dulbecco/Vogt (DMEM) avec 10% de sérum de veau foetal (SVF/FCS) et 5% de pénicilline/streptomycine. Le DMEM permet d'apporter les acides aminés (constituants élémentaires des protéines), les sels, le glucose (carburant

essentiel du métabolisme) et des vitamines indispensables à la croissance de la plupart des cellules *in vitro*. Le sérum de veau apporte quant à lui un grand nombre de protéines dans des proportions variables car directement issu des fœtus de vaches. Enfin, la pénicilline et la streptomycine sont des antibiotiques dont le rôle est d'éviter le développement de bactéries et de champignons qui pourraient contaminer les milieux de culture lors des manipulations.

Afin de toujours garder les cellules dans des phases de croissance il est important de relancer une culture avant que les cellules ne recouvrent entièrement la surface du support de culture, phase appelée confluence. Lorsque la relance des cellules est primordiale, la première étape consiste dans un premier temps à les détacher du flasque de culture. Pour cela il faut d'abord enlever le milieu, nettoyer les cellules au Tampon Phosphate Salin (PBS) puis ajouter de la trypsine. Cette protéase permet de briser les liaisons peptidiques des protéines utilisées par la cellule pour se fixer sur le support. Une fois le détachement des cellules observé au microscope optique, l'ajout d'une forte dose de milieu permet d'arrêter l'action de la protéase et protège ainsi les cellules. Une fois la solution (milieu + cellules) bien homogénéisée, il suffit de compter ces dernières grâce à une cellule de Malassez pour obtenir la concentration cellulaire approximative dans un millilitre de milieu de culture. Il est alors possible d'ensemencer un nouveau flasque avec la concentration de cellules souhaitée (généralement dans nos études, nous avons utilisé 500 000 cellules/ml).

3.2.2 Formation du sphéroïde pour les analyses *in vitro*

Lors de la relance des cellules, la formation des sphéroïdes est aisée puisque les cellules sont dans un premier temps dissociées de la paroi du flasque et la concentration cellulaire est connue. Les sphéroïdes que nous étudions sont composés de 500 cellules par puits lors de leur formation et baignent dans 100 μ L de DMEM + 10% SVF. L'action combinée d'un passage en centrifugation pendant 6 min à 1200 rotations par minute et de l'utilisation de plaques 96 puits à fond rond conduit au rapprochement des cellules qui finiront ainsi par créer des liens entre-elles pour former à proprement dit un sphéroïde. On peut observer sur la figure 3.2.1 le regroupement des cellules et la formation du sphéroïde d'un diamètre d'environ 300-400 μ m en quelques jours.

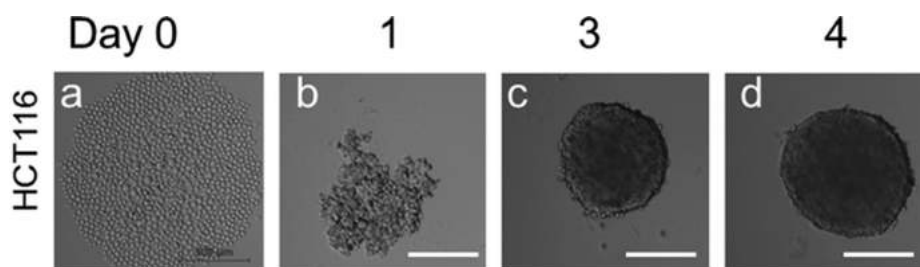


FIGURE 3.2.1 – Cinétique de formation d'un sphéroïde issu de cellules cancéreuses HCT116 à 0, 1, 3 et 4 jours (a-d) après ensemencement de 1000 cellules par puits en plaque ultra Low-attachment à fond rond. D'après [12]. Échelle 500 μ m.

3.2.3 Formation des tumeurs pour les analyses *in vivo*

L'utilisation d'animaux et notamment de modèles murins dans la recherche de traitement contre le cancer est primordiale pour la compréhension des mécanismes des cancers et également pour améliorer l'ensemble des stratégies thérapeutiques et de diagnostic.

La souris commune est un animal idéal pour les analyses en oncologie de part sa petite taille, son taux de reproduction et de fécondité important ainsi que son coût de production et d'entretien relativement faible [171]. L'utilisation accrue de ce modèle a permis la création de lots d'animaux génétiquement proches, résultant d'une forte consanguinité, ce qui facilite les analyses comparatives. En outre, le génome de ce modèle a été entièrement séquencé ce qui permet de le manipuler facilement. On peut souligner la contribution importante du modèle murin dans le développement de chimiothérapies [172].

Pour nos essais, nous avons choisi des souris Nude (voir figure 3.2.2), des animaux présentant une mutation sur un gène spécifique les rendant albinos, sans poil et possédant un système immunitaire affaibli (absence de lymphocyte T) que l'on appelle couramment immunodéprimées.

Une greffe hétérotopique² des cellules HCT116 est réalisée en application sous-cutanée sur les souris. Cette pratique facilite d'une part l'accès à la tumeur et donc à son suivi au cours du traitement mais également évite l'ensemble des opérations chirurgicales nécessaires à l'étude des greffes orthotopiques. L'injection de 2.5 millions de cellules HCT116 est réalisée à l'aide d'une seringue 17 gauges une semaine après réception des souris, ce délai étant supposé permettre une acclimatation des animaux. Les cellules se développent alors pendant 2 à 3 semaines jusqu'à former des tumeurs vascularisées d'un volume de 100mm³ à partir duquel les traitements peuvent commencer.

L'ensemble des manipulations (inoculation de la tumeur, traitement, sacrifice) est réalisé sous anesthésie générale à base d'isoflurane qui est un anesthésique volatile et est réalisé par des personnes ayant été formées spécialement.

3.3 Diagnostics des sphéroïdes *in vitro*

3.3.1 Évaluation de l'efficacité du traitement plasma

La première méthode empirique utilisée pour déterminer l'impact d'un traitement sur les sphéroïdes est basée sur la mesure de l'évolution temporelle du volume de ces derniers après traitement. Pour pouvoir distinguer les effets à court terme et à long terme du plasma sur les micro-tumeurs, le suivi de volume est réalisé pendant 9 jours après le transfert des sphéroïdes dans un milieu de culture activé par jet de plasma afin d'évaluer l'impact de traitement favorisant ou au contraire inhibant la croissance du sphéroïde [165].

2. Par opposition au greffe orthotopique, cette greffe de cellules cancéreuses est réalisée sur un site distinct de celui de la tumeur d'origine

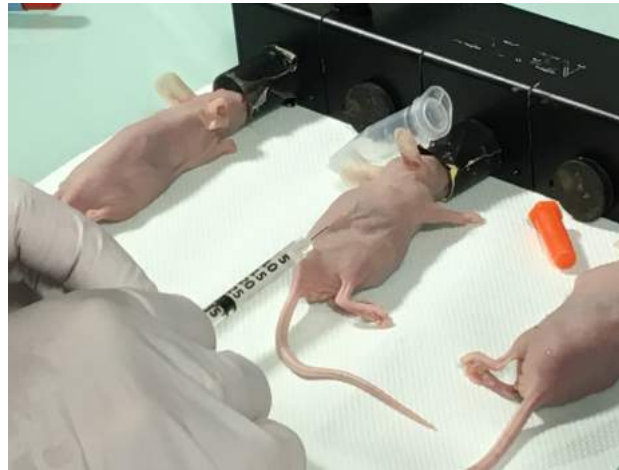


FIGURE 3.2.2 – Injection sous cutanée de cellules HCT166 sur modèle murin anesthésié.

Lors de la préparation du sphéroïde, le nombre de cellules utilisées peut varier légèrement d'une préparation à une autre entraînant une variation du volume des micro-tumeurs. Concernant la croissance des micro-tumeurs, elle peut varier légèrement suivant les conditions de préparation. Ces deux aléas rendent difficile la comparaison directe de l'évolution quotidienne du volume des micro-tumeurs non-traitées avec celles qui l'ont été. Ainsi pour palier ces variations inhérentes à la mise en place des expériences, nous avons choisi de proposer un tracé de courbe alternatif qui nous paraît être plus approprié. Dans la littérature, cette représentation est appelée courbe d'inhibition de croissance ou rapport « T/C ». Cette représentation correspond au volume des sphéroïdes traités (T) normalisé par le volume des sphéroïdes non traités (C). Ainsi, à un instant donné, les sphéroïdes traités sont plus gros que leurs homologues non traités si ce rapport est supérieur à 1 et inversement s'il est inférieur à 1. On peut alors observer le retard de croissance d'un échantillon traité par rapport à un non traité. Cette représentation présente toutefois un risque de mauvaise interprétation car une stabilisation de la courbe ne correspond pas à un arrêt de la croissance tumorale car les tumeurs non traitées n'arrêtent pas de croître. Le niveau d'activité anti-tumorale du traitement est ensuite déterminé selon les critères du National Cancer Institute (NCI) [173] :

- absence d'activité : $T/C > 42\%$;
- activité modérée : $10\% < T/C < 42\%$;
- activité forte : $T/C < 10\%$.

3.3.2 Étape de fixation, découpe

Afin de pouvoir analyser de manière précise l'ensemble des processus biologiques à l'intérieur des cellules à un instant donné, il est essentiel dans certains cas de stopper l'activité cellulaire, étape que l'on appelle couramment la fixation. Avant le début de la fixation, les sphéroïdes auront été en contact pendant un certain temps avec le milieu activé par plasma. Dans tout les cas, l'étape de fixation ne doit pas être réalisée plus de 4H après le début du traitement par plasma. Cette durée a été déterminée lors des travaux de Joseph Plewa [132]

où il est apparu qu'une durée de 4H avant fixation permettait d'avoir des résultats d'immunofluorescences optimaux.

La première étape de fixation consiste à placer les sphéroïdes dans une solution de formaline (HT501128-4L, Sigma-Aldrich) pendant une durée comprise entre 2 et 3H. Cette manipulation permet aux tissus biologiques d'être préservés de la décomposition, empêchant ainsi l'autolyse (autodestruction) des cellules et leur putréfaction. La fixation permet également de bloquer toutes les réactions biochimiques en cours et peut également préparer les cellules aux étapes de découpe qui surviennent plus tard car elle augmente la résistance mécanique des cellules. Après cette étape, les sphéroïdes sont lavés dans une solution de Tampon Phosphate Salin (PBS) et réservés au froid à 4°C. Après fixation, les sphéroïdes passent successivement 2H minimum dans une solution de sucrose à 15% puis sucrose à 30%. Le sucrose permet la protection des tissus lors de la découpe cryogénique.

Pour la découpe cryogénique, les micro-tumeurs sont d'abord placées dans du Tissue-Tek (Sakura Finetek) servant de support puis les cryosections d'une épaisseur de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM1950).

L'ensemble de ce protocole a été développé et optimisé au sein de l'équipe IBPD de l'ITAV pour le travail sur sphéroïde HCT116 [164, 132].

3.3.3 Marquage immunofluorescent

Afin de mettre en évidence des particularités biologiques de nos cellules suite au traitement par plasma, une méthode d'immunofluorescence a été utilisée. Elle consiste à utiliser des anticorps spéciaux afin de reconnaître certaines particularités du génome en les révélant grâce à une sonde fluorescente. Le premier anticorps utilisé est le 4',6-diamidino-2-phénylindole communément appelé DAPI. Cet anticorps est capable de se lier fortement avec les bases de l'ADN notamment à l'adénine (A) et la thymine (T). Naturellement fluorescent, l'anticorps DAPI absorbe les radiations UV à 350 nm pour restituer une lumière bleue entre 450 et 490 nm. Ainsi le DAPI permet de mettre en évidence la présence d'ADN dans les cellules quelque soit leurs viabilités à travers une fluorescence bleue sur les coupes cryogéniques. Le DAPI en solution de 0.1 µg/ml est appliqué dans l'obscurité sur lame cryogénique pendant dix minutes .

Le second anticorps utilisé n'est quand à lui pas naturellement fluorescent. Cet anticorps dit primaire nécessite l'ajout d'un second anticorps dit secondaire qui est fluorescent. L'anticorps primaire, une solution à 1/500 de phosphorylated Histone H2AX (mouse monoclonal, Millipore) appelée H2AX, est mis en contact avec les coupes cryogéniques pendant une nuit à 4°C ou 1H à 37°C en fonction des contraintes expérimentales. Lorsque cet anticorps rencontre des cassures double brins sur l'ADN, il effectue une étape de phosphorylation (ajout d'un groupe phosphate) entraînant la formation d'un composé connu sous le nom de γ -H2AX qui va pouvoir s'accrocher aux cassures de l'ADN [174]. L'anticorps secondaire est une solution anti-mouse conjuguée avec Alexa 488 (Molecular Probes), une molécule

fluorescente dont l'absorption se situe à 495 nm et l'émission à 519 nm produisant ainsi une lumière verte vive. L'anticorps secondaire est ajouté pendant une heure sur les coupes cryogéniques à température ambiante et dans l'obscurité. Alexa 488 va reconnaître un site d'accroche sur la forme phosphorylée de H2AX et permettra ainsi de mettre en évidence (en vert) l'ensemble des cellules ayant subi des dommages double brins à l'ADN sur les coupes cryogéniques.

L'analyse de ces marquages est réalisée par un microscope epifluorescent DM5000 (Leica) équipé d'une caméra Roper COOLsnap ES CCD. Les images sont ensuite extraites et analysées par un package de logiciel Metavue (Molecular Devices) et ImageJ.

3.3.4 Viabilité cellulaire

L'estimation de la viabilité cellulaire dans des regroupements 3D de cellules tels que les sphéroïdes est basée sur l'observation et la quantification de l'adenosine 5-triphosphate (ATP) intracellulaire [175]. L'ATP est la molécule qui sert au stockage et au transport de l'énergie dans les organismes vivants. Elle est composée d'un groupement d'adénosine et de trois groupements phosphate. Les liaisons entre les groupements phosphates sont des liaisons riches en énergie. Par conséquent l'hydrolyse de l'ATP permet, par l'intermédiaire de la formation d'adénosine diphosphate ou monophosphate, de libérer une quantité d'énergie importante appelée enthalpie libre de 30.5 et 45.6 kJ.mol⁻¹ respectivement. A travers ces réactions, l'ATP peut fournir l'énergie nécessaire à l'ensemble des réactions intracellulaires. Par conséquent, elle intervient dans un grand nombre de processus physiologiques tels que la synthèse et la dégradation des molécules biologiques ou la contraction des muscles.

Comme nous l'avons vu précédemment la mort d'une cellule peut se dérouler suivant différents mécanismes majeurs : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Bien que ces morts cellulaires empruntent leurs propre signalement moléculaire et l'activation de molécules bien spécifiques, l'ATP joue un rôle important dans l'ensemble de ces morts cellulaires. Lors de l'apoptose, principalement au cours des derniers stades, la quantité d'ATP va rapidement décroître du fait de la perte des fonctions de la mitochondrie mais également en raison de la consommation par des protéases dépendantes de l'ATP. Ainsi, l'énergie nécessaire pour l'activation et la réalisation de l'apoptose dans une cellule est relativement importante. Si le niveau d'ATP est trop faible, la mort cellulaire se déroulera selon un scénario de nécrose [176, 177]. Dans ce processus la cellule se détruit en perdant son intégrité membranaire puis en relarguant dans le milieu extra cellulaire l'ATP quelle contient. La mort cellulaire va donc entraîner une déplétion de l'ATP mesurée dans la cellule ce qui permet par conséquent l'estimation de la viabilité cellulaire.

Le suivi de la viabilité cellulaire est réalisé à travers l'utilisation d'un kit CellTiter-Glo 3D cell viability (Promega). On utilise 50 µl de réactif ajoutés après l'exposition de 100 µL de milieu de culture au jet de plasma conformément aux préconisations du fabricant. Une fois les sphéroïdes transférés dans le PAM contenant ce réactif, la lyse des cellules est obtenue par

agitation mécanique durant 25 min à 1000 rpm. La mesure de luminescence est alors réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque CLARIOstar (BMG LABTECH) à température ambiante sur des plaques blanches 96 puits adaptées à la mesure de luminescence. La concentration relative d'ATP est évaluée en divisant la luminescence des échantillons traités au plasma par la luminescence des échantillons non traités.

3.3.5 Perméabilisation cellulaire

La perméabilisation cellulaire est détectée par l'utilisation de l'iodure de propidium (PI). Cette molécule fluorescente de masse moléculaire 668,403 Da ne peut pénétrer dans les cellules viables par les pores cellulaires naturellement présents. Dans le cas de cellules ayant subi une perméabilisation partielle ou totale, le PI va pouvoir pénétrer dans la cellule et se fixer à l'ADN et à l'ARN ce qui lui vaut le dénominateur d'agent intercalant. Dans ce cas, son pouvoir de fluorescence va augmenter de 20 à 30 fois par rapport au PI en solution libre et donne une couleur rouge caractéristique (voir fig 3.3.1).

Le marqueur Hoechst permet le marquage du noyau des cellules vivantes ou mortes en se fixant sur les bases nucléiques de l'ADN avec une préférence pour l'adénine et la thymine. Ce marqueur est dit *cell-permeable* ce qui lui permet de marquer les cellules qui ne sont pas perméabilisées à l'instar du DAPI. De plus le Hoechst est moins toxique que le DAPI ce qui permet de garder une viabilité cellulaire importante après traitement. Une fois excité avec une lumière UV ce marqueur fluorescent fournit une couleur bleue caractéristique (voir fig 3.3.1).

Après traitement par PAM, les sphéroïdes sont disposés 5 min dans une solution de ZAP buffer (10mM K_2HPO_4 , 1mM $MgCl_2$, 250mM Saccharose, pH 7.4) contenant 100 μ M d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich Co, Ltd) et 30 μ M de Hoechst (Sigma-Aldrich Co, Ltd) en étant protégés de la lumière. Ils sont ensuite rincés dans un grand volume de PBS contenant du calcium et du magnésium. La fluorescence (PI : $\lambda_{ex} = 538/\lambda_{em} = 617nm$, Hoechst : $\lambda_{ex} = 350/\lambda_{em} = 461nm$) est collectée à l'aide d'un microscope à épifluorescence DM IRB (Leica) à température ambiante dans des plaques 96 puits à faible attachement.

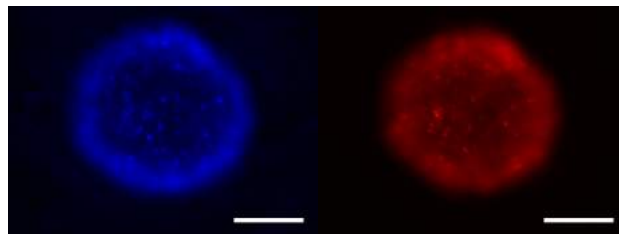


FIGURE 3.3.1 – Marqueurs utilisés pour la détection de perméabilisation cellulaire obtenue par électroporation d'un sphéroïde composé de cellules cancéreuses HCT116. À gauche le marqueur Hoechst ($\lambda_{em} = 461\text{ nm}$) et à droite le marqueur iodure de propidium ($\lambda_{em} = 610\text{ nm}$). Échelle : 100 μ m.

3.3.6 Activation de l'apoptose

L'activation de l'apoptose est évaluée par l'observation de l'activité des caspases effectrices intracellulaires 3 et 7 en utilisant le kit NucView 488 Caspase-3 (Biotum) [178]. Le substrat est associé à un colorant de liaison à l'ADN qui le rend incapable de se fixer naturellement sur les bases nucléiques. Ce substrat est capable de pénétrer dans le cytoplasme des cellules sans perméabilisation préalable. Dans le cas de l'apoptose les caspases effectrices 3 et 7 peuvent ainsi cliver le substrat libérant le marqueur fluorescent qui va alors pouvoir migrer dans le noyaux et s'intercaler dans les chaînes de l'ADN pour les marquer. Cette technique permet d'une part d'observer l'activité des caspases donc le déclenchement de phénomènes apoptotiques mais également de suivre la morphologie du noyaux le cas échéant. De plus, ce substrat n'interfère aucunement avec l'activité des caspases ce qui permet le suivi temporel d'un même sphéroïde.

Les sphéroïdes sont incubés avec le PAM et le substrat fluorescent pendant 30 min (concentration finale $5\mu\text{M}$) avant observation de la fluorescence. La fluorescence verte ($\lambda_{ex} = 485/\lambda_{em} = 515\text{nm}$) est collectée à l'aide d'un microscope à épifluorescence DM IRB (Leica) à température ambiante dans des plaques 96 puits à faible attachement (voir fig 3.3.2).

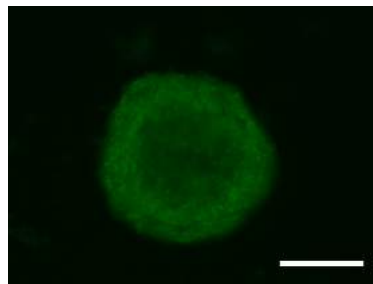


FIGURE 3.3.2 – Fluorescence du substrat NucView 488 Caspase-3 d'un sphéroïde composé de cellules cancéreuses HCT116 24H après un traitement plasma. La fluorescence verte correspond à l'activité de caspase traduisant des mécanismes de mort apoptotique dans les cellules. Échelle : $100\mu\text{m}$.

3.4 Diagnostics des tumeurs *in vivo*

3.4.1 Suivi de la croissance tumorale

Il existe de très nombreuses manières de déterminer le volume d'une tumeur lors d'expériences *in vivo* et le choix dépend essentiellement de la manière dont sont réalisées les greffes.

Dans notre cas, l'injection et le développement de la tumeur sous le derme permettent un accès facile à cette dernière. Une mesure au pied à coulisse permet alors d'estimer le volume de la tumeur. Cependant, la formule permettant l'estimation du volume n'est pas unique à cause du caractère informe des tumeurs. La formule la plus couramment utilisée et la plus

précise consiste donc à émettre l'hypothèse que la tumeur est un ellipsoïde de révolution dont le volume interne V_{tumeur} correspond à la relation [179] :

$$V_{tumeur} = \frac{4}{3} \pi (W^2 \times L) \approx (W^2 \times L)/2 \quad (3.4.1)$$

où L représente la longueur de la tumeur (le plus grand diamètre ou diamètre polaire) et W représente la largeur (soit le plus petit diamètre ou diamètre équatorial). Dans cette formule la hauteur n'est pas prise en compte puisqu'il est d'une part difficile de la mesurer et que la tumeur peut se développer dans un muscle faussant alors la mesure.

Cette mesure, bien que relativement précise, reste une mesure réalisée en dehors du corps de la souris et l'épaisseur de la peau de l'animal peut représenter un biais significatif en fonction de la taille de la tumeur. Pour confirmer l'estimation du volume de la tumeur au court du temps, une mesure plus précise de la tumeur est réalisée suite à l'opération d'extraction de la tumeur intervenant après le sacrifice de la souris. Enfin, une estimation du volume final à partir de la masse de la tumeur peut également être envisagée.

3.4.2 Coupes histologiques

D'une façon similaire aux sphéroïdes *in vitro*, il est possible de fixer les tumeurs extraites des modèles murins après traitement pour réaliser des coupes cryogéniques. Suite à cela divers marquages sont possibles mais les plus couramment utilisés sont les marquages histologiques et par anticorps. les marquages histologiques sont également appelés colorations et permettent d'augmenter le contraste naturel des tissus biologiques ainsi que de mettre en valeur certaines structures particulières.

Suite aux expériences *in vivo*, deux colorations particulières sont utilisées. La première, et la plus commune, est une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). La seconde est une coloration au trichrome de Masson.

La coloration H&E est très utilisée lors des diagnostics médicaux. Elle est composée de deux colorants : l'hématoxyline (cationique ou basique) et l'éosine (anionique ou acide). De part leurs affinités respectives les éléments acides sont colorés en rouge tandis que les éléments basiques tendent vers une couleur violette. Sur la figure 3.4.1 un marquage H&E est réalisé sur une coupe d'un colon sain. On peut discerner différentes couleurs correspondant aux muscles pour le rose profond et au collagène pour le rose pâle. Les noyaux sont quant à eux représentés par un bleu/violet profond.

La coloration au trichrome de Masson permet un marquage particulier du collagène. Sur la figure 3.4.2 le collagène est facilement identifiable avec sa couleur bleue vive. On peut également observer les muscles en rose ainsi que les cellules sanguines en rouge intense d'apparence granuleuse. Le collagène est important puisque cette protéine est présente dans les matrices extracellulaires et confère aux tissus leur résistance mécanique. Cette coloration est réalisée à partir du kit de marquage Trichrome de Masson (HT-15, sigma aldrich).

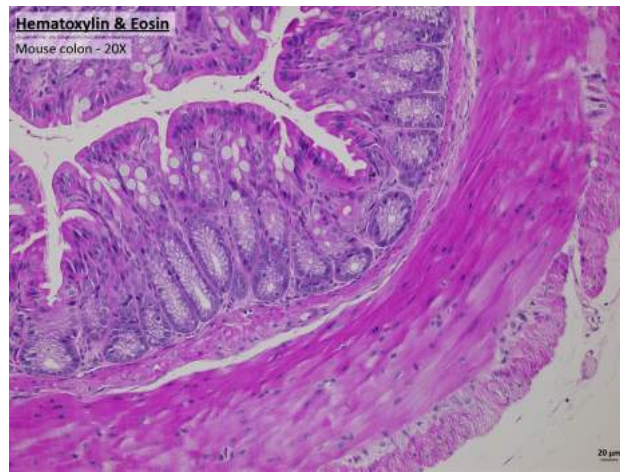


FIGURE 3.4.1 – Marquage H&E d'un colon sain.

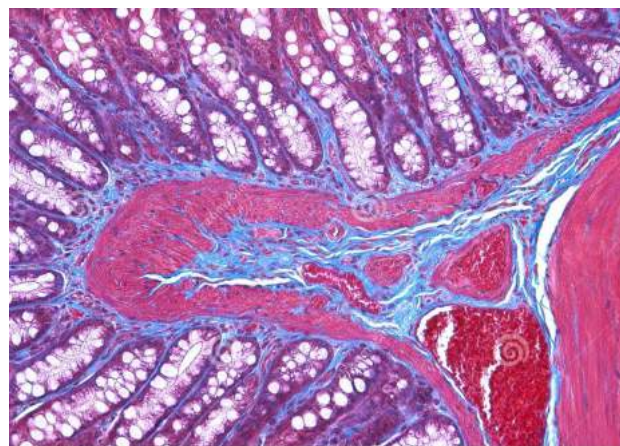


FIGURE 3.4.2 – Coloration du colon au trichrome de Masson.

Chapitre 4

Détection et quantification des espèces générées par le plasma dans les milieux de culture

L'interaction entre le plasma et un milieu de culture cellulaire dans lequel sont placés nos supports biologiques d'études va induire la solvatation de certaines espèces chimiques mais également générer des produits secondaires. La difficulté majeure dans la compréhension des mécanismes chimiques mis en cause est l'identification des espèces à faible durée de vie que l'on appelle les radicaux libres. De part leur durée de vie courte résultant d'une importante réactivité chimique, ces éléments ne peuvent pas être détectés par des méthodes classiques comme la fluorométrie, la colorimétrie et la mesure d'absorbance optique. Il est donc indispensable de piéger ces espèces radicalaires directement lors de l'exposition au plasma pour pouvoir les observer. Pour cela, la détection de ces espèces est effectuée par résonance paramagnétique électronique. Cette technique, que nous allons présenter dans ce chapitre, exploite les propriétés quantiques des molécules radicalaires. Nous aborderons en fin de chapitre le cas des espèces plus stables dans le temps dont la détection et la quantification sont réalisées de manières plus conventionnelles.

4.1 Diagnostic par résonance paramagnétique électronique

La mesure de résonance paramagnétique électronique (RPE) est basée sur l'interaction entre des atomes ou des molécules avec un champ magnétique variable et de forte intensité. Dans cette section, nous allons exposer les bases théoriques de cette méthode avant de présenter sa mise en œuvre pour la détection de radicaux libres.

4.1.1 Effet Zeeman et interaction atome-molécule avec un champ magnétique

Soit un point de masse m et de charge électrique q en mouvement créant un moment magnétique $\vec{\mu}$ tel que :

$$\vec{\mu} = \frac{q}{2m} \vec{\sigma} \quad (4.1.1)$$

où $\vec{\sigma}$ représente le moment cinétique du point, une grandeur mécanique liée au déplacement et à la quantité de mouvement. Cette relation peut s'appliquer à toutes les particules élémentaires et notamment à un électron lié au noyau d'un atome et dont l'orbitale atomique est décrite par les trois nombres quantiques n , ℓ et m_ℓ . Ce sont des entiers sans dimension pouvant prendre des valeurs bien particulières (ou quantifiées) :

- $n \geq 1$ est le nombre quantique principal correspondant à une couche électronique dont il caractérise la taille et l'énergie ;
- $\ell \in [0 \dots n - 1]$ est le nombre quantique secondaire ou azimutal définissant une sous-couche électronique, en particuliers sa forme et sa symétrie spatiale ;
- $m_\ell \in [-\ell \dots +\ell]$ est le nombre quantique tertiaire ou magnétique qui correspond aux différentes orientations spatiales que peut prendre l'orbitale en présence d'un champ magnétique extérieur.

Donc le moment magnétique orbital d'un électron (de masse m_e et de charge $-e$) lié au noyau d'un atome est :

$$\vec{\mu}_{n\ell m_\ell} = -\frac{e}{2m_e} \times \vec{\sigma}_{n\ell m_\ell} \quad (4.1.2)$$

Dans un repère tridimensionnel $\{x, y, z\}$, le moment cinétique orbital $\vec{\sigma}_{n\ell m_\ell}$ est formé de trois composantes $(\sigma_x, \sigma_y, \sigma_z)$ et ne peut prendre que des valeurs déterminées par :

$$\sigma_{n\ell m_\ell}^2 = \sigma_x^2 + \sigma_y^2 + \sigma_z^2 = \ell(\ell + 1)\hbar^2 \quad (4.1.3)$$

avec $\sigma_{n\ell m_\ell}$ la norme du moment cinétique total et $\hbar = h/(2\pi)$ la constante de Planck réduite.

De plus, pour une valeur donnée de ℓ , une des trois composantes du moment cinétique orbital (par exemple σ_x) ne peut prendre que des valeurs de la forme :

$$\sigma_x = m_\ell \hbar \quad ; \quad m_\ell \in [-\ell \dots +\ell] \quad (4.1.4)$$

La mécanique quantique prédit également l'existence d'un phénomène qui n'a pas d'équivalence classique : le spin de l'électron que certains auteurs attribuent à la rotation de l'électron sur lui-même ce qui n'est pas le cas. Le spin d'une particule élémentaire est défini par un paramètre s qui est un entier ou demi-entier dans le cas général mais qui vaut $1/2$

pour l'électron. Il a été démontré que ce spin est responsable d'un moment magnétique (μ_s) et d'un moment cinétique (σ_s) supplémentaires sur les électrons :

$$\vec{\mu}_s = -g_e(e/2m_e)\vec{\sigma}_s \quad (4.1.5)$$

avec $g_e \approx 2,0023...$ une constante appelée facteur de Landé.

Nous pouvons également retrouver des relations similaires aux relations 4.1.3 et 4.1.4 :

$$\sigma_s^2 = \sigma_{sx}^2 + \sigma_{sy}^2 + \sigma_{sz}^2 = s(s+1)\hbar^2 \quad ; \quad \sigma_{sx} = m_s\hbar \quad (4.1.6)$$

avec $m_s = \pm 1/2$ le quatrième nombre quantique représentant les deux états de spin distincts de l'électron.

En regroupant le moment magnétique orbital et le moment magnétique intrinsèque (ou de spin), on obtient le moment magnétique total $\vec{\mu}$ de l'électron dans la configuration quantique n, ℓ, m_ℓ, m_s :

$$\vec{\mu} = -\frac{e}{2m_e} (\vec{\sigma}_{n\ell m_\ell} + g_e \vec{\sigma}_s) \quad (4.1.7)$$

avec

$$\mu_{x,y,z} = -\frac{e\hbar}{2m_e} (m_\ell + g_e m_s) \quad (4.1.8)$$

Cette équation générale peut être appliquée à chacun des électrons d'un atome. En effet, chaque électron est affilié à une couche et à une sous couche particulière (n, ℓ) d'énergie $E_{n,\ell}$ quantifiée. En l'absence de champ magnétique extérieur, tous les électrons de cette sous-couche possèdent la même énergie quelque soit le nombre quantique magnétique (m_ℓ) du niveau d'énergie sur lequel ils se trouvent et leur spin (m_s). On dit alors que le niveau d'énergie $E_{n,\ell}$ est dégénéré et que sa dégénérescence est égale à $(2\ell+1)$. Pour rappel, chaque électron est réparti dans une couche (n), une sous couche (ℓ), avec une orbitale (m_ℓ) et un spin (m_s) suivant le principe d'exclusion de Pauli impliquant que deux électrons du même atome ne peuvent avoir les quatre mêmes nombres quantiques précités.

Ainsi chacun des N électrons d'une sous couche (n, ℓ) contribue à un moment magnétique global dont la composante sur un axe (x ici) est décrite par la relation suivante :

$$\mu_x(n, \ell) = -(e\hbar/2m_e) \sum_{i=1}^N [m_\ell(i) + g_e m_s(i)] \quad (4.1.9)$$

Lorsqu'une sous-couche est entièrement remplie, l'ensemble des valeurs disponibles pour m_ℓ et m_s est utilisé. Le moment magnétique d'une sous-couche pleine est donc nul étant donnée la symétrie de ces nombres quantiques par rapport à 0. Par conséquent, seuls les atomes possédant une sous-couche incomplète possèdent un moment magnétique. Par conséquent, on ne considérera que les électrons de la couche de valence dont les nombres quantiques principal et secondaire, correspondant au niveau d'énergie dégénéré, seront respectivement référencés n_v et ℓ_v dans la suite. Cette couche de valence est par conséquent la superposition de $(2\ell_v + 1) \times (2s + 1) = 2(2\ell_v + 1)$ états dégénérés qui, en l'absence de champ magnétique

extérieur, ont tous la même énergie.

Dans la suite, on introduit j le nombre quantique principal de moment angulaire total pouvant prendre des valeurs par pas de 1 telles que $|\ell_v - s| \leq j \leq |\ell_v + s|$ et on fait les changements suivants :

$$\begin{aligned}\vec{L} &= \sum \vec{\sigma}_{n_v \ell_v m_\ell} \quad ; \quad \vec{S} = \sum \vec{\sigma}_{s_v} \quad ; \quad \vec{J} = \vec{L} + \vec{S} \\ J^2 &= j(j+1)\hbar^2 \quad ; \quad J_x = m_j \hbar \quad ; \quad m_j \in [-j \dots +j]\end{aligned}$$

où m_j est le nombre quantique secondaire de moment angulaire total. On obtient alors :

$$\vec{\mu} = -\frac{g\beta}{\hbar} \times \vec{J} \quad (4.1.10)$$

où $\beta = e\hbar/2m_e$ est appelé “magnéton de Bohr électronique”. Le coefficient g est un autre coefficient de Landé qui varie en fonction de l’élément chimique étudié. Lorsque que l’on place cet élément dans un champ magnétique $\vec{B}$ il en résulte une énergie d’interaction E dont l’expression est :

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = \frac{g\beta}{\hbar} \times \vec{J} \cdot \vec{B} \quad (4.1.11)$$

De plus, Lorsque l’on choisit l’axe x dans la direction du champ magnétique, l’équation précédente devient :

$$\begin{aligned}E &= \frac{g\beta B J_x}{\hbar} \\ E &= g\beta B m_j\end{aligned} \quad (4.1.12)$$

Lors de la présence d’un champ magnétique, l’énergie d’interaction peut donc prendre $(2j+1)$ valeurs quantifiées conformément aux différents m_j . De ce fait, en présence d’un champ magnétique, la même sous couche possède $(2j+1)$ niveaux d’énergie différents séparés chacun de $\Delta E = g\beta B$. On dit que le champ magnétique a levé la dégénérescence du niveau d’énergie en faisant apparaître la structure fine du niveau d’énergie. Ce phénomène est connu sous le nom de l’effet Zeeman dont un exemple est schématisée sur la figure 4.1.1.

L’ensemble des réflexions qui ont été menées sur les électrons peut aussi s’appliquer aux noyaux des atomes. En effet les nucléons possèdent également un moment cinétique orbital et un moment cinétique de spin $s = 1/2$. On peut donc en déduire pour chaque particule un moment magnétique orbital et un moment magnétique de spin conformément aux relations 4.1.2 et 4.1.5. Le tableau 4.1 recense les moments magnétiques des particules constituant un atome. Dans ce tableau la valeur β est le magnéton de Bohr électronique, pour rappel $\beta = e\hbar/2m_e$, et β_N le magnétron de Bohr nucléaire définit comme valant $e\hbar/2m_p$ avec m_p la masse d’un proton. Les facteurs g sont les facteurs de Landé associés à chaque particule et valent : $g_e = 2,0023$, $g_p = 5,5857$ et $g_N = -3,8261$.

Si le moment magnétique total des électrons peut être modélisé par l’équation 4.1.11,

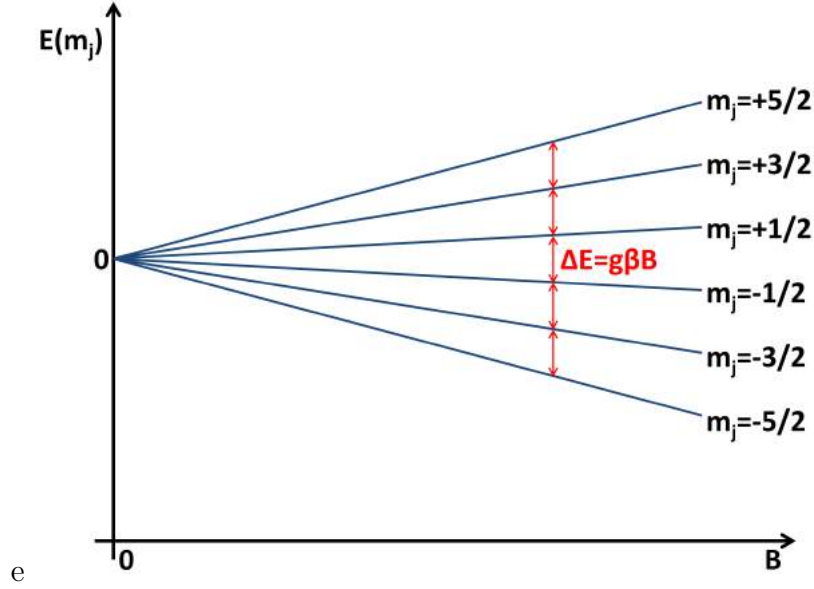


FIGURE 4.1.1 – Éclatement des niveaux d'énergie d'une sous-couche atomique possédant un nombre quantique principal de moment angulaire total $j = 5/2$ en fonction de l'intensité du champ magnétique.

électron	$\vec{\mu}_L \hbar = -\beta \vec{L}$	$\vec{\mu}_S \hbar = -g_e \beta \vec{S}$
proton	$\vec{\mu}_L \hbar = +\beta_N \vec{L}$	$\vec{\mu}_S \hbar = g_p \beta_N \vec{S}$
neutron	$\vec{\mu}_L \hbar = 0$	$\vec{\mu}_S \hbar = g_N \beta_N \vec{S}$

TABLE 4.1 – Moments magnétiques orbitaux et de spin des particules élémentaires

celui d'un noyau possédant un moment cinétique $\vec{I}$ respectant les règles fondamentales ($I^2 = i(i+1)\hbar^2$ et sa projection sur un axe peut prendre l'une des $(2i+1)$ valeurs de $m_i \in [-i \dots i]$, $I_x = m_i \hbar$) peut être décrit par

$$\vec{\mu}_N = \frac{g_N \beta_N \vec{I}}{\hbar} \quad (4.1.13)$$

Les électrons non appariés d'un atome (centre paramagnétique) peuvent interagir non seulement avec le champ magnétique extérieur mais aussi avec leur noyau atomique ainsi que ceux des atomes voisins (cas d'une molécule). Dans ce cas, l'énergie d'interaction précédemment calculée comporte des termes supplémentaires car chaque dégénérescence $\vec{J}$ est elle-même dégénérée par $\vec{I}$ révélant ainsi la structure hyperfine du niveau d'énergie. Ainsi, on peut déterminer l'énergie d'interaction E d'un ensemble, formé par un centre paramagnétique et un noyau, plongé dans un champ magnétique $\vec{B}$

$$E = -\vec{\mu}_{total} \cdot \vec{B} + interaction = -\left(-\frac{g\beta}{\hbar} \vec{J} + \frac{g_N \beta_N}{\hbar} \vec{I}\right) \cdot \vec{B} + \frac{A}{\hbar^2} \vec{J} \cdot \vec{I} \quad (4.1.14)$$

L'énergie totale d'interaction des éléments est ici définie comme la contribution de l'énergie Zeeman du centre paramagnétique, l'énergie Zeeman du noyau ainsi que d'un paramètre de couplage hyperfin noté A entre le noyau et le centre paramagnétique. Sachant d'une part que le magnéton de Bohr nucléaire β_N est bien plus faible que le magnéton de Bohr électronique puisque la masse du proton est environ 1836 fois supérieure à la masse de l'électron

$$E = \frac{g\beta}{\hbar} \vec{J} \cdot \vec{B} + \frac{A}{\hbar^2} \vec{J} \cdot \vec{I} \quad (4.1.15)$$

Si l'on oriente l'axe x dans le même sens que le champ $\vec{B}$, on peut alors écrire

$$E = \frac{g\beta}{\hbar} B J_x + \frac{A}{\hbar^2} (J_x I_x + J_y I_y + J_z I_z) \quad (4.1.16)$$

Il est possible de montrer que les termes ne comportant pas J_x sont négligeables. De cette façon comme les valeurs de J_x sont $m_j \hbar \in [-j\hbar \dots +j\hbar]$ et I_x sont $m_i \hbar \in [-i\hbar \dots +i\hbar]$, les niveaux d'énergies sont définis par m_j et m_i formant ainsi $(2j+1) \times (2i+1)$ niveaux d'énergie donnés par

$$E_{n,\ell,m_j,m_i} = E_{n,\ell,0,0} + g\beta B m_j + A m_j m_i \quad (4.1.17)$$

où $E_{n,\ell,0,0}$ correspond à l'énergie du niveau dégénéré.

4.1.2 Spectromètre de résonance paramagnétique électronique

La spectrométrie de résonance paramagnétique électronique consiste à placer un échantillon de matière dans un champ magnétique intense puis à évaluer la transmission d'une

onde électromagnétique à travers cet échantillon. Si l'énergie $h\nu$ de l'onde électromagnétique correspond à la différence de niveau d'énergie entre deux niveaux de structure fine issus d'un même niveau dégénéré (et si des électrons se trouvent sur ce niveau d'énergie), une partie de l'onde incidente va être absorbée lorsque des électrons passeront des niveaux inférieurs de la transmission considérée vers des niveaux supérieurs. On appelle cette situation la condition de résonance. Selon les règles de sélection des transitions permises ($\Delta m_j = \pm 1$, $\Delta m_i = 0$), la fréquence correspondante est :

$$\nu = \frac{\beta}{h} \times g \times B + \frac{A}{h} \times m_i \quad (4.1.18)$$

où g et A sont des constantes définies précédemment qui sont dépendantes de l'élément chimique analysé.

Sur un spectromètre RPE, la source électromagnétique a généralement une fréquence constante. La recherche de la condition de résonance est effectuée en variant le champ magnétique généralement de manière sinusoïdale. Pour avoir un ordre de grandeur du rapport entre la fréquence utilisée par la source et le champ magnétique, on va négliger A et considérer une valeur typique $g = 2$ dans la relation précédente. On obtient ainsi :

$$\frac{\nu}{B} \approx \frac{\beta}{h} \times g = 28 \text{ GHz} \cdot \text{T}^{-1} \quad (4.1.19)$$

L'ordre de grandeur du champ magnétique maximal qu'il est raisonnablement possible de générer est de 1 T. Par conséquent, la source utilisée sur un spectromètre RPE rayonne dans le domaine micro-onde avec une fréquence de l'ordre de quelques GHz.

Il existe une dernière particularité propre à la spectrométrie RPE : on visualise généralement la dérivée première de l'onde transmise par rapport à la valeur de l'amplitude du champ magnétique.

La figure 4.1.2 représente l'ensemble des éléments constituant un spectromètre classiquement utilisé en RPE. Comme la fréquence du rayonnement électromagnétique est importante, un générateur micro-onde de type magnétron rayonnant une onde à la fréquence ν fixe avoisinant les 9 GHz dans nos conditions est utilisé. L'onde est dirigée à travers des guides d'ondes adaptés. Pour obtenir la condition de résonance, un balayage de l'intensité du champ magnétique est réalisé. L'utilisation d'électroaimants est généralement privilégiée puisque l'intensité du champ produit est directement proportionnelle au courant circulant dans les bobines ce qui facilite sa détermination. L'échantillon à caractériser est placée dans une cavité résonante à 9 GHz. Afin de pouvoir obtenir un signal image de la puissance consommée par l'échantillon, la diode du détecteur doit fonctionner dans sa partie linéaire. Cette diode, dont le courant de sortie, dépend de la composante électrique du rayonnement micro-onde doit donc être polarisée autour d'un courant I_D^0 . Cette polarisation est effectuée via le bras de référence qui permet de dédier une partie des micro-ondes à cette effet et de moduler le signal de référence à travers un iris.

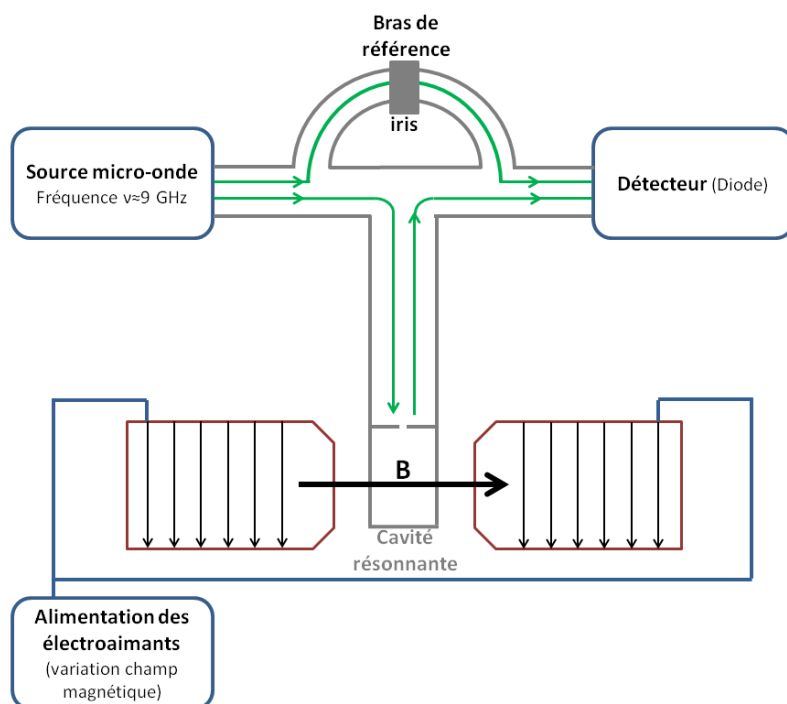


FIGURE 4.1.2 – Principe général de fonctionnement d'un spectromètre RPE

4.1.3 Analyse des spectres RPE

L'analyse des spectres RPE consiste principalement en une analyse graphique permettant une mise en forme numérique du signal dont un exemple est donné figure 4.1.3. Afin de pouvoir retrouver l'espèce ou les espèces que le piègeur a captées, on détermine trois critères principaux :

- Le premier permet de donner l'allure générale du signal à partir du nombre de pics et de leurs intensités. Ce facteur dénommé ratio d'intensité des transitions aurait pour valeur dans le cas présenté figure 4.1.3 : 1 : 2 : 1 : 1 : 2 : 1 : 1 : 2 : 1 correspondant à l'intensité normalisée des 9 transitions présente sur le signal RPE. Par convention ce sont les pics de plus basse intensité qui servent de référence pour la normalisation du signal RPE. Ce paramètre donne une indication importante sur les atomes présents dans la molécule. En effet, le nombre de transitions et leurs intensités dans un signal RPE sont définis par les nombres quantiques des atomes de la molécule.
- Le second paramètre que l'on appelle constantes de couplage fait référence à l'intensité magnétique qui sépare les transitions. Pour les déterminer, il suffit de calculer les distances entre les pics de même intensité dans le cas général. Afin de simplifier l'analyse des signaux RPE complexes seules la constante de couplage principale notée a_N et la constante de couplage secondaire notée a_H sont prises en compte. Dans le cas de la figure 4.1.3, la constante de couplage principale est identifiée à partir de l'espacement magnétique entre les transitions de plus forte intensités. Elle a pour valeur 16.2 Gauss. La constante de couplage secondaire est déterminée d'une manière similaire et a pour

valeur 10.3G. Ce paramètre permet une identification de la géométrie du radical détecté par RPE car les espacements dépendent de la position de l'atome (identifié par les 3 transitions principales) par rapport à l'électron non apparié.

- Pour finir le coefficient g est un autre facteur important pour l'identification d'un radical. Ce facteur représente la position du spectre total dans le champ magnétique. Pour l'identifier il faut tout d'abord définir le centre du spectre qui est la position de résonance qui est dans notre cas (fig. 4.1.3) d'environ 3395 Gauss. A partir de l'équation 4.1.19 il est alors possible de déterminer le facteur g correspondant. Dans l'exemple présenté et avec un spectromètre fonctionnant à une fréquence de 9.87 GHz le facteur g est alors de 2.0776.

L'identification du radical est possible à partir de ces trois paramètres par comparaison avec les nombreux résultats expérimentaux présents dans la littérature. Certains auteurs dont notamment Buettner *et al* [180] ont réalisé une synthèse bibliographique des différentes expérimentations concernant la résonance paramagnétique électronique. C'est principalement à partir de ce document de référence que les radicaux présentés dans cet ouvrage seront identifiés.

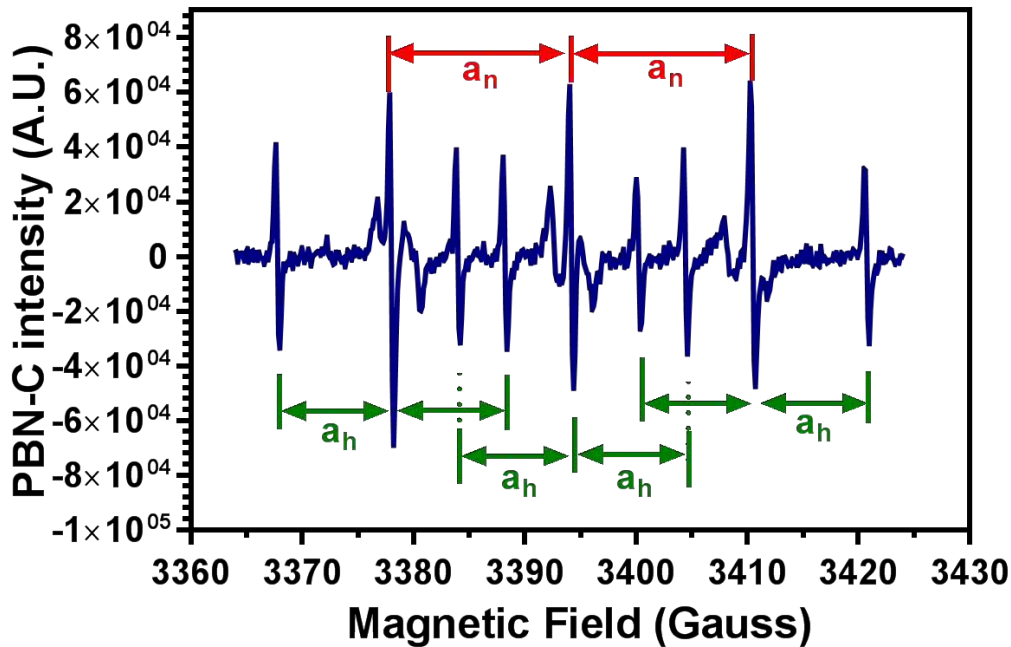


FIGURE 4.1.3 – Exemple de spectre RPE obtenu après exposition d'une solution de PBN au jet de plasma. La méthode permettant d'extraire les constantes de couplage est indiquée par la présence de flèches colorées.

4.1.4 Méthode de piégeage d'un radical

Le piégeage d'un radical forme un nouveau radical qu'il est possible de détecter par RPE car l'espèce formée avec le piègeur a une durée de vie beaucoup plus grande que le radical que l'on cherche à analyser.

4.1.4.1 Piégeur DMPO

Pour les espèces oxygénées, le piègeur utilisé est du DMPO de formule développée 5,5 – Dimethyl – 1 – pyrroline N – oxide. Celui-ci est composé d'une double liaison azote-carbone, voir figure 4.1.4a) qui confère ainsi à l'atome d'azote une charge positive et une simple liaison azote-oxygène qui rend ce dernier porteur d'une charge négative. Cette structure particulière facilite le piégeage de radicaux. En effet, lorsque qu'un radical se présente, la double liaison azote-carbone est remplacée par une liaison carbone-radical comme par exemple dans le cas du piégeage du radical hydroxyde ($\bullet\text{OH}$) présenté figure 4.1.4b). Ainsi, l'atome d'azote retrouve sa neutralité électrique et seul l'atome d'oxygène possède encore un électron non apparié.

La solution mère du piègeur est préparée à partir de 100 mg de DMPO Sigma-Aldrich dilué dans 1mL d'eau MilliQ donnant une concentration de DMPO de $883.7\mu\text{mol}/\text{ml}$ dans la solution (Poids moléculaire = 113.16 g.mol^{-1}). Lors des essais, 40 μL de la solution-mère du piègeur sont mélangés avec 100 μL du milieu de culture avant traitement par jet de plasma.

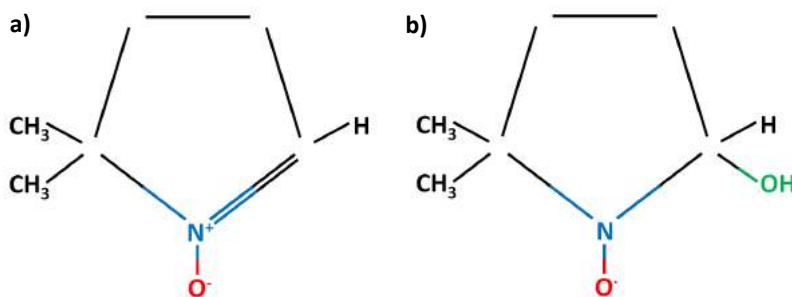


FIGURE 4.1.4 – Structure moléculaire du DMPO seul (a) et du DMPO ayant piégé le radical hydroxyde $\text{HO}\bullet$ (b)

4.1.4.2 Piégeur PBN

Le second piègeur utilisé est du PBN de formule *N – tert – butyl – α – phenylnitrone* dont la structure moléculaire est indiquée figure 4.1.5.

La solution-mère de piègeur présente une concentration en piègeur de $75.5\mu\text{mol}/\text{ml}$ par dilution de 22 mg de PBN Sigma-Aldrich dans 1.5 ml d'eau milliQ (Poids moléculaire = 194.2 g.mol^{-1}). De la même manière que pour la capture des espèces oxygénées et en présence d'un radical, le PBN rompt la double liaison azote-carbone et rend ainsi sa neutralité à l'atome d'azote. L'oxygène devient donc le seul élément avec un électron non apparié. La

molécule formée devient donc à son tour un radical détectable par RPE. Le radical piégé vient alors se fixer à la place de l'ancienne double liaison avec l'atome de carbone.

Les précédents dosages utilisés dans la partie 4.1.4 sont conservés soit 100 μl de solvant avec ajout de 40 μl de solution-mère piégeante afin de réaliser l'ensemble des expériences à volume constant lors des expositions au jet de plasma.

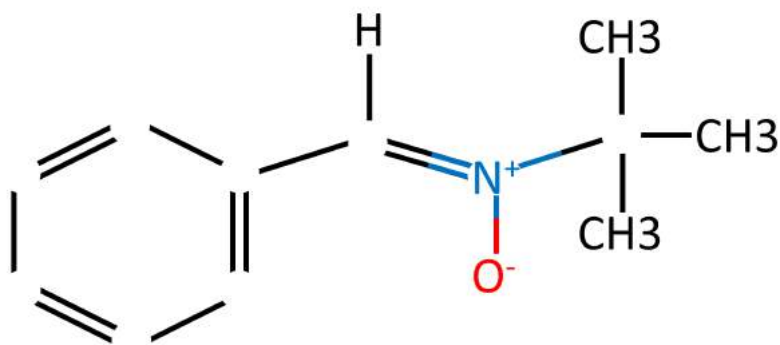


FIGURE 4.1.5 – Structure moléculaire du PBN

4.1.4.3 Piégeur TEMP

Le piégeur TEMP de formule 2,2,6,6 – *tetramethylpiperidine* dont la structure moléculaire est indiquée figure 4.1.6 est particulièrement utilisé pour son affinité avec l'oxygène singulet.

La solution-mère de piégeur d'oxygène singulet est préparée via l'ajout de 1.08 mg de piégeur dans 1 ml d'eau milliQ. La solution présente alors une concentration en piégeur de 7 $\mu\text{mol/ml}$ (Poids moléculaire = 155.24 g.mol^{-1}). 40 μL de solution-mère sont ajoutés dans les 100 μL de solvant avant exposition au jet de plasma.

L'adduit TEMP- $^1\text{O}_2$, résultat de l'interaction entre le TEMP et l'oxygène singulet, est extrêmement stable dans le temps. Par conséquent, le fabricant propose à la vente en plus du piégeur « vierge » l'adduit TEMP- $^1\text{O}_2$ appelé TEMPO. Les dilutions d'une solution de TEMPO permettront une quantification de l'oxygène singulet après lecture du signal RPE.

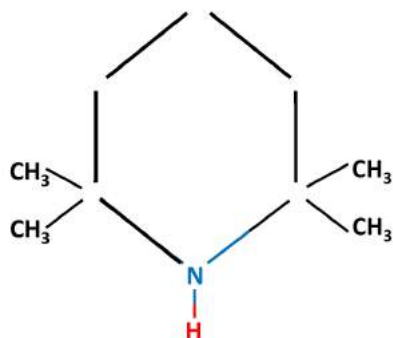


FIGURE 4.1.6 – Structure moléculaire du TEMP

4.1.4.4 Piégeur carboxy-PTIO

Le sel de potassium carboxy-PTIO est un piégeur de radicaux atypique. Au lieu de piéger un radical afin de devenir à son tour radicalaire, celui-ci est naturellement radicalaire comme le montre la figure 4.2.a avec la présence d'un atome d'oxygène possédant un électron non apparié. Suite à la réaction du C-PTIO avec l'oxyde nitrique, les produits formés sont des nitrites (NO_2^-) et du carboxy-PTIO représenté figure 4.2.b. Cette réaction va permettre la destruction du couple N^+O^- du carboxy-PTIO et va donc changer son spectre RPE. L'évolution des deux spectres permet alors la quantification de l'oxyde nitrique en milieux aqueux.

Les solutions-mères de piégeur de Carboxy-PTIO sont réalisées par l'ajout de 1.3246 mg de piégeur dans 2mL de solvant afin d'obtenir des solutions-mères dont la concentration en piégeur est de 2.1mM (Poids moléculaire = $315.39 \text{ g.mol}^{-1}$). 40 μL de solution-mère sont ajoutés dans les 100 μL de solvant avant exposition au jet de plasma. Ainsi la concentration dans les puits est de 833 μM .

Le carboxy-PTIO ayant une signature radicalaire, des dilutions de la solution-mère non exposée sont utilisées pour réaliser les courbes d'étalonnage dans chaque liquide.

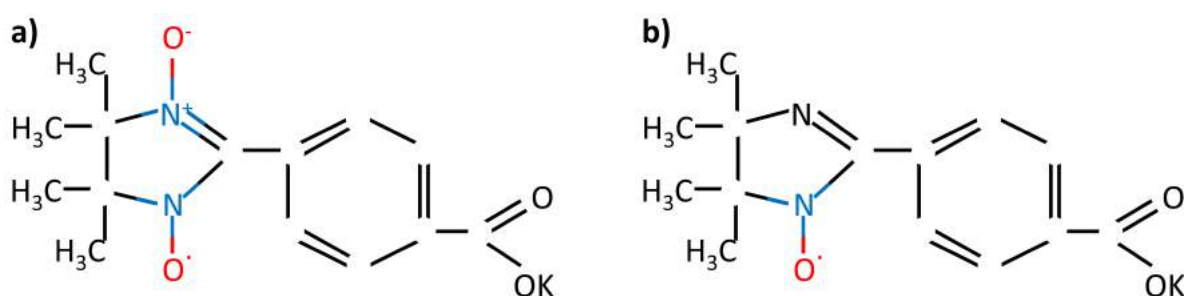


TABLE 4.2 – Structure moléculaire du (a) Carboxy-PTIO seul et (b) le carboxy-PTI résultant de la réaction du carboxy-PTIO avec le radical oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$)

4.2 Fluorométrie

La fluorométrie appelée également spectroscopie de fluorescence est un type de spectroscopie électromagnétique qui permet la mise en évidence et la quantification de certains composés à travers la fluorescence d'un échantillon. Pour cela, des réactifs composés la plupart du temps de deux entités sont ajoutés dans un échantillon à analyser. Le réactif est en général composé d'une molécule capable de se fixer au composé à identifier ou capable d'être oxydée par ce dernier. Cette molécule peut être directement rendue fluorescente par oxydation. Dans le cas contraire, une seconde molécule est rajoutée afin d'être à son tour oxydée par le premier composé pour la rendre fluorescente.

La méthode de fluorométrie nécessite donc l'utilisation d'un appareil appelé Fluoromètre ou Fluorimètre capable d'exciter l'échantillon à la longueur d'onde correspondant à l'excita-

tion du fluorochrome. De plus, l'appareil doit pouvoir être réglé afin de mesurer l'émission de lumière générée par la fluorescence du fluorochrome. Afin d'éviter toute contamination d'un échantillon par la mesure d'un échantillon voisin, les mesures sont effectuées dans des plaques 96 puits à fond noir empêchant ainsi à la lumière d'atteindre les puits voisins de celui en cours d'analyse. Le lecteur de plaque utilisé lors de nos mesures est un CLARIOstar de la marque BMG LABTECH qui permet entre autre de fournir une gamme spectroscopique d'émission et d'excitation comprise entre 320nm et 850nm, qui peut être contrôlé en température jusqu'à 45°C et également contrôlé en dioxygène et en dioxyde de carbone entre 0.1 et 20 %.

La fluorométrie offre l'avantage d'une sensibilité beaucoup plus importante que des méthodes classiques de colorimétrie ou de spectroscopie d'absorption.

4.2.1 Dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Le dosage du peroxyde d'hydrogène est composé dans un premier temps de Peroxydase de Raifort (Horseradish Peroxidase) enzyme provenant du raifort qui est très utilisé notamment en biochimie pour son action catalytique dans les réactions d'oxydo-réduction. Cette enzyme permet la catalyse de la réaction transformant le peroxyde d'hydrogène en eau via la formule :



Dans cette formule, AH_2 joue le rôle de réducteur. Le second composé nécessaire à la détection du peroxyde d'hydrogène est donc un élément réducteur qui doit être neutre sous sa forme originale et fluorescent dans sa forme réduite. Le produit fourni dans le kit utilisé est de l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) structuralement semblable à la Résurazine, qui une fois réduit forme de la Résorufine, composé fluorescent de teinte violette. Ses particularités sont une excitation à la longueur d'onde $\lambda_{ex} = 540$ nm et une émission à la longueur d'onde $\lambda_{em} = 590$ nm.

Le kit utilisé (Sigma-Aldrich, MAK165) permet le dosage de peroxyde d'hydrogène pour une gamme comprise entre 0 et 10 μ M. Il est donc indispensable de réaliser une dilution (1/50) de nos échantillons pour arriver dans la gamme de mesure permise par le kit et bien entendu dans la zone linéaire de la courbe d'étalonnage. De plus, les milieux de cultures utilisés, DMEM ou DMEM+10% SVF, possèdent tout les deux une absorbance importante dans la zone d'émission de part la présence de rouge phénol et de sérum de veau fœtal dans leur composition. C'est pourquoi il est indispensable de réaliser une courbe d'étalonnage pour chaque type de milieu utilisé lors de nos mesures comme indiqué figure 4.2.1 .

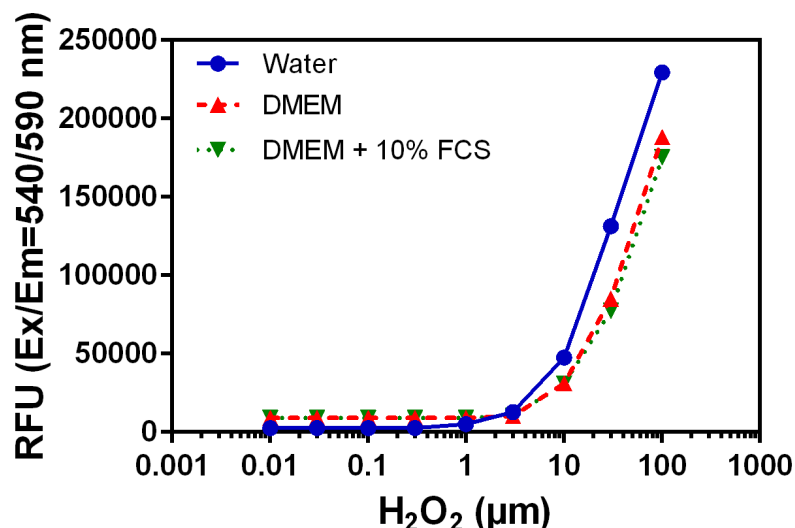


FIGURE 4.2.1 – Courbe d'étalonnage du peroxyde d'hydrogène dans trois liquides.

4.3 Mesure d'absorbance pour le dosage des nitrates et nitrites

Couramment utilisé pour les mesures de concentrations chimiques en solution, les mesures d'absorbance reposent sur la capacité d'un milieu à absorber une radiation qui le traverse. Lors des réactions chimiques entre un composé chimique de détection et un élément à quantifier, la modification du composé induit une modification de l'absorbance du milieu. A travers l'utilisation de solution étalon il est alors possible de déterminer un abaque reliant l'absorbance d'un milieu à une longueur d'onde définie en fonction de la concentration en élément à quantifier.

4.3.1 Dosage des nitrites et nitrates (NO_2/NO_3)

La détection des nitrites et nitrates est réalisée à partir des éléments de Griess. L'ion nitrite va réagir dans un premier temps avec de l'acide sulfanilique (Réactif A) pour former un sel de diazonium. L'adjonction du réactif B composé d' α -naphtylamine va alors former un produit de coloration rouge dont la longueur d'onde maximale est à 540 nm. La mesure de la concentration des nitrates est effectuée de la même manière en tenant compte d'un temps d'incubation pendant lequel une enzyme Nitrate Reductase va permettre la conversion des nitrates en nitrites. Ainsi, le dosage des deux espèces se fait d'une part par la mesure directe de la concentration des nitrites puis de leur concentration en présence de l'enzyme. La soustraction des deux réponses donne alors la concentration des nitrates présents dans le solvant.

Le kit utilisé (Sigma-Aldrich, 23479) permet le dosage des nitrites et nitrates dans des proportions métaboliques comprises entre 0 et 10 μ M. Une dilution (1/20) est donc indis-

pensable pour pouvoir rentrer dans la zone de linéarité du kit. De même, l'utilisation de milieu de culture comportant du rouge phénol dans la zone d'absorbance du produit de coloration oblige l'utilisation de milieu sans rouge phénol. Les courbes d'étalonnage utilisent des solutions-mères de NaNO_2 et NaNO_3 et sont réalisées en triplicata pour chaque solvant étudié. Le lecteur de plaque utilisé lors de nos mesures est un CLARIOstar de la marque BMG LABTECH qui permet la mesure d'absorbance à 540 nm (maximum d'absorbance préconisé par le fabricant) mais également une mesure plus large de 500 à 600 nm pour observer le cas échéant un déplacement des pics d'absorbance et une éventuellement pollution par les solvants.

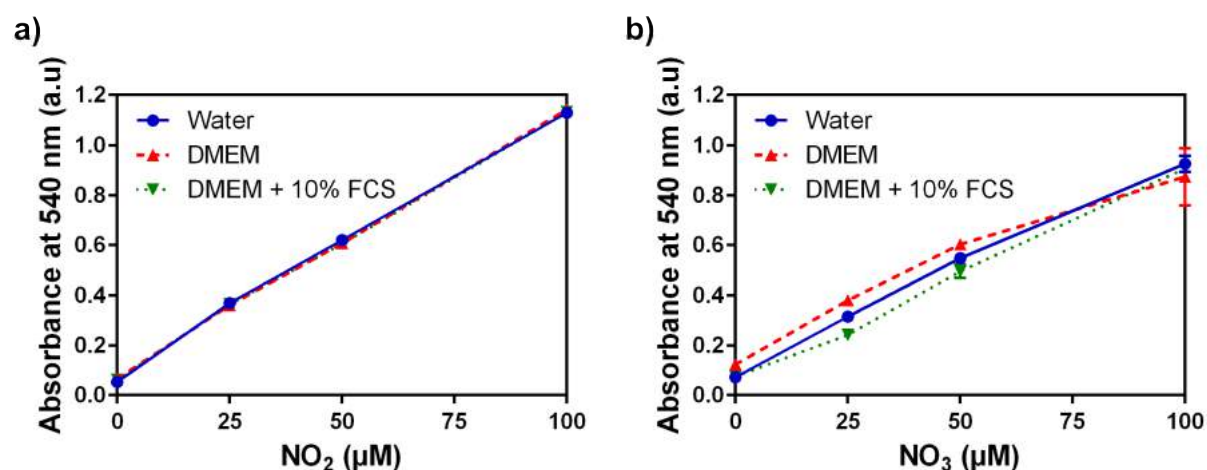


FIGURE 4.3.1 – Courbe d'étalonnage des nitrites (a) et des nitrates (b) dans trois liquides.

Chapitre 5

Caractérisation des jets de plasma froid

Toutes les substances actives présentes dans un liquide activé par plasma ont pour origine la composition même de ce dernier. C'est pourquoi de nombreux diagnostics plasma sont régulièrement mis en œuvre par les équipes de recherche qui conçoivent et/ou utilisent des jets de plasma pour des applications biomédicales. Ce chapitre a pour objectif de présenter les diagnostics qui ont été utilisés pour caractériser les jets de plasmas employés durant cette thèse.

5.1 Outils de diagnostic optique

La quasi totalité des diagnostics des jets de plasma à la pression atmosphérique est réalisée à partir de l'analyse des radiations émises par les espèces excitées par le plasma. Avant de voir quelles sont les informations qu'il est possible de déterminer de manière optique, nous allons présenter le spectromètre utilisé lors de cette thèse, le dispositif de mesure de l'irradiance des radiations émises par le plasma dans la région UV-C du spectre électromagnétique ainsi que la caméra haute vitesse utilisée pour déterminer la vitesse d'expansion des jets de plasma DBD.

5.1.1 Le spectromètre

La spectroscopie d'émission optique est réalisée en utilisant un spectrophotomètre de 0,75 m de longueur focale (Acton Spectra SP 2750, dans la configuration Czerny Turner) équipé de trois réseaux de diffraction : un réseau avec 2400 tr/mm blazé à 240 nm pour la spectroscopie UV et deux réseaux 1800 tr/mm et 600 tr/mm blazés à 500 nm pour la spectroscopie visible et proche IR. Le spectromètre est équipé d'une caméra CCD (PIXIS - 100, 1340 x 100 pixels de taille 20 μm x 20 μm chacun). Les radiations du plasma sont guidées à travers une fibre optique (LG-UV-silicium 455-020-3) sur la fente d'entrée (200 μm de large) du spectromètre. Le domaine spectral que couvre le spectromètre est de 200 nm à 920 nm. Un filtre passe-haut optique est utilisé pour l'analyse de la gamme du visible dans

le but d'éviter toute perturbation des spectres visibles par le second ordre de diffraction des radiations UV. Les radiations latérales issues des jets de plasma sont recueillies par un système optique à grossissement 2x qui offre une résolution spatiale de 1 mm. Ce système optique est monté sur un support coulissant pour effectuer un balayage le long de l'axe du jet de plasma. Un exemple de spectre obtenu dans la région UV du spectre électromagnétique est donné figure 5.2.1.

5.1.2 L'irradiance mètre UV-C

L'irradiance UV-C (190-280 nm) est déterminée à l'aide d'une photodiode qui est uniquement sensible aux radiations entre 225 et 280 nm (SG01S-C18, sglux GmbH, voir fig 5.1.1). Cette photodiode est conditionnée dans un circuit transimpédance présentant deux caractéristiques importantes :

1. La tension aux bornes de la photodiode est nulle (fonctionnement en mode photovoltaïque) donc le courant fourni par cette dernière est proportionnel à l'éclairement reçu. On parlera donc de photo-courant.
2. Le photo-courant est converti en tension avec un gain de 10^6 V/A

Le circuit transimpédance est suivi d'une chaîne d'amplification à base d'amplificateurs opérationnels. Ce circuit est équipé d'un système de réglage d'offset permettant la mise à 0V de la sortie lorsque la photodiode n'est pas éclairée par un rayonnement UV-C. Le gain total de la chaîne d'amplification est de 1,82 V/nA.

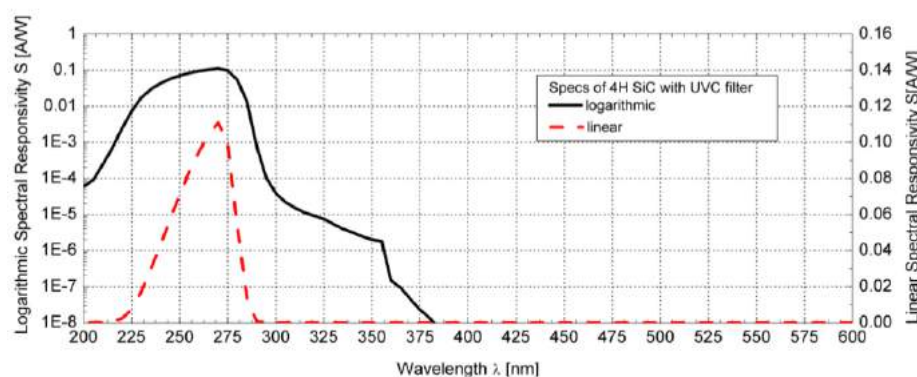


FIGURE 5.1.1 – Rendement quantique de la photodiode UV-C d'après la documentation constructeur

5.1.3 Caméra haute vitesse

L'évolution spatiale du jet de plasma est déterminée en utilisant une caméra intensifiée 512x512 CCD-array (PI-MAX Princeton Instruments) équipée d'un objectif Nikkor AF Micro 60 mm. La caméra peut enregistrer une image avec une durée d'exposition de seulement

4 ns permettant de suivre le développement d'un jet de plasma DBD. Sa sensibilité spectrale couvre le spectre visible (360-920 nm).

5.2 Caractérisations optiques des jets de plasma

5.2.1 Estimation de l'irradiance UV-C

Le photo-courant i_{ph} issu de la photodiode UV-C dépend du flux lumineux spectrique $\varphi(\lambda)$ arrivant sur la photodiode et du rendement quantique $\eta(\lambda)$ de cette dernière (η est représenté sur la fig. 5.1.1) :

$$i_{ph} = \int_{\lambda} \varphi(\lambda) \times \eta(\lambda) \times d\lambda \quad (5.2.1)$$

Pour déterminer l'intensité absolue du rayonnement UV-C reçu par la photodiode, il est nécessaire de connaître l'allure $S(\lambda)$ du spectre sur la plage de sensibilité de la photodiode. Autrement dit, il faut utiliser un spectromètre (un exemple de spectre issu d'un jet de plasma d'argon est présenté sur la fig 5.2.1). $S(\lambda)$ est normalisée de sorte que son aire soit égale à un : $\int S(\lambda) d\lambda = 1$. Dans ce cas, on a :

$$\varphi(\lambda) = \Phi \times S(\lambda) \quad (5.2.2)$$

où Φ est la puissance lumineuse du flux (en W) arrivant sur la photodiode dans l'UV-C. Ainsi :

$$i_{ph} = \Phi \times \int_{\lambda} S(\lambda) \times \eta(\lambda) \times d\lambda \quad (5.2.3)$$

La tension U mesurée en sortie du circuit amplificateur de gain G permet donc d'évaluer Φ avec la relation :

$$\Phi = \frac{U}{G \times \int_{\lambda} S(\lambda) \times \eta(\lambda) \times d\lambda} \quad (5.2.4)$$

Pour finir, on calcule l'irradiance UV-C (en $\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) en divisant la puissance lumineuse UV-C par la surface photosensible de la photodiode ($0,06 \text{ mm}^2$).

Étant donné que le rendement quantique de la photodiode n'est pas étalonné mais extrait de la documentation du fabricant dans laquelle aucune information n'est donnée quant à la variation du rendement quantique d'un composant à un autre, il paraît raisonnable de considérer les résultats obtenus non comme des estimations précises de la puissance lumineuse mais plutôt comme une bonne évaluation de l'ordre de grandeur de cette dernière.

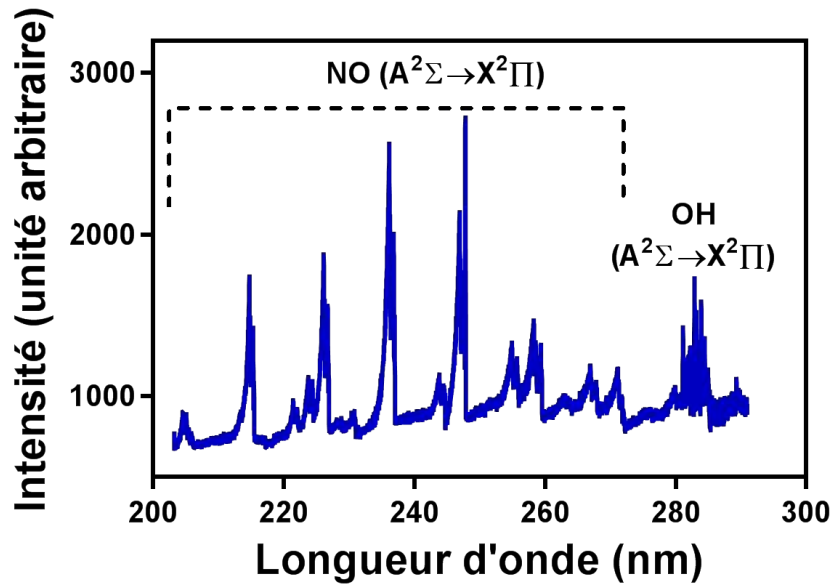


FIGURE 5.2.1 – Exemple de spectre d'émission d'un jet plasma d'argon .

5.2.2 Estimation de la température apparente du jet de plasma

L'émission UV du radical OH est souvent utilisée comme thermomètre moléculaire pour estimer la température de gaz en flammes ou de gaz chauds. Dans les plasmas générés dans l'air ambiant, ce radical est formé à partir de la vapeur d'eau contenue dans l'air et dissociée par le plasma. La température de rotation de la bande moléculaire de OH comprise entre 306 nm et 310 nm (transition $A^2\Sigma, v = 0 \rightarrow X^2\Pi, v' = 0$) est considérée comme proche de la température de gaz [181, 182, 183]. Cette température est généralement déterminée par l'ajustement d'un spectre synthétique (simulé), dépendant de la température, sur le spectre expérimental ou en effectuant un diagramme de Boltzmann des transitions radiatives du radical OH. Dans ce travail, nous avons choisi la première méthode, car de petites incertitudes expérimentales peuvent conduire à une incertitude significative de la température lors du calcul de la régression linéaire du diagramme de Boltzmann en particulier lorsque les niveaux d'énergie supérieurs des transitions sont proches. La génération du spectre synthétique est clairement détaillée dans la référence [183] suite aux travaux de Dieke et Crosswhite [184]. Un exemple de l'évolution du spectre synthétique avec la température rotationnelle est donnée sur la figure 5.2.2.

5.2.3 Température d'excitation

La température d'excitation correspond au degré d'excitation de la population d'une espèce chimique donnée. De manière générale, plus la température d'excitation est élevée, plus les niveaux d'énergie élevée des atomes ou molécules sont peuplés. Cette grandeur est utilisée dans le cas d'un plasma hors équilibre thermodynamique. Seul le cas de l'argon a

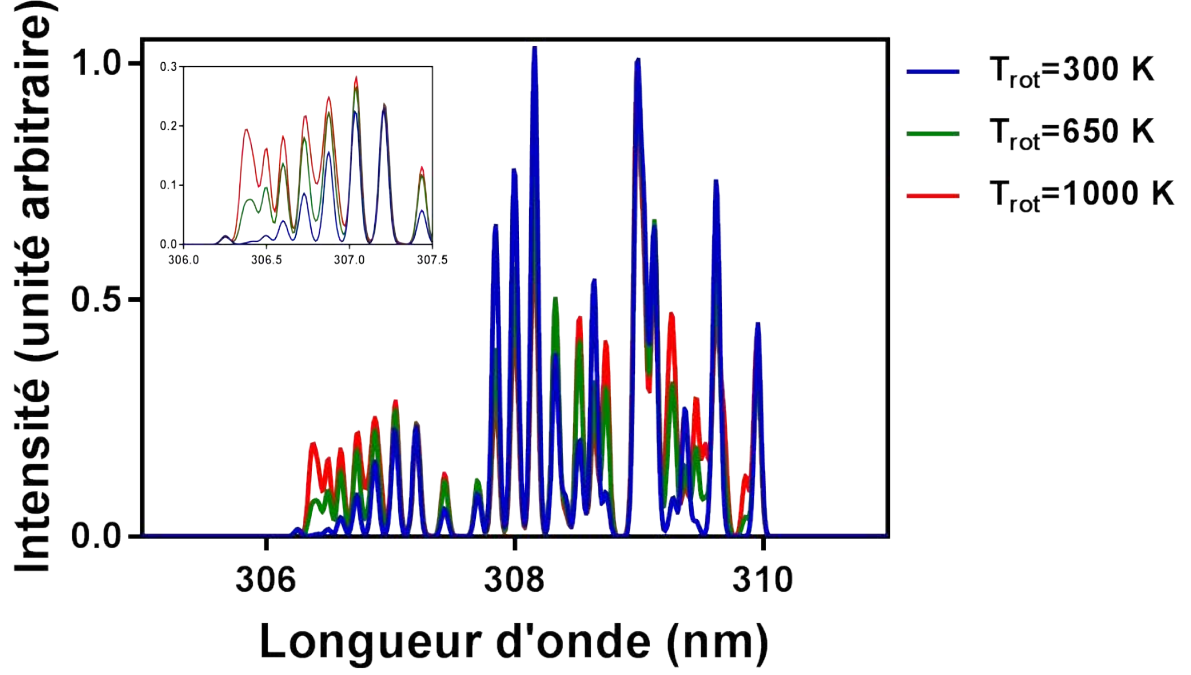


FIGURE 5.2.2 – Spectre synthétique d'émission UV du radical OH (transition $A^2\Sigma, v = 0 \rightarrow X^2\Pi, v' = 0$) pour une température rotationnelle de 300 K, 650 K et 1000 K.

été considéré pendant ces travaux.

La température d'excitation T_{exc} des atomes d'argon a été déterminée à partir d'un diagramme de Boltzmann en supposant une distribution de Boltzmann des différents niveaux excités Ar I dans le jet de plasma (4p, 5p et au-delà). Selon cette hypothèse, la relation entre $\ln\left(\frac{I_i \lambda_i}{A_{ij} g_i}\right)$ et E_i (énergie du niveau supérieur de la transition) est linéaire et la pente de la courbe est inversement proportionnelle à la température d'excitation :

$$\ln\left(\frac{I_i \lambda_i}{A_{ij} g_i}\right) = -\frac{1}{k_B T_{exc}} E_i + b \quad (5.2.5)$$

L'intensité I_i correspond à l'aire totale de la raie d'émission i , λ_i est la longueur d'onde de cette raie, g_i est le poids statistique du niveau i et A_{ij} est la probabilité de transition spontanée du niveau i vers un niveau inférieur j . k_B est la constante de Boltzmann et b est une constante. Les paramètres spectraux des raies Ar I utilisées dans cette étude sont résumés dans le tableau 5.1. Pour optimiser la qualité de la mesure, il est important de considérer des transitions (les raies spectrales) les plus éloignées les unes des autres en termes d'énergie E_i . L'ordre de grandeur de la température d'excitation des jets de plasma à la pression atmosphérique est de quelques milliers de K.

$\lambda(\text{nm})$	$E_i(\text{eV})$	g_i	$A_{ij}(10^8\text{s}^{-1})$	Transition	Type de jet
425.1	14.48	3	0.00113	5p-4s	MW argon
425.9	14.75	1	0.0415	5p-4s	MW argon
426.6	14.55	5	0.00333	5p-4s	MW argon
427.2	14.54	3	0.0084	5p-4s	MW argon
430.0	14.52	5	0.0394	5p-4s	MW argon
518.8	15.31	5	0.0038	5d-4p	MW argon
522.1	15.47	9	0.0092	7d-4p	MW argon
549.6	15.31	5	0.0138	6d-4p	MW argon
555.9	15.15	5	0.0148	5d-4p	MW argon
560.7	15.13	3	0.0229	5d-4p	MW argon
591.2	15.02	3	0.0105	5d-4p	MW argon
603.2	15.15	9	0.0246	5d-4p	MW argon
641.6	14.86	5	0.0121	6s-4p	MW argon
675.28	14.74	5	0.0193	4d-4p	DBD argon
696.5	13.34	3	0.067	4p'-4s	MW argon
703.03	14.84	5	0.0267	6s-4p	DBD argon
706.7	13.32	5	0.0395	4p'-4s	MW argon
738.4	13.30	5	0.0847	4p-4s	DBD argon
750.4	13.5	1	0.472	4p'-4s'	MW argon
751.47	13.27	1	0.402	4p-4s	DBD argon
794.82	13.28	3	0.186	4p-4s	DBD argon
800.62	13.17	5	0.049	4p-4s	DBD argon
801.48	13.09	5	0.0928	4p-4s	DBD argon
810.37	13.15	3	0.25	4p-4s	DBD argon
826.5	13.34	3	0.168	4p'-4s'	MW argon
840.82	13.30	5	0.223	4p-4s	DBD argon
842.5	13.11	5	0.233	4p'-4s	MW argon
852.14	13.28	3	0.139	4p-4s	DBD argon
866.8	13.16	3	0.028	4p'-4s'	MW argon

TABLE 5.1 – Paramètres spectraux des raies Ar I considérées pour la réalisation des diagrammes de Boltzmann

5.2.4 Densité électronique du plasma

La densité électronique du plasma, c'est-à-dire la concentration en électrons libres, a été estimée à partir de l'élargissement des raies H_α et H_β de la série de Balmer de l'atome d'hydrogène situées respectivement à 656.3 et 486,1 nm. Le profil d'élargissement de la raie correspond à un profil de Voigt $V(x)$ résultant de la convolution de plusieurs élargissements de raie :

- L'élargissement naturel qui est généralement négligeable ;
- L'élargissement Doppler $D(x)$ induit par l'agitation thermique des atomes émetteurs.

Ce phénomène induit un élargissement de forme gaussienne ;

- Les élargissements de van der Waals $W(x)$ et de Stark $S(x)$ (élargissements de pression).

À la pression atmosphérique, ces élargissements ont une forme Lorentzienne ;

- L'élargissement $I(x)$ dû au spectromètre. Sa forme est proche d'une gaussienne dans nos conditions.

Les élargissement naturel et résonnant des raies de la série de Balmer sont habituellement négligeables à la pression atmosphérique alors que les autres mécanismes sont décrit par des profils Gaussien ou Lorentzien :

$$D(x) = 2 \times \sqrt{\frac{\ln(2)}{\pi w_D^2}} \times \exp \left(-4 \ln(2) \times \left(\frac{x}{w_D} \right)^2 \right) \quad (5.2.6)$$

$$I(x) = 2 \times \sqrt{\frac{\ln(2)}{\pi w_I^2}} \times \exp \left(-4 \ln(2) \times \left(\frac{x}{w_I} \right)^2 \right) \quad (5.2.7)$$

$$S(x) = \frac{2}{\pi} \times \frac{w_S}{4x^2 + w_S^2} \quad (5.2.8)$$

$$W(x) = \frac{2}{\pi} \times \sum_{i=1}^3 A_i \times \frac{w_{wi}}{4x_i^2 + w_{wi}^2} \quad (5.2.9)$$

$$V(x) = D \otimes I \otimes S \otimes W \quad (5.2.10)$$

où $x = \lambda - \lambda_0$ ($\lambda_0 = 486,135$ nm ou 656.286 nm) et le paramètre w correspond à la largeur à mi-hauteur (FWHM) de chaque élargissement.

Le profil d'élargissement de Van der Waals $W(x)$ est la somme de trois composantes de structure fine (FSC) de l'atome d'hydrogène respectivement centrées à $\lambda_1 = 486,133$ nm (transition 4d-2p), $\lambda_2 = 486,129$ nm (transition 4p-2s) et $\lambda_3 = 486,135$ nm (transition 4s-2p) dans le cas de la raie H_β et des raies centrées sur $\lambda_1 = 656.281$ nm (transition 3d-2p), $\lambda_2 = 656.274$ nm (transition 3p-2s) et $\lambda_3 = 656.286$ nm (transition 3s-2p) pour la raie H_α . A_i correspond à l'intensité relative de chaque raie. Ce paramètre a été extrait à partir de la référence [185] et est présenté dans le tableau 5.2.

La largeur à mi-hauteur des profils d'élargissement Doppler, Stark et van der Waals est

H_α	$\lambda_1 = 656.281\text{nm}$	$\lambda_1 = 656.274\text{nm}$	$\lambda_1 = 656.286\text{nm}$
A_i	$A_1 = 1$	$A_2 = 0.208$	$A_3 = 0.020$
K_{1i}	$K_{11} = 2.696 \times 10^{-8}$	$K_{12} = 3.077 \times 10^{-8}$	$K_{13} = 3.402 \times 10^{-8}$
K_p	3.095×10^{-10}		
K_S	0.549		
K_D	4.7		
H_β	$\lambda_1 = 486.133\text{nm}$	$\lambda_1 = 486.133\text{nm}$	$\lambda_1 = 486.133\text{nm}$
A_i	$A_1 = 1$	$A_2 = 0.281$	$A_3 = 0.025$
K_{1i}	$K_{11} = 2.757 \times 10^{-8}$	$K_{12} = 2.945 \times 10^{-8}$	$K_{13} = 3.069 \times 10^{-8}$
K_p	3.095×10^{-10}		
K_S	4.8		
K_D	3.5		

 TABLE 5.2 – Paramètres des différents élargissements des raies H_α et H_β dans un plasma d'argon

liée à la pression du gaz p , la température T et la densité électronique du plasma n_e [186, 187] comme suit :

$$w_D(nm) = K_D \times 10^{-4} \times \sqrt{T(K)} \quad (5.2.11)$$

$$w_S(nm) = K_S \times \left(\frac{n_e(m^{-3})}{10^{23}} \right)^{0.68} \quad (5.2.12)$$

$$w_{wi}(nm) = 5.925 \times 10^{14} \times K_{1i} \times K_p \times p(mbar) \times T(K)^{-0.7} \quad (5.2.13)$$

K_D et K_S sont des coefficients qui dépendent de la raie de Balmer considérée et K_{1i} est un coefficient qui dépend des structures fines impliquées dans l'élargissement de van der Waals. Ces paramètres sont issus de la référence [187] et récapitulés dans le tableau 5.2. Le coefficient K_p prend en compte la perturbation du gaz porteur sur l'élargissement de van der Waals des raies d'hydrogène. Ce coefficient vaut : 1.43×10^{-10} dans le cas de l'hélium et 3.095×10^{-10} pour de l'argon.

La figure 5.2.3 présente la contribution des différents élargissements de la raie H_β d'un jet de plasma d'argon dans l'air pour une pression de 1000 mbar et une température de 800 K.

5.2.5 Concentration d'oxygène atomique

Deux multiplets d'oxygène ont toujours été présents dans les spectres expérimentaux des différents jets de plasma utilisés pendant cette thèse. Le premier est situé à environ $\lambda = 777,34$ nm et le second autour de $\lambda = 844,65$ nm. En supposant que la température d'excitation de l'oxygène atomique est identique à celle de l'argon, il est possible d'estimer la concentration d'oxygène atomique dans un jet d'argon. Pour cela on considère le rapport entre l'intensité du multiplet de l'oxygène à 844.65 nm et celle de la raie d'argon à 852.14 nm.

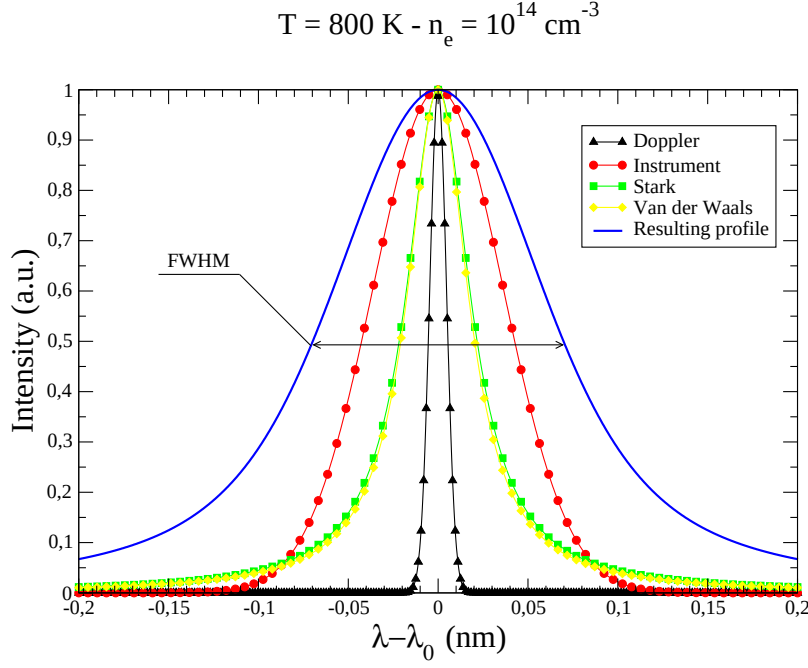


Figure 5.2.3 – Calcul de l'élargissement de la raie H_β d'un plasma d'argon dans l'air à la pression atmosphérique, à une température de 800 K et une densité électronique de 10^{20} cm^{-3}

Il est possible de montrer que ce rapport est proportionnel au rapport des concentrations respectives N_{Ar} et N_O de ces deux espèces :

$$\frac{N_O(z)}{N_{Ar}(z)} = \frac{I_{844}(z)}{I_{852}(z)} \times \frac{g_{852}}{g_{844}} \times \frac{q_0}{q_{Ar}} \times \frac{\lambda_{844}}{\lambda_{852}} \times \frac{A_{852}}{A_{844}} \times \frac{\gamma_{852}}{\gamma_{844}} \times \exp\left(\frac{E_{844} - E_{852}}{k_B T_{exc}}\right) \quad (5.2.14)$$

à la pression atmosphérique, le quenching est le processus de dépeuplement majoritaire :

$$\frac{\gamma_{852}}{\gamma_{844}} = \frac{A_{852}}{A_{852} + A_{795} + Q_{Ar}} \times \frac{A_{844} + A_{672} + Q_O}{A_{844}} \approx \frac{A_{852}}{A_{844}} \times \frac{Q_O}{Q_{Ar}} \quad (5.2.15)$$

où g correspond à la dégénérescence du niveau supérieur des deux transitions radiatives, q est la fonction de partition de l'oxygène et de l'argon, A est la probabilité de transition radiative, γ est le rendement quantique des transitions radiatives, E est l'énergie du niveau supérieur des transitions, T_{exc} est la température d'excitation et Q est la probabilité de quenching¹ de la population du niveau supérieur de la transition. Les paramètres spectroscopiques constants de la relation précédente sont donnés dans le tableau 5.3. Comme expliqué précédemment, quelque soit le type de jet argon utilisé, le plasma est généré à l'intérieur du tube de verre dans un gaz d'argon quasi pur impliquant de faibles proportions d'impuretés (O_2 , H_2O , ...) et se propage ensuite dans l'air ambiant contenant essentiellement

1. Le quenching représente l'ensemble des processus de dépeuplement non radiatif d'un niveau d'énergie d'un élément chimique

de l'oxygène et de l'azote moléculaire. La concentration de l'oxygène atomique peut être raisonnablement supposée plusieurs ordres de grandeur inférieure à la concentration d'argon. Dans ces conditions, $\frac{\gamma_{852}}{\gamma_{844}}$ est estimé entre 0,1 en sortie du jet dans l'air où l'argon est majoritaire et 0,3 loin à plus grande distance où l'air est majoritaire. Étant données les incertitudes expérimentales, en particuliers celle de T_{exc} , la méthode ne peut prétendre fournir un résultat précis. Nous ne déterminerons donc qu'un ordre de grandeur de la concentration en oxygène atomique en imposant $\frac{\gamma_{852}}{\gamma_{844}} = 1$.

La concentration d'argon $N_{Ar}(0)$ à la sortie du tube est évaluée à partir de la loi des gaz parfaits en considérant que seul ce gaz est présent dans cette région. Ensuite, l'évolution de la concentration d'argon le long de l'axe des jets a été estimée en fonction de la variation relative de l'émission des raies d'argon par :

$$N_{Ar}(z) = N_{Ar}(0) \times \frac{I_{852}(z)}{I_{852}(0)} \quad (5.2.16)$$

Nous avons implicitement considéré que la température d'excitation de l'argon ne varie pas significativement le long de l'axe du jet. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement.

La concentration d'oxygène atomique est ensuite obtenue en insérant l'équation 5.2.16 dans l'équation 5.2.14. Compte-tenu des valeurs du tableau 5.3, on obtient :

$$N_O(z) \approx N_{Ar}(0) \times \frac{I_{844}(z)}{I_{852}(0)} \times \exp\left(\frac{-26551}{T_{exc}(K)}\right) \quad (5.2.17)$$

Un exemple, basé sur l'utilisation des deux équations précédentes pour la détermination de la concentration d'argon et d'oxygène atomique le long d'un jet de plasma surfatron, est présenté sur les figures 5.2.4 et 5.2.5.

Pour finir, il est important de souligner que cette méthode est adaptée pour l'estimation de la concentration de l'oxygène atomique dans un jet d'argon car les niveaux d'énergie E_{844} et E_{852} sont assez proches. Par conséquent, l'incertitude faite sur la détermination de T_{exc} n'est pas trop amplifiée par l'exponentielle. Cela n'est pas le cas pour un jet d'hélium car il n'existe pas de raie d'émission de cet élément dont le niveau supérieur est comparable à celui d'une raie d'oxygène dans le visible (pratiquement 10 eV d'écart au minimum).

λ_{844} (oxygène)	λ_{852} (argon)
$g_{844} = 9$	$g_{852} = 3$
$q_O = 7$	$q_{Ar} = 1$
$A_{844} = 3.22 \times 10^7 s^{-1}$	$A_{852} = 1.39 \times 10^7 s^{-1}$
$A_{672} = 6.44 \times 10^2 s^{-1}$	$A_{795} = 1.86 \times 10^7 s^{-1}$
$E_{844} = 10.99 eV$	$E_{852} = 13.28 eV$

TABLE 5.3 – Paramètres spectroscopiques de l'oxygène et de l'argon pour les raies λ_{844} et λ_{852}

Collision type	$\sigma \text{ (cm}^2\text{)}$
Ar-Ar	6.6×10^{-16}
Ar-O ₂	1.3×10^{-14}
O-O ₂	1.0×10^{-14}
O-Ar	1.5×10^{-16}

Table 5.4 – Sections efficaces de quenching de l’oxygène et de l’argon [11]. On a considéré $\sigma_{Ar-N_2} \approx \sigma_{Ar-O_2}$ et $\sigma_{O-N_2} \approx \sigma_{O-O_2}$

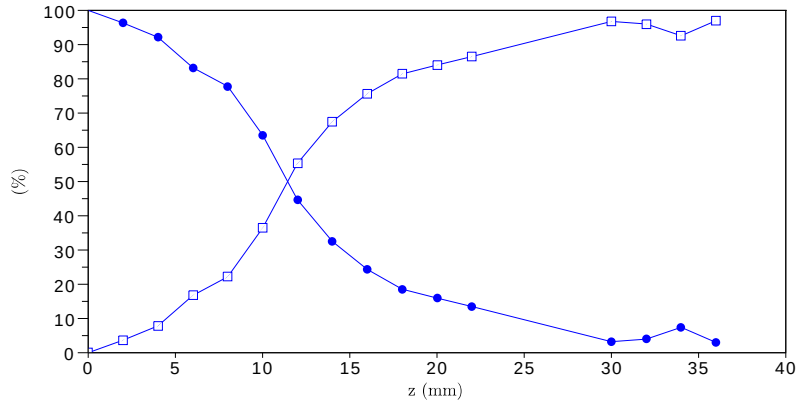


Figure 5.2.4 – Proportion d’argon (●) calculée à partir de la relation 5.2.16 et d’air (□) le long de l’axe d’un jet Surfatron à la pression atmosphérique. $z = 0$ correspond à la sortie du tube. Conditions expérimentales : débit d’argon de 2 l/min et puissance micro-onde de 40 W.

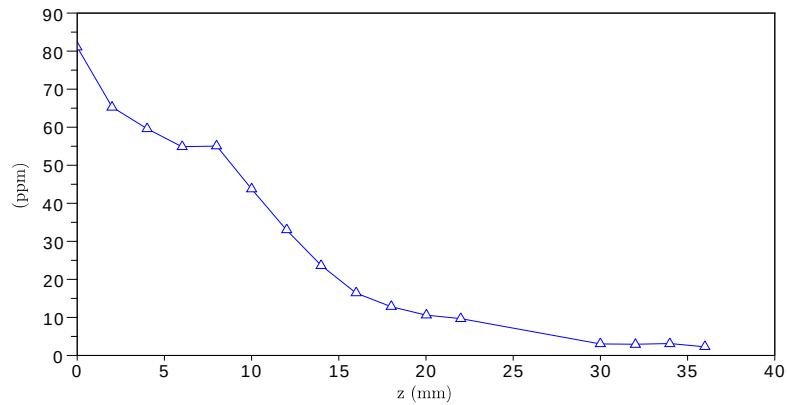


Figure 5.2.5 – Concentration d’oxygène atomique le long de l’axe d’un jet Surfatron à la pression atmosphérique calculée à partir de la relation 5.2.17. $z = 0$ correspond à la sortie du tube. Conditions expérimentales : débit d’argon de 2 l/min et puissance micro-onde de 40 W. On a considéré $\frac{\gamma_{852}}{\gamma_{844}} = 1$.

5.2.6 Détermination de la longueur et de la vitesse de propagation du jet de plasma DBD

Lorsque l'on observe un jet DBD pulsé avec une caméra haute vitesse suffisamment performante, on constate que ce qui s'apparente à une flamme est en réalité une boule lumineuse qui se déplace à très grande vitesse (voir fig. 5.2.6). Pour déterminer la longueur du jet et sa vitesse de propagation, un script Matlab a été développé. Ce dernier détermine, à partir de prises de vue résolues en temps équivalent, la position du point lumineux le plus éloigné de la sortie du tube d'où s'échappe le jet de plasma DBD. La vitesse d'expansion du jet est obtenue en dérivant la position du point en question par rapport au temps. On parle de temps équivalent car on ne suit pas réellement l'expansion du jet de plasma. En réalité, on fait l'hypothèse que le jet se comporte de la même façon à chaque impulsion de tension. Ainsi, on déclenche la caméra sur le front montant de la tension avec un retard connu qui augmente à chaque nouvelle décharge.

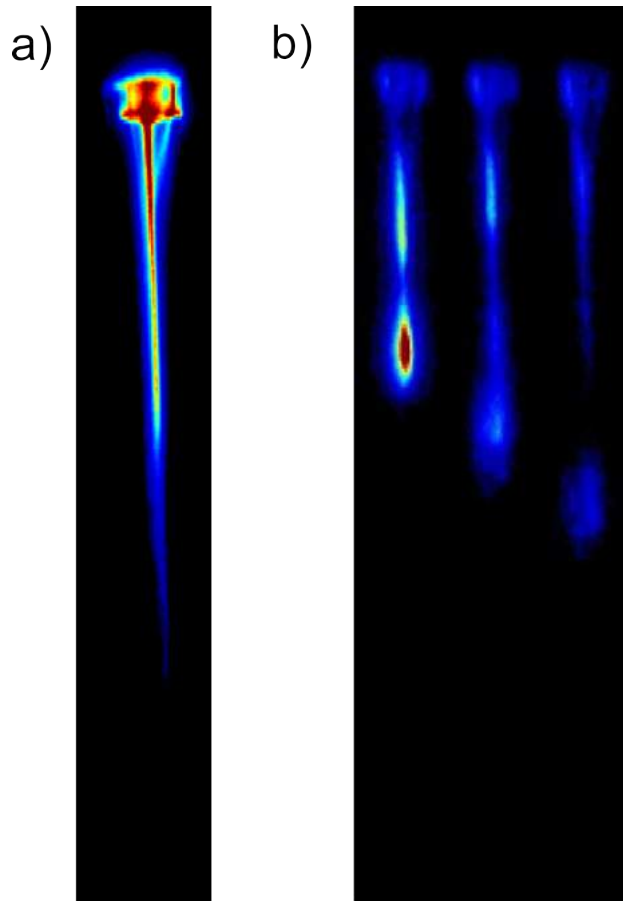


FIGURE 5.2.6 – Imagerie grande vitesse en fausses couleurs d'un jet plasma DBD. Image du jet plasma pour une durée d'exposition de 10 s (a) et série de trois images (durée d'exposition 5 ns) acquises respectivement aux instants $t = 700$ ns, 800 ns et 900 ns après le début du pulse de tension (b). Conditions expérimentales : tension pulsée monopolaire d'amplitude 10 kV, fréquence de répétition 9.69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, gaz porteur Argon et débit de gaz de 2 L/min.

Résultats expérimentaux

« J'ai souvent relu mes premiers comptes rendus et vu l'ignorance, la naïveté puérile, le cerveau peu intelligent qui, dans une pièce obscure, regardait par le trou de la serrure, la lumière éblouissante du dehors. »

(DANIEL KEYES)

Chapitre 6

Traitements du cancer colorectal : investigation in-vitro

Au cours des dernières années, de nombreux travaux de recherches à travers le monde ont démontré un grand nombre d'applications intéressantes des plasmas froids hors équilibre dans les domaines de la stérilisation et la décontamination, l'ingénierie et la fonctionnalisation des tissus et des biomatériaux [188, 189, 190, 191, 192, 193]. Des études récentes ont démontré l'effet du plasma sur les cellules cancéreuses qui est obtenu non seulement par application directe du plasma sur les cellules, mais aussi par le traitement indirect des cellules avec un milieu ou un liquide préparé précédemment par exposition au plasma, appelé milieu activé par plasma (PAM) [132, 194, 195, 196, 197, 198]. L'utilisation d'une méthode indirecte présente de nombreux avantages. Dans un premier temps elle simplifie la compréhension des mécanismes d'action du plasma. En effet, lors d'un traitement direct le champ électrique ainsi que de possible rayonnement (UV par exemple) peuvent avoir une influence non négligeable sur les cellules cancéreuses. D'autre part, il est possible d'injecter le liquide activé directement dans la zone tumorale permettant ainsi le traitement des zones difficiles d'accès. En plus le PAM peut être préparé à l'avance et stocké jusqu'à son utilisation. Cependant, les mécanismes actifs et l'identité des sous-produits chimiques (générés dans le liquide par le plasma) impliqués dans ces effets rapportés ne sont pas bien élucidés.

Dans ce chapitre nous étudierons tout d'abord les effets d'un traitement par milieu activé par plasma sur des sphéroïdes de cellules cancéreuses du colon *in vitro*. Les sphéroïdes de tumeur multicellulaire (MCTS) est un modèle de culture 3D qui reproduit fidèlement l'organisation et l'hétérogénéité d'un domaine micro tumeur avec l'interaction cellules-cellules et les interactions cellules-microenvironnement [199, 42, 200]. L'utilisation de ce modèle est actuellement reconnu comme une étape importante dans le développement de stratégies de lutte contre le cancer se trouvant entre les études réalisées sur des mono couches classiques des cellules cultivées et des modèles animaux [201]. L'optimisation du traitement par le PAM et l'influence de certains paramètres de sa production seront analysés. L'analyse des espèces génotoxiques, l'estimation de leur concentration et leurs mécanismes d'actions seront

étudiés. Nous étudierons également le potentiel d'activité d'un traitement PAM à travers l'utilisation d'un temps de contact court entre le PAM et les MCTS.

6.1 Activation du milieu par jet plasma et traitement cellulaire

Le milieu activé par plasma (PAM) est produit par l'exposition du milieu de culture cellulaire à un jet de plasma froid fonctionnant à l'hélium (cf. chapitre 2 section 2.2.4.1). La figure 6.1.1 décrit de manière schématique le protocole utilisé dans cette étude pour la génération du PAM. Avant l'activation par jet de plasma, le milieu de culture cellulaire (DMEM incluant 10% de sérum de veau foetal et 2 mM.L⁻¹ de glutamine, pénicilline et streptomycine) est conditionné en volume de 100 µL par puits dans des plaques 96 puits standard. L'exposition du milieu de culture est réalisée ensuite par la mise de la plaque sous le jet de plasma hélium à une distance de 2 cm (correspondant à la distance séparent la surface libre du milieu de culture et la sortie du jet de plasma) durant un temps d'exposition (T_{exp}) fixé à 120 s. Ce temps, qui a été choisit en référence aux travaux préliminaires de Plewa [132], correspond à une inhibition totale de la croissance des sphéroïdes pour une exposition directe de milieu avec sphéroïdes au jet de plasma. Toute les activations par plasma sont réalisées dans des conditions expérimentales identiques (tension appliquée 10 kV, fréquence 9.69 kHz, durée d'impulsion de l'alimentation 1µs ainsi que le débit de gaz 2 l/min). Pour éviter toute interaction croisée entre puits lors des traitements une plaque est constamment utilisée pour masquer les puits voisins. Le PAM ainsi obtenu peut être immédiatement utilisé pour le traitement ou stocké pendant un certain délai référencé comme temps de transfert (T_{trans}). Dans ce dernier cas de figure, le PAM est alors stockée dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ à une température de 37°C (sauf exception dans ce cas de l'étude de l'effet de la température de stockage T_{storage}).

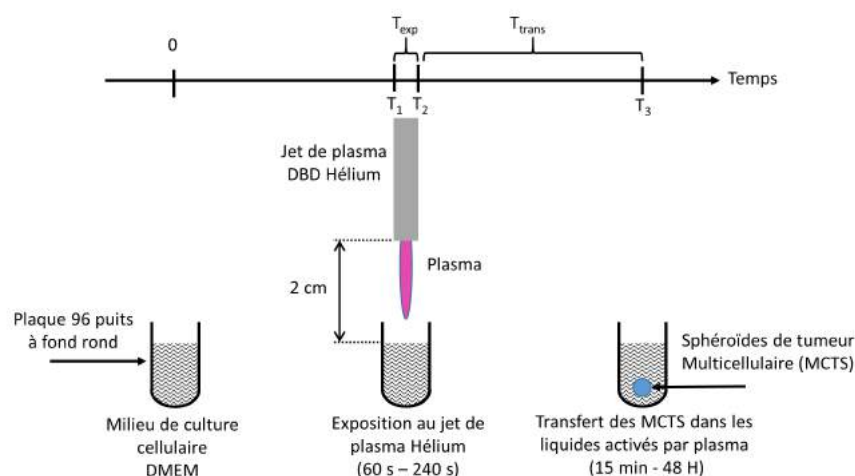


FIGURE 6.1.1 – Étapes principales dans la production du PAM.

6.2 Analyse de l'efficacité du PAM en fonction de la durée d'activation

Le temps d'exposition du milieu de culture au jet de plasma hélium est un des paramètres clés pour l'obtention du PAM permettant la formation d'espèces induisant ainsi l'inhibition de croissance et les dommages à l'ADN des sphéroïdes HCT116. Le PAM a été préparé comme décrit dans la section précédente et utilisé pour le traitement de sphéroïdes HCT116 de 400 μm de diamètre. Nous avons d'abord évalué l'impact du temps d'activation du PAM sur la croissance des sphéroïdes. Dans ce but, nous avons exposé le milieu de culture au jet de plasma hélium pendant des durées d'activation variant entre 0 s à 240 s. La variation du volume des sphéroïdes HCT116 a été suivie pendant 9 jours après traitement (cf. figure 6.2.1). Les sphéroïdes de contrôles prolifèrent normalement durant la période d'analyse (ratio normalisé à 1). L'évolution du volume des sphéroïdes est fortement inhibée d'une manière dépendante au temps d'exposition du milieu de culture au jet de plasma. Ce résultat est particulièrement marqué pour les temps d'activation de 120 s induisant ainsi un rapport de volume des sphéroïdes traités par rapport au sphéroïdes contrôles (T/C) de l'ordre de 65%, ce dernier atteignant 45% pour une durée d'exposition de 240 s.

Comme les stratégies thérapeutiques de lutte contre le cancer sont actuellement basées sur une altération de l'ADN, l'une des premières informations à étudier est donc les effets du traitement plasma sur l'ADN. Afin d'évaluer les dommages à l'ADN induits par le PAM, les sphéroïdes sont transférés pendant 4 h dans ce dernier avant les étapes de fixation. L'immuno-détection de la forme phosphorylée de l'histone H2AX est réalisée pour mettre en évidence des dommages à l'ADN. La figure 6.2.2 montre des cryosections représentatives de sphéroïdes ayant été traités 4 h par les différents PAM ($T_{\text{exp}} = 60$ s, 120 s et 240 s). Les sphéroïdes de contrôles proliférant dans un milieu de culture non traité ne présentent aucun dommage à l'ADN. Comme le montre la figure 6.2.2, l'histone phosphorylée H2AX a été fortement détectée dans les sphéroïdes 4 heures après traitement par PAM. La coloration est très intense dans les couches de cellules les plus externes du sphéroïde traité indiquant des dommages à l'ADN dans les régions périphériques des micro-tumeurs du colon qui augmentent avec le temps d'activation du PAM. En effet, pour une durée d'activation de 60 s seules quelques cellules sont positives indiquant des dommages à l'ADN limités tandis que le marquage est relativement intense pour des sphéroïdes ayant été traités par les PAM activés pendant 240 s.

La rapide décroissance observée dès les premières heures après le traitement est corrélée aux dommages à l'ADN observé 4 h après traitement induisant ainsi un détachement cellulaire de la couche périphérique du sphéroïde[132]. Par conséquent, ces résultats indiquent que l'exposition du milieu au jet de plasma génère des espèces réactives dans le milieu de culture de manière dépendante du temps d'exposition.

Comparé aux travaux de Plewa *et al*[132] dans lesquels le traitement de sphéroïdes

HCT116 était réalisé par exposition directe au jet de plasma DBD hélium, le traitement par PAM est moins efficace. Lors de l'exposition directe durant une période de 120 s, il a été observé une inhibition totale de la croissance des sphéroïdes soit un ratio T/C nul [132]. Dans le cas d'un traitement par PAM de 120 s le ratio d'inhibition de croissance n'est que de 0.66. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette perte d'efficacité lors du traitement par liquides activés par plasma. Le premier consiste en la disparition rapide des radicaux libres dans les liquides activés par plasma qui peuvent avoir une importance lors d'un traitement direct. On peut également supposer que des forces physiques en présence lors du traitement direct participe à l'optimisation des traitements. On peut citer par exemple le champ électrique local important pouvant entraîner une perméabilisation transitoire des membranes cellulaires et par conséquent augmenter l'efficacité du traitements.

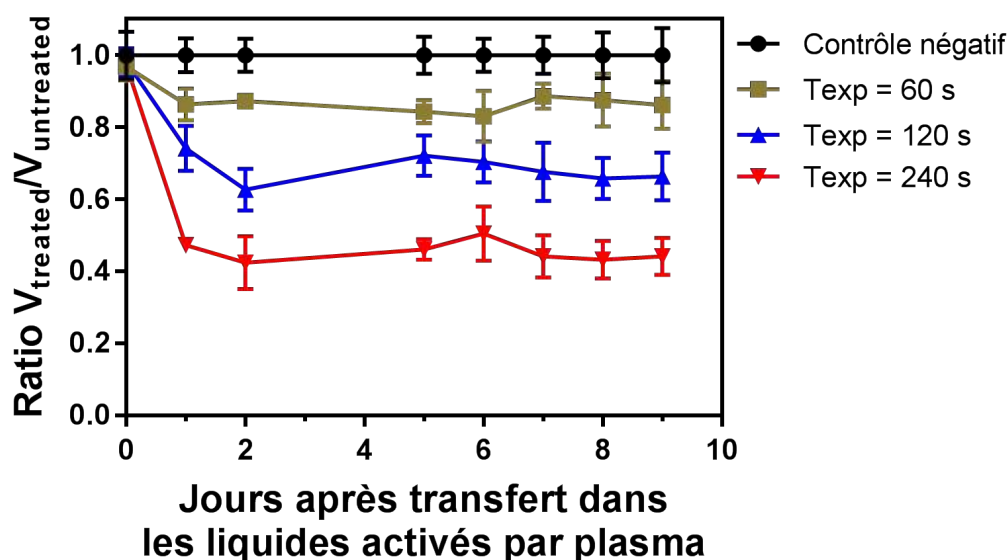


FIGURE 6.2.1 – Croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM exposé 0 s, 60 s, 120 s et 240 s au jet de plasma DBD Hélium ($T_{trans} = 10$ min). Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes.

6.3 Influence du temps de transfert sur les effets génotoxiques et cytotoxique du PAM

Pour réaliser cette étude, la durée d'activation du milieu (T_{exp}) est fixée à 120 s pour générer le milieu activé par plasma. Les micro tumeurs HCT116 sont ensuite transférées dans le PAM après un délai variable (temps de transfert de 1 h, 14 h, 24 h et 48 h). Le stockage du PAM est effectué dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO_2 à une température de 37°C. La figure 6.3.1.a représente le ratio de volume journalier T/C entre

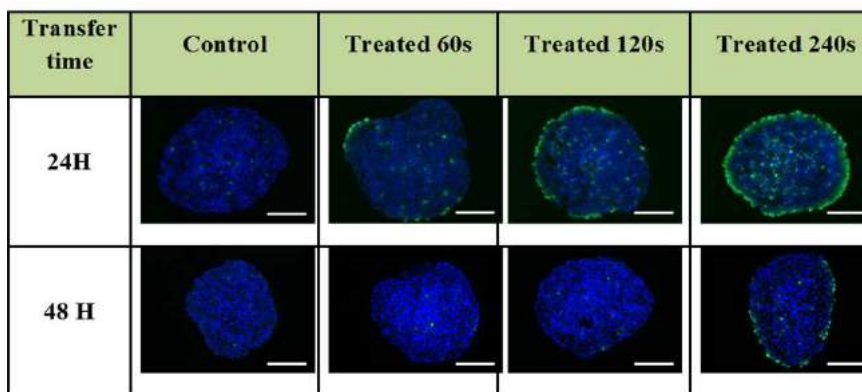


FIGURE 6.2.2 – Effet génotoxique du PAM observé pour différentes durées d'activation ($T_{exp} = 60\text{ s}$, 120 s et 240 s). Les sphéroïdes sont transférés dans le PAM 2 heures après son activation. Immuno-détection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupes cryogéniques de $5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur 4 h après le début du traitement. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : $100\text{ }\mu\text{m}$.

les sphéroïdes traités et non traités sur une période de 9 jours consécutive au traitement. L'inhibition de croissance par le PAM semble dépendre du temps de transfert des sphéroïdes dans le PAM. Les sphéroïdes contrôles prolifèrent normalement durant la période d'analyse (ratio normalisé à 1). Pour les temps de transfert court (1 h et 14 h), deux phases distinctes dans l'inhibition de croissance sont observées. La première intervient après le début du traitement à J1 et consiste en une rapide décroissance du volume des sphéroïdes suivit par une stagnation du ratio T/C les jours suivants à environ 30-40%. Pour les temps de transfert long (24 h et 48 h), la croissance des sphéroïdes traités est plus lente que pour les sphéroïdes contrôles ce qui conduit à une baisse lente du ratio T/C pour atteindre une valeur de 0.8 au bout de 9 jours.

Comme observé figure 6.3.1.b, l'histone phosphorylée H2AX est détectée uniquement dans les sphéroïdes ayant été traités ce qui indique que le traitement PAM induit des dommages à l'ADN. Un intense marquage est détecté dans les régions périphériques des sphéroïdes traités par PAM pour le temps de transfert de 1 h . Cette coloration décroît graduellement avec le temps de transfert pour ne plus être détectable à $T_{trans} = 48\text{ h}$. Pour les temps de transfert courts, le détachement des cellules présentant des dommages à l'ADN induit la rapide décroissance observée dès les premières heures après le traitement.

Ces résultats indiquent que le PAM induit une activité génotoxique et une inhibition de croissance d'une manière dépendante du temps de transfert. Ces effets sont à peine détectables au delà d'un temps de transfert de 48 h lorsque les conditions de stockages sont fixées à 37°C .

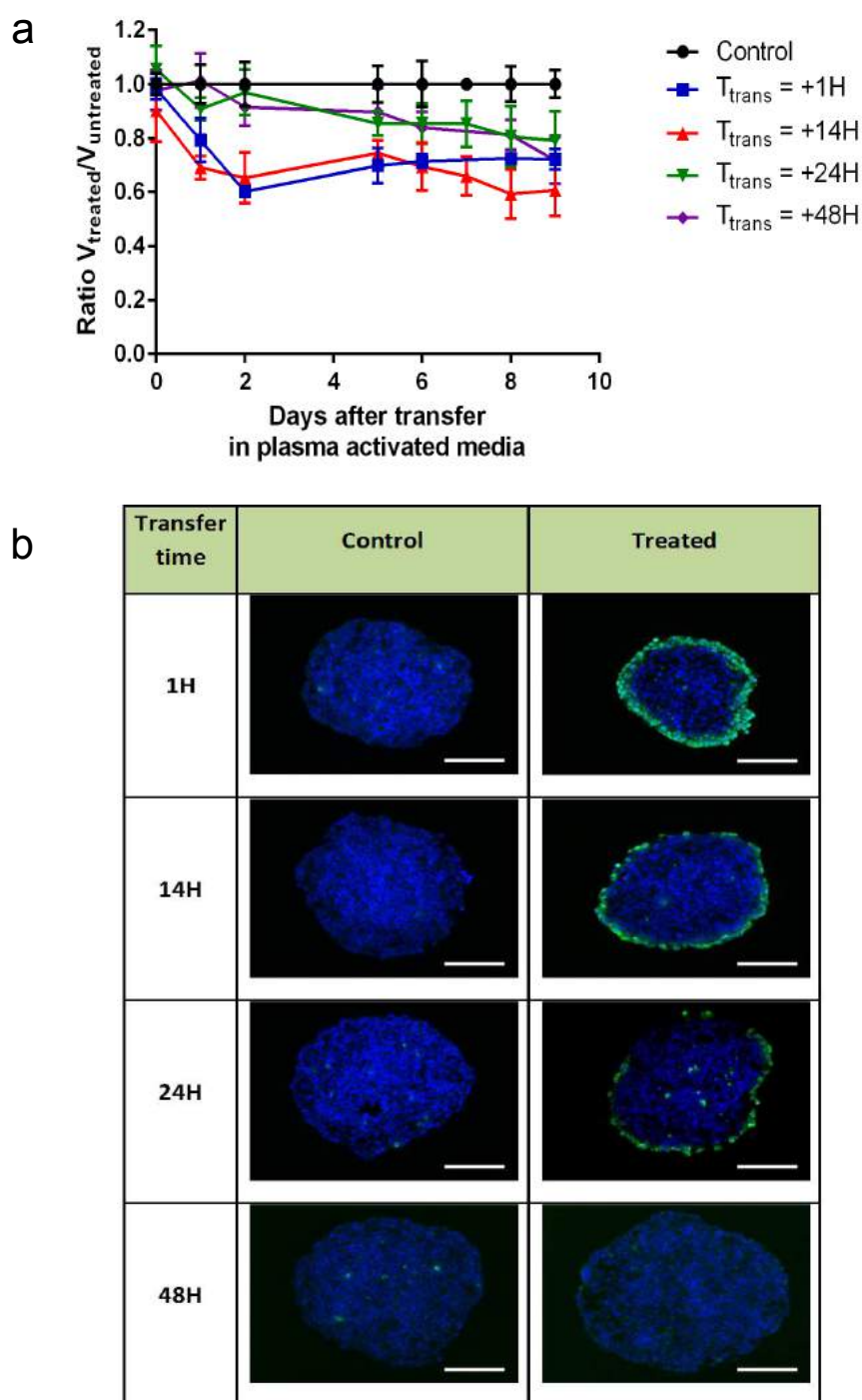


FIGURE 6.3.1 – Inhibition de croissance et effets génotoxiques du PAM. (a) croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM ($T_{\text{exp}} = 120\text{ s}$) pour différents temps de transfert. Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du PAM détecté 4 h après le début du traitement. Immuno-détection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de $5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : $100\text{ }\mu\text{m}$.

6.4 Relation entre taux de dommage à l'ADN observé et temps d'activation/temps de transfert

L'inhibition de croissance peut être corrélée au détachement des cellules ayant subi des dommages à l'ADN [132]. Dans le but de mieux quantifier l'influence du temps d'exposition et du temps de transfert sur des micro-tumeurs du cancer, les dommages à l'ADN sont analysés à partir des cryosections précédemment présentées et par l'utilisation du logiciel Image J. Le pourcentage de cellules présentant des dommages à l'ADN est estimé par le ratio du volume du sphéroïde sans dommage à l'ADN (zone marquée au DAPI en bleu sur les figures 6.3.1 et 6.2.2) par le volume total du sphéroïde (partie bleu et verte sur les figures 6.3.1 et 6.2.2). Quelques soit le temps de transfert on observe une augmentation des dommages à l'ADN avec le temps d'activation du PAM (figure 6.4.1). Pour des temps de transfert inférieur à 2 h, le taux de dommage à l'ADN est relativement constant et correspond à environ 19% pour une activation durant de 60 s, 32% pour une activation de 120 s et finalement atteint 50% pour 240 s. Ce taux de dommage à l'ADN n'est pas directement proportionnel au temps d'activation. Si l'on détermine un facteur de proportionnalité en divisant le taux de dommage à l'ADN par le temps d'exposition on observe une diminution de ce coefficient avec le temps d'activation. Ce ratio a pour valeur 0.32 %/s pour 60 s d'activation, puis 0.27 %/s pour 120 s et 0.21 %/s pour 240 s. Ce facteur indique qu'il est plus difficile d'induire des effets génotoxiques dans les couches profondes de la micro-tumeur. En effet, la structure naturelle rend difficile la pénétration des espèces réactives à l'intérieur du sphéroïde. Ceci est en accord avec des mesures de pénétration de l'oxygène dans les sphéroïdes où les couches internes présentent un déficit d'oxygène [42]. Pour augmenter le taux de dommages à l'ADN il est par conséquent nécessaire de produire une plus grande quantité d'espèces génotoxiques dans le milieu de culture ce qui nécessite par conséquent une activation plus longue. La proportion de cellules présentant des dommages à l'ADN est comme nous l'avons observé dépendante du temps de transfert (figure 6.4.1) avec une décroissance temporelle du même ordre de grandeur pour les trois temps d'activation du PAM. Cela signifie qu'une concentration plus importante d'espèces génotoxiques est obtenue pour des temps d'activation plus longs. En effet, dans le cas d'un temps de transfert de 48 h, les dommages à l'ADN ne sont plus observés pour un temps d'activation du PAM de 60 s alors qu'ils concernent encore 9% du volume du sphéroïde dans le cas d'un temps d'activation de 240 s.

6.5 Influence de la température de stockage du PAM

La préservation de l'effet génotoxique et cytotoxique du PAM dans le temps est un enjeu majeur pour le développement d'une thérapie anti-cancéreuse par PAM. Comme nous l'avons vu précédemment la durée de l'effet ne dépasse que très peu les 48 h après traitement

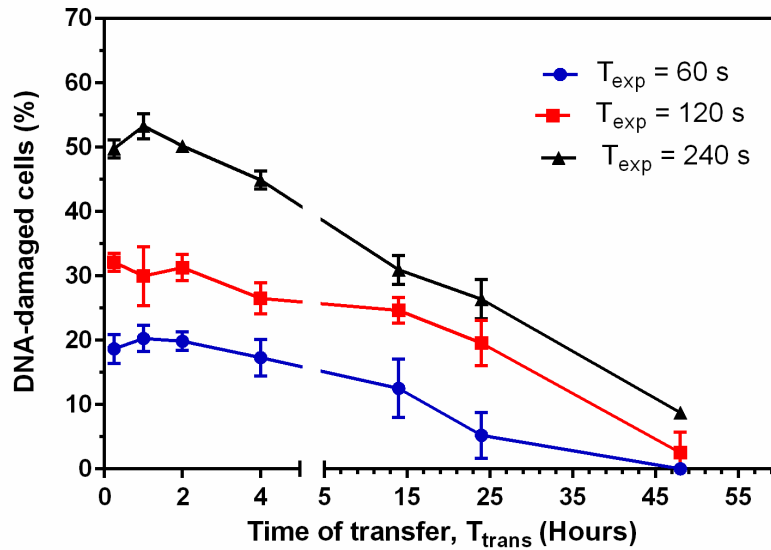


FIGURE 6.4.1 – Influence du temps de transfert (entre 15 min et 48 h) et du temps d'exposition (entre 60 s et 240 s) sur le pourcentage volumique de cellules positives aux dommages à l'ADN dans un sphéroïde traité par milieu activé par plasma. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD de 4 expériences indépendantes.

quelques soit le temps d'exposition du milieu lorsque le stockage des PAM est réalisé à 37°C. C'est pourquoi une étude en fonction de la température de stockage est réalisée. Pour cela, le PAM est préparé en activant le milieu de culture durant 120 s avec le jet de plasma d'hélium puis il est stocké 7 jours à différentes températures : +37°C, +4°C, -20°C, -80°C. Juste avant le transfert des sphéroïdes, les PAM sont réchauffés à 37°C pour éviter un choc thermique qui pourrait avoir un effet sur les sphéroïdes. Suite au transfert des sphéroïdes dans le PAM, une partie des sphéroïdes fixée 4 h après le début du traitement pour réaliser des mesures d'immuno-détection tandis que le reste est laissé dans le PAM pendant neuf jours pour étudier l'inhibition de croissance à long terme.

La figure 6.5.1.b regroupe les informations sur les dommages à l'ADN observés 4 h après traitements. L'analyse quantitative de la fluorescence des coupes de sphéroïdes indique qu'environ 36% du volume du sphéroïde présente des dommages à l'ADN lorsque le PAM est stocké à +4°C et 44% pour un stockage à -80°C. La capacité du PAM à induire des dommages à l'ADN est indépendante du temps de transfert s'il est stocké dans les conditions de température de +4°C et -80°C. A l'inverse, le stockage respectivement à -20°C et +37°C ne laisse plus apparaître de dommages à l'ADN.

Ces résultats suggèrent que la concentration en espèces génotoxiques est stable lors de conditions de stockage à +4°C et -80°C alors qu'elles ne l'est pas à -20°C et +37°C.

En ce qui concerne l'inhibition de croissance, la figure 6.5.1.a confirme les précédentes observations. Dans le cas des PAM stockés à +4°C et -80°C le volume perdu dès les premières heures après le traitement correspond à environ 50% causé par le détachement des cellules

présentant des dommages à l'ADN. Neuf jours après traitement, le volume des sphéroïdes traités à l'aide de PAM stocké à $+37^\circ\text{C}$ et -20°C est 50% plus faible que les sphéroïdes contrôles ceci sans perte de cellulaires. En effet, cette diminution de volume est due simplement à un retard de croissance par rapport aux sphéroïdes non traités.

Ces observations montrent clairement que l'effet de dommage à l'ADN du PAM est conservé après stockage à faible température. L'effet à long terme qui limite la prolifération des cellules placées dans un milieu activé par plasma quant à lui est indépendant de la température de stockage.

6.6 Rôle du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les dommages à l'ADN

L'interaction entre les espèces actives produites par le plasma et le milieu de culture conduit, par des réactions chimiques, à la formation dans le milieu aqueux d'un nombre important d'espèces actives secondaires. Parmi celles-ci on peut trouver des espèces à durée de vie courte ou longue incluant : le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), l'oxygène atomique ($\text{O}_2(^1\Delta\text{g})$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), l'ozone (O_3), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxyde nitrique (NO) et l'anion peroxynitrite (ONOO^-) [202].

Au regard des précédents résultats, il paraît évident que la durée de vie de l'effet génotoxique est trop élevée pour être le produit d'une interaction directe entre les radicaux et les cellules cancéreuses. D'autre part, en raison de sa forte miscibilité dans l'eau, le peroxyde d'hydrogène joue un rôle important dans l'effet génétoxique du PAM. Dans le but de mettre en évidence la présence dans le PAM et les effets du peroxyde d'hydrogène sur les cellules cancéreuses de la catalase a été ajoutée pour neutraliser le peroxyde d'hydrogène. Naturellement présente chez tous les organismes aérobiques, cette enzyme permet la dismutation du peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau et de dioxygène suivant la réaction 6.6.1 [203].



Nous avons d'abord examiné l'effet de la présence de catalase ($30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dans le milieu activé par plasma sur les dommages à l'ADN induit dans un sphéroïde. La catalase est également ajoutée dans le milieu de culture des sphéroïdes non traités afin de s'affranchir d'un effet direct de la catalase sur les sphéroïdes. Comme observé figure 6.6.1.b, les dommages à l'ADN causés par le PAM sont entièrement inhibés par la présence de catalase. Quelque soit les conditions concernant le temps de transfert (1 h à 48 h), aucun marquage de la forme phosphorylée de l'histone H2AX n'est détectée sur les sphéroïdes. Cependant, une légère inhibition de croissance est toujours observée à partir du jour 5 après traitement (voir figure 6.6.1.a) et cela en l'absence de dommages à l'ADN. Ceci indique que les dommages à l'ADN observés sont liés à la formation de H_2O_2 dans le PAM après activation par jet

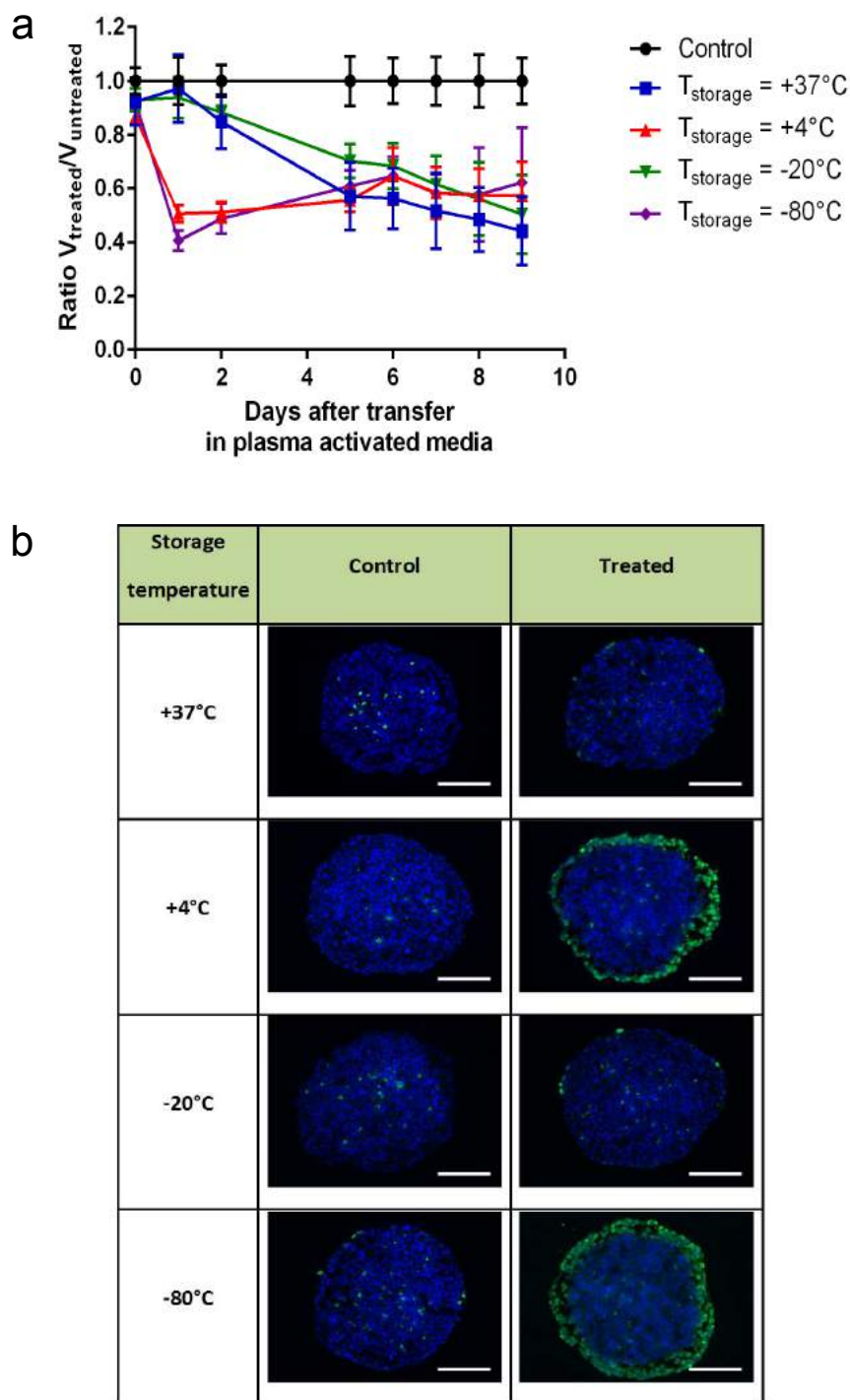


FIGURE 6.5.1 – Inhibition de croissance et effets génotoxiques du PAM stocké à différentes températures. (a) croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM ($T_{\text{exp}} = 120 \text{ s}$) et stockés 7 jours à différentes températures de stockage : $+37^{\circ}\text{C}$, $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C et -80°C . Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours après le début du traitement. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du PAM ($T_{\text{exp}} = 120 \text{ s}$, $T_{\text{trans}} = 7 \text{ jours}$) détecté 4 h après le début du traitement. Immuno-détection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de $5 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : $100 \mu\text{m}$.

de plasma. Cette activité peut être associée à la capacité de H_2O_2 de diffuser à travers la membrane cellulaire pour générer le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) par une réaction de Fenton faisant intervenir le Fer intracellulaire.

Ces manipulations permettent de mettre en avant deux informations essentielles. Il existe au moins deux effet du PAM sur le sphéroïde, le premier concerne les dommages à l'ADN et un détachement cellulaire dont l'acteur majeur est le peroxyde d'hydrogène et le second est un ralentissement de croissance des sphéroïdes à long terme qui est indépendant de la présence du peroxyde d'hydrogène.

6.7 Évaluation de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le PAM après traitement plasma

L'ajout de catalase permet simplement de montrer que la voie induisant les dommages à l'ADN passe par la présence du peroxyde d'hydrogène dans le PAM. Pour déterminer précisément son rôle l'une des techniques consiste dans un premier temps à ajouter du peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture sans activation par jet de plasma. Ceci permettra aussi de déterminer la concentration de peroxyde nécessaire pour obtenir les mêmes effets que le PAM sur les sphéroïdes.

Nous avons évalué l'effet de l'addition de peroxyde d'hydrogène (solution primaire 30 wt.% dans l'eau, Sigma) dans le milieu de culture cellulaire. Les dommages à l'ADN et l'inhibition de croissance sont examinés. Dans le cas d'un milieu de culture contenant du peroxyde d'hydrogène, deux phases d'évolution sont observables dans l'inhibition de croissance donnée figure 6.7.1.a. La première observée entre le jour 0 et 1 après traitement confirme la capacité du peroxyde d'hydrogène à induire un détachement cellulaire et une inhibition de croissance. La seconde phase est détectée à partir du second jours après traitement et se caractérise par une reprise de croissance. En comparant la perte cellulaire observée pour un traitement de 120 s par PAM dans les conditions de la figure 6.3.1 et les résultats de la figure 6.7.1.a., on peut en déduire que la concentration en H_2O_2 dans le PAM 120 s est comprise entre 0.5 mM et 2.5 mM.

La figure 6.7.1.b montre quant à elle la capacité du peroxyde d'hydrogène à induire des dommages à l'ADN en fonction de sa concentration dans le milieu de culture. À partir de l'analyse de la fluorescence de ces coupes, une courbe d'étalonnage a pu être réalisée reliant le taux de cellules présentant des dommages à l'ADN dans un sphéroïde à la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture (voir figure 6.7.2). En tenant compte des observations faites figure 6.4.1 nous avons pu estimer que le PAM induit des dommages à l'ADN correspondant à des concentrations équivalentes de peroxyde d'hydrogène de 0.27 ± 0.09 mM pour une exposition de 60 s, 0.74 ± 0.19 mM pour une exposition de 120 s et pour finir atteint une valeur de 3.16 ± 0.59 mM lors d'une exposition de 240 s au jet de plasma hélium.

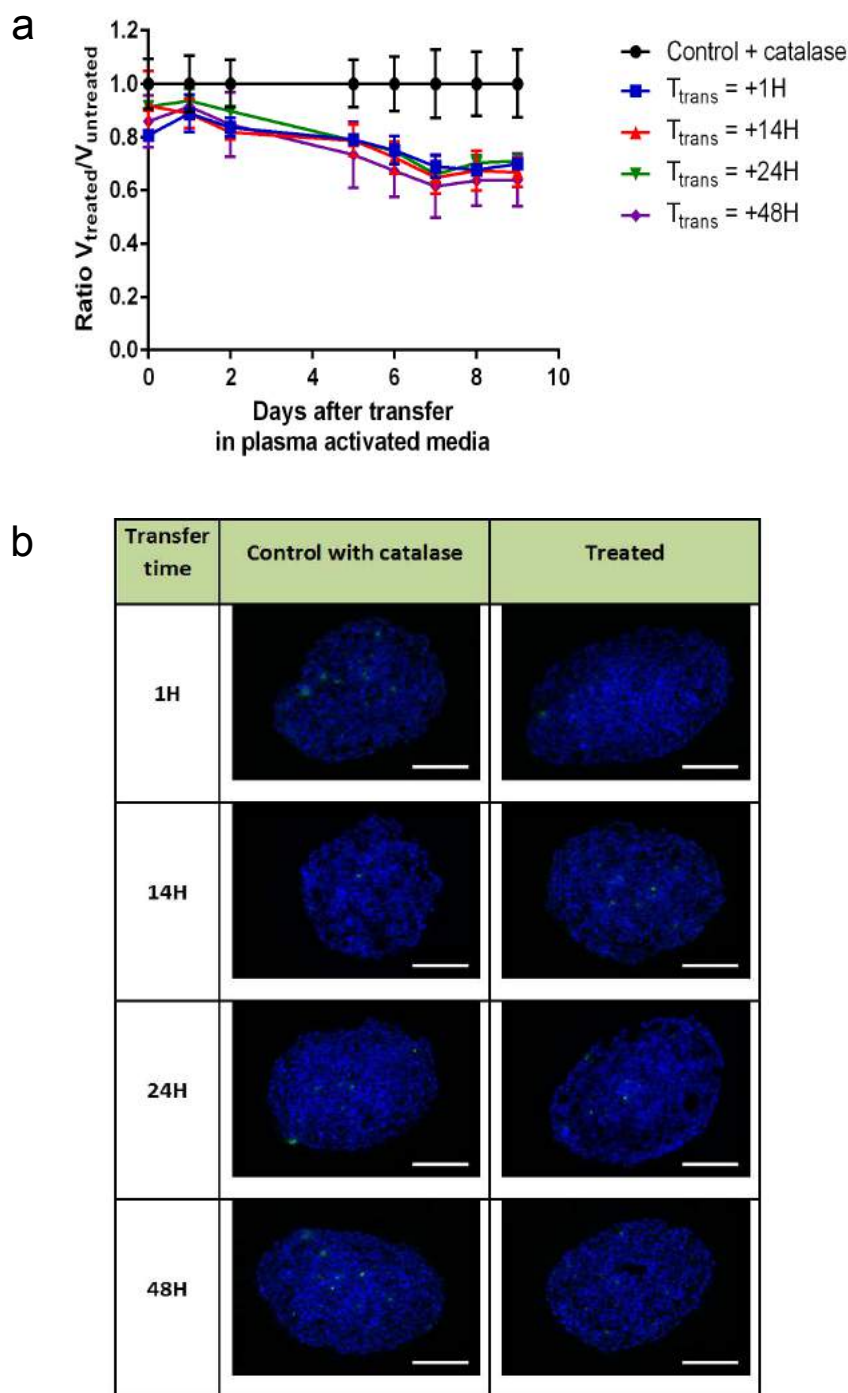


FIGURE 6.6.1 – Inhibition de croissance et effets génotoxiques du PAM en présence de catalase. (a) croissance relative des sphéroïdes après traitement PAM ($T_{\text{exp}} = 120\text{ s}$) d'un milieu activé par plasma contenant de la catalase ($30\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$). Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours après le début du traitement. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du PAM détecte 4 h après le début du traitement. Immuno-détection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de $5\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : $100\text{ }\mu\text{m}$.

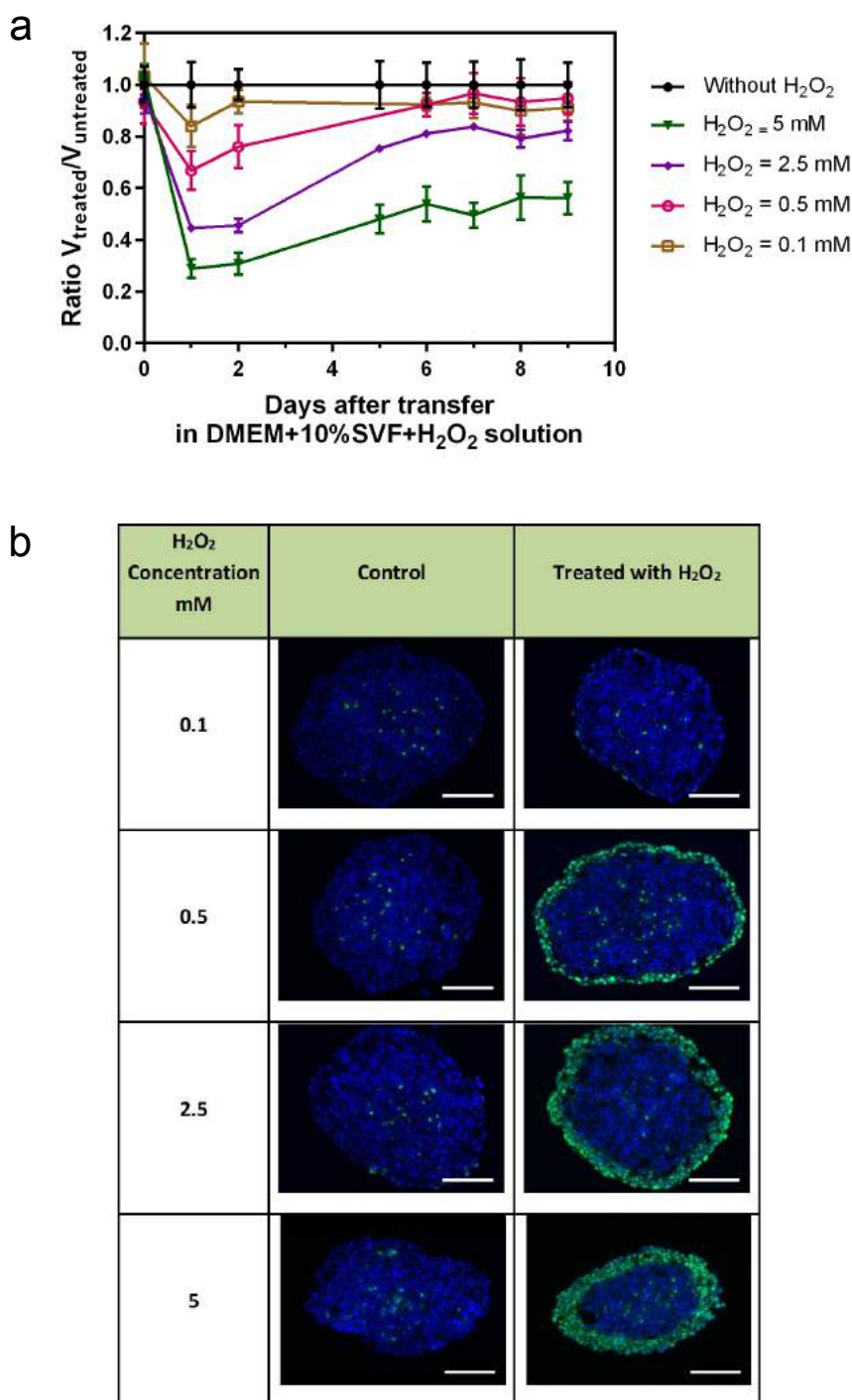


FIGURE 6.7.1 – Inhibition de croissance et effets génotoxiques du peroxyde d'hydrogène ajouté dans le milieu de culture des sphéroïdes (a) croissance relative des sphéroïdes après transfert dans un milieu contenant du peroxyde d'hydrogène. Les sphéroïdes sont traités à J0 et observés pendant 9 jours après le début du traitement. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basées sur 4 expériences indépendantes. (b) Effet génotoxique du peroxyde d'hydrogène détecte 4 h après le transfert. Immuno-détection des dommages à l'ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de 5 μ m d'épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l'utilisation de DAPI. Échelle : 100 μ m.

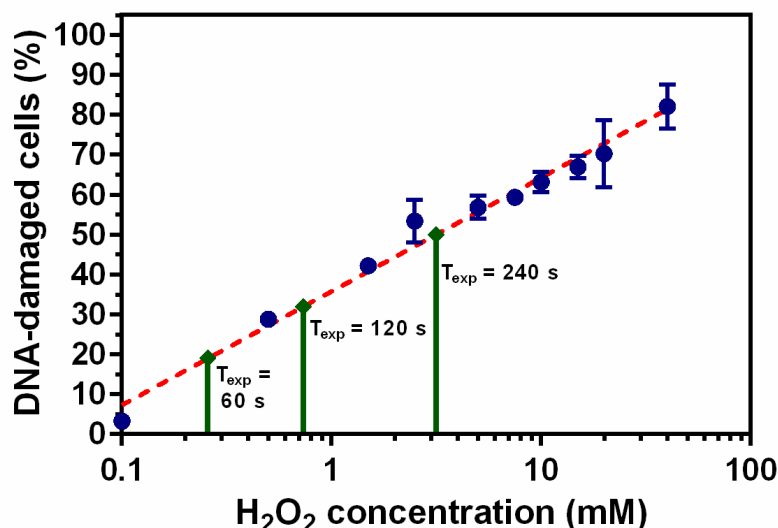


FIGURE 6.7.2 – Influence de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture sur le pourcentage volumique de cellules positives aux dommages à l'ADN dans un sphéroïde. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ SD basée sur 4 expériences indépendantes.

Dans le cadre de ces mesures, nous avons pu mettre en évidence la capacité du peroxyde d'hydrogène à induire des dommages à l'ADN et un détachement cellulaire en l'absence de tout autre produit. La relation entre les dommages à l'ADN et le détachement est également soulignée avec une interdépendance et une bonne corrélation entre le taux de cellules positives aux dommages à l'ADN et le taux de cellules détachées.

Le peroxyde d'hydrogène est par conséquent la seule et unique espèce du PAM qui va induire des dommages à l'ADN dans les cellules. On peut toutefois supposer que une fois dans pénétré dans la cellule le peroxyde peut se décomposer (en radical hydroxyle par exemple via des réaction de Fenton) pour causer des dommages à l'ADN. Mais c'est bien sous la forme de peroxyde d'hydrogène que le PAM garde son activité génotoxique au cours du temps.

Pour finir, ces essais ont permis de mettre en évidence une seconde fois la présence d'un effet à long terme du PAM sur les sphéroïdes. En effet, dans le cas d'un traitement par PAM, l'inhibition de croissance est globalement constante pendant les 9 premiers jours après traitements. Lorsque l'on traite avec du peroxyde d'hydrogène on observe au bout de quelques jours un regain de prolifération. Combiné à l'observation du retard de croissance observé en présence de catalase, on peut clairement supposer qu'il existe une ou plusieurs espèces à longue durée de vie qui empêche le regain de prolifération après détachement des cellules ce qui conduit par conséquent à un retard de croissance constant.

6.8 Analyse de la sélectivité PAM

Nous avons également analysé les effets du PAM sur des cellules saines (notamment du point de vue des dommages à l'ADN). Idéalement, il aurait fallu utiliser des cellules saines du colons mais après des tests de production de sphéroïdes, il s'est avéré qu'avec les cellules saines à notre disposition il était impossible d'obtenir des sphéroïdes reproductibles. Pour cette étude nous avons donc utilisé des cellules humaines de fibroblaste GM637 qui permettent de produire des sphéroïdes reproductibles. Les sphéroïdes fibroblastes sont utilisés lorsqu'ils atteignent un diamètre de 150 μm et traités d'une manière en tout point similaire que pour les sphéroïdes cancéreux avec un temps d'exposition au jet de plasma hélium de 120 s. La seule différence notable, en dehors du type cellulaire, est la taille plus réduite des sphéroïdes GM637 due à une croissance plus lente des cellules saines que pour les cellules cancéreuses. Les temps de transfert utilisés pour les sphéroïdes GM637 dans le PAM ont été variés de 15 min à 4 h. Les dommages à l'ADN, par le marquage de la forme phosphorylée de l'histone H2AX, ont été analysés. La figure 6.8.1 présente l'effet génotoxique du PAM sur les sphéroïdes de cellules fibroblastes GM637. Dans toutes les conditions de tests, la forme phosphorylée de l'histone H2AX est détectée avec une faible fluorescence ce qui indique qu'il n'y a que très peu de dommage à l'ADN généré par le PAM sur les cellules fibroblastes.

Cette sélectivité relativement intéressante du PAM, déjà observée dans la littérature (voir par exemple [133]), peut être imputable à la différence significative dans le système de signalisation entre les cellules cancéreuses et saines. De plus, les cellules cancéreuses sont plus sensibles à de faibles valeurs de peroxyde d'hydrogène que chez les cellules saines, puisqu'il existe un seuil de quantité de peroxyde au-delà duquel aucune cellule ne peut survivre [204]. Par conséquent, les jets de plasma froids induisent des concentrations de peroxyde d'hydrogène importante dans le PAM induisant ainsi une mort sélective des cellules cancéreuse sans affecter les cellules saines.

6.9 Viabilité cellulaire

Après avoir analysé certains effets du plasma sur les cellules cancéreuses (dommages à l'ADN et détachement des cellules périphériques) il est nécessaire de s'intéresser aux cellules détachées. Malgré le bénéfice évident d'une diminution rapide du volume tumoral après traitement avec le PAM, les cellules détachées peuvent être source de nombreux problèmes autrement plus risqués. En effet si ces cellules sont viables ou en capacité de se réparer après le détachement du sphéroïde il est alors possible qu'elles migrent et provoquent des métastases.

L'analyse de la viabilité cellulaire se fait à travers la mesure de l'adénosine Triphosphate (ATP) qui est une molécule complexe et une source d'énergie pour les cellules. Ainsi, une diminution de l'ATP dans les cellules indique la présence de cellules mortes ou en court de

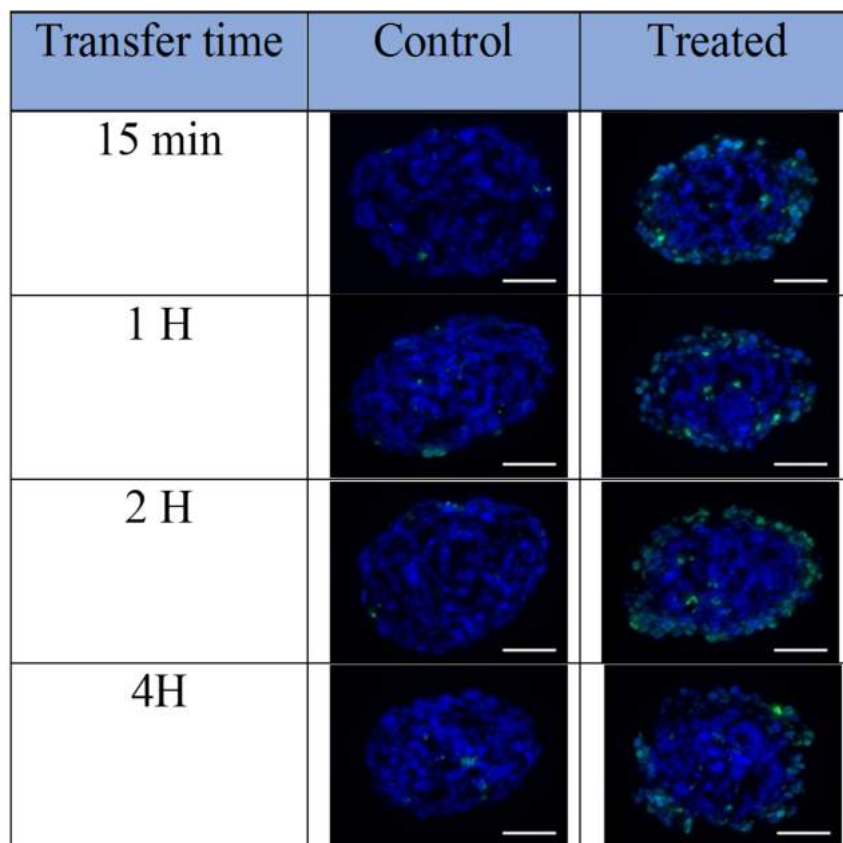


FIGURE 6.8.1 – Absence d’effet génotoxique du PAM sur sphéroïdes de cellules fibroblastes (GM637) 4 h après transfert. Immuno-detection des dommages à l’ADN (phospho-H2AX, vert) sur coupe cryogénique de 5 μm d’épaisseur. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu par l’utilisation de DAPI. Échelle : 50 μm .

mort cellulaire. La cinétique de l'ATP dans les sphéroïdes a été réalisée grâce à l'utilisation de la molécule de Luciférine de luciole (molécule lumineuse) sur plusieurs heures après traitement. La luminescence est alors normalisée par rapport à la valeur obtenue à partir des sphéroïdes contrôles sans traitement, ces résultats sont présentés sur la figure 6.9.1.

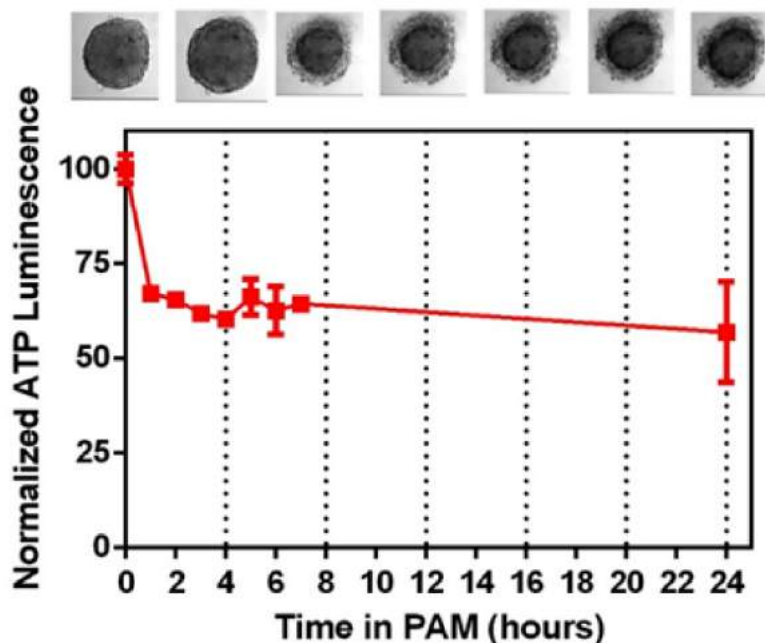


FIGURE 6.9.1 – Effet du PAM sur la viabilité cellulaire détecté après transfert des sphéroïdes dans du PAM ($T_{\text{trans}} = 15 \text{ min}$, $T_{\text{exp}} = 120 \text{ s}$). La viabilité cellulaire est évaluée par luminescence de l'ATP. En haut de la figure sont insérées des photographies en lumière transmises des sphéroïdes après leur transfert dans le PAM.

On observe sur cette figure que la quantité d'ATP présente dans les cellules diminue après seulement une heure de traitement puis reste constante pendant les 24 premières heures de mesures malgré le détachement des cellules en périphérie du sphéroïde intervenant entre 4 h et 6 h après le début du traitement. La quantité d'ATP détectée dans les cellules après le traitement est de $64.19 \pm 2.55 \%$ ce qui correspond au volume du sphéroïde après détachement de $68.43 \pm 3.97 \%$, P-value 0.2 (voir figure 6.3.1) et au pourcentage de cellules dans le sphéroïde sans dommage à l'ADN de $67.90 \pm 1.41 \%$, P-value 0.1 (voir figure 6.4.1).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette déplétion en ATP :

- La génération de ROS et plus particulièrement de radicaux peut conduire à une interaction avec les molécules présentes dans le milieu intracellulaire dont l'ATP. Ainsi la présence de dommage à l'ADN et le manque d'ATP rend la cellule incapables de se réparer ce qui la fait rentrer dans un processus de mort cellulaire ;
- Le traitement par plasma peut induire une perméabilisation membranaire des cellules de façon plus ou moins temporaire. Suite à cette perméabilisation l'ATP peut être externalisée ce qui peut conduire à la mort cellulaire ;

- La perte d'ATP peut également être imputable à une consommation interne de la cellule dans la mise en place de défense suite au traitement par PAM. Certains processus de mort cellulaire nécessitent également la mise en place de processus particulier consommant de l'énergie.

Pour déterminer plus précisément la cause de cette chute d'ATP, deux manipulations ont été mises en place. La première consiste à observer l'interaction entre l'ATP et le PAM tandis que la seconde consiste à observer séparément la quantité d'ATP présente dans le sphéroïde et dans le surnageant pour identifier la présence potentielle de perméabilisation cellulaires.

Pour explorer les possibles interactions entre l'ATP et le PAM, 10 nM d'ATP ont été ajoutés aux milieux de culture puis activés par jet de plasma. La figure 6.9.2 donne la concentration de l'ATP en fonction du temps d'activation du milieu par jet de plasma. Quelque soit le temps d'activation, la concentration d'ATP contenue dans le milieu de culture reste constante à environs 10 nM. Cette expérience indique qu'il n'y a pas d'interaction entre l'ATP et les espèces générées par le plasma dans le liquide activé. La perte d'ATP après traitement dans les cellules n'est donc pas due à une interaction directe entre le PAM et la molécule ATP.

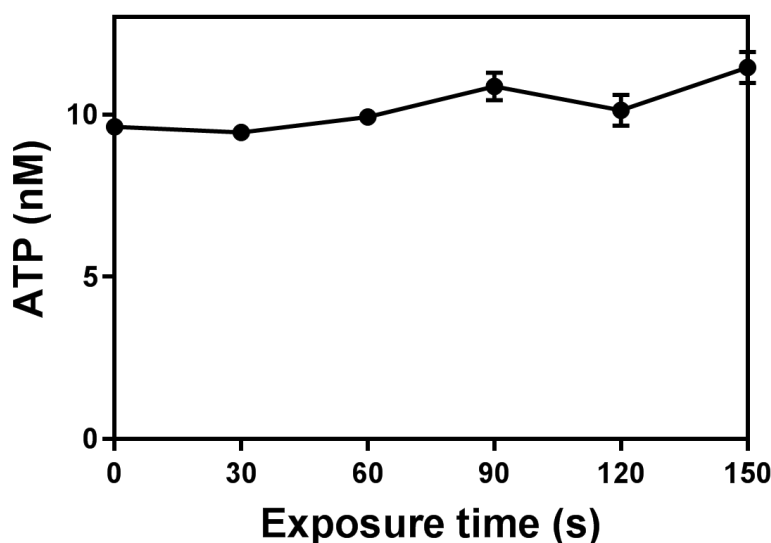


FIGURE 6.9.2 – Interaction entre les molécules générées par le PAM et l'ATP. La concentration initiale d'ATP lors de chaque exposition est de 10 nM.

La seconde hypothèse étant une fuite de l'ATP dans le milieu extracellulaire par perméabilisation transitoire ou permanente. L'expérience présentée consiste en la mesure de l'ATP dans un sphéroïde suite à un traitement PAM. La mesure d'ATP est également effectuée en ayant préalablement extrait du milieu soit le sphéroïde soit le supernageant (milieu activé et cellules détachées). Le protocole de cette manipulation est fourni dans l'annexe B. La figure 6.9.3 montre l'évolution de la concentration de l'ATP durant 4h dans les différents cas de figure.

Les mesures d'ATP en présence du sphéroïde avec ou sans supernageant donnent des valeurs très proches, à l'inverse la mesure de l'ATP dans le supernageant seul est proche de 0%. On peut déduire de cette expérience que la baisse d'ATP dans les cellules n'est pas induite par une perméabilisation membranaire.

Les deux expériences précédentes permettent d'éliminer les deux première hypothèses et de confirmer que la déplétion en ATP observée après traitement par PAM est le résultat d'un processus de protection vis à vis du stress oxydatif induit par le traitement. De plus, en tenant compte de la bonne concordance entre le volume du sphéroïde mesuré après traitement et la mesure d'ATP, on peut en déduire que les cellules en périphérie ne sont plus viables dès la première heure après le transfert dans le PAM. Ces cellules subissent un stress oxydatif important puis elles essayent de mettre en place une stratégie anti-stress qui n'est pas suffisant aux vues des nombreux dommages à l'ADN détectés. Les cellules rentrent donc dans un processus de mort cellulaire rapidement après le début du traitement qui se traduit 6 h après le traitement par un détachement des cellules mortes.

Ces observations permettent donc d'écarter la possibilité d'une dissémination des cellules cancéreuses après le traitement par PAM dans le corps empêchant ainsi le développement de métastases.

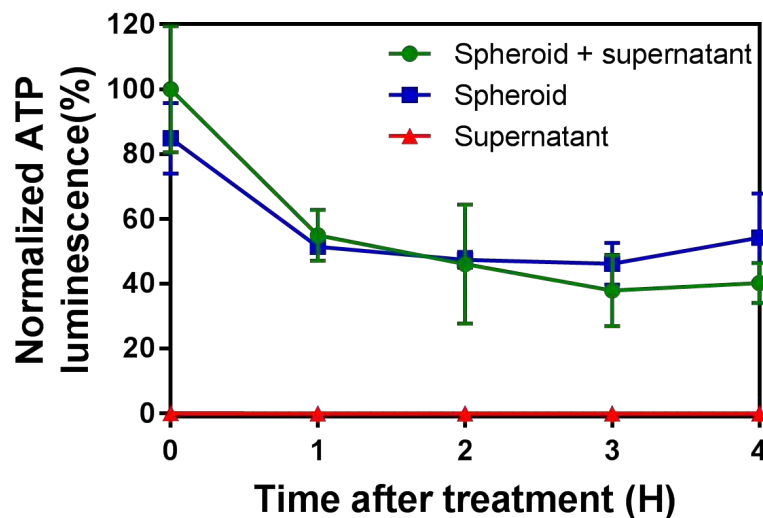


FIGURE 6.9.3 – Concentration en ATP présente dans le sphéroïde avec et sans le supernageant.

6.10 Identification du processus de mort cellulaire induit par le PAM

Une des thématiques précédemment développée est la mort cellulaire des cellules en périphérie du sphéroïde après traitement. Lors d'une mort de type nécrose, le contenu intra-

cellulaire est rejeté ce qui se traduit par une réaction inflammatoire. Ce type de réaction, extrêmement désagréable pour un patient, est donc à proscrire au bénéfice d'une mort par apoptose.

Pour déterminer le type de mort cellulaire induite par le traitement plasma, deux marqueurs ont été utilisés. Le premier étant de l'iodure de propidium (PI) dont le rôle est de mettre en évidence la perméabilisation cellulaire (la présence de pores dans la membrane plasmique des cellules) qui est caractéristique d'un processus de mort cellulaire nécrotique. Le second étant un marqueur spécifique de l'apoptose qui se fixe lors de l'activation des caspases.

On observe sur la figure 6.10.1 les marquages correspondants à la perméabilisation cellulaire et au déclenchement de l'apoptose après transfert de sphéroïdes dans le PAM obtenus après 120 s de traitement. La perméabilisation cellulaire à travers l'utilisation de l'iodure de propidium (fluorescence rouge) ne montre aucune évolution de la perméabilisation membranaire des cellules avant et après une heure de traitement. On détecte après 6 h de traitement une augmentation importante du nombre de cellules perméabilisées. Ces cellules sont réparties à la surface du sphéroïde et ne concerne que quelques cellules ponctuelles. Concernant l'activation de l'apoptose et des caspases le signal est sensiblement identique entre les contrôles et les sphéroïdes ayant été plongés une heure dans le PAM. Six heures après le début du traitement le signal correspondant au déclenchement d'un processus apoptotique est important et répartie de manière uniforme sur la surface contrairement à la perméabilisation. De plus on peut apercevoir sur les images par microscopie optique le début du détachement des cellules périphériques 6 h après le début du traitement.

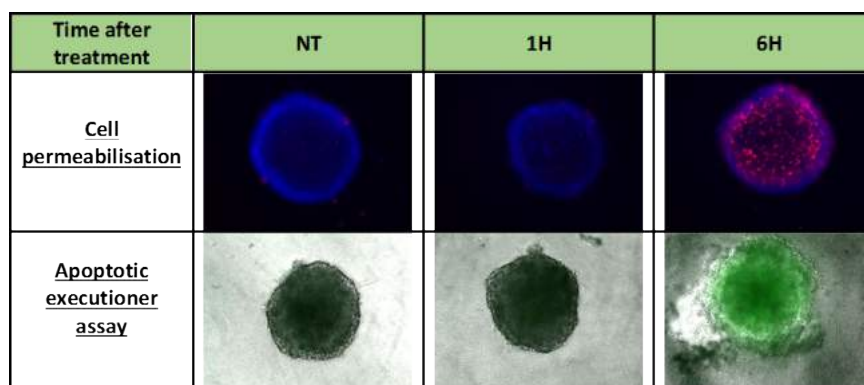


FIGURE 6.10.1 – Effet du PAM sur la perméabilisation cellulaire et l'activation de l'apoptose détectés après transfert des sphéroïdes dans le PAM ($T_{exp} = 120$ s, $T_{trans} = 15$ min). La perméabilisation cellulaire est évaluée par la fluorescence de l'iodure de propidium (rouge) et les noyaux de cellules non perméabilisées sont marqués par du Hoechst (bleu). L'activation de l'apoptose et des caspases est évaluée par une fluorescence verte superposée avec une image de microscopie optique.

Pour mieux appréhender la manière dont les cellules vont être attaquées les paramètres, tels que sont l'ATP la perméabilisation membranaire l'apoptose et le volume du sphéroïde,

ont été tracés au cours du temps après le début du traitement sur la figure 6.10.2. Au regard de ces informations on observe que le premier processus déclenché est la perte de l'ATP dans les cellules ayant subi des dommages à l'ADN. Cette perte étant associée à une consommation interne de l'ATP par les cellules pour se protéger du stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène et les radicaux qu'il peut générer. Une fois le niveau d'ATP stabilisé (environ une heure après le transfert des sphéroïdes dans le PAM) les signaux d'apoptose et de perméabilisation membranaire à travers l'iodure de propidium (PI) commencent à être détectés. La stabilisation de l'ATP traduit la perte totale de cette molécule dans les cellules endommagées. N'ayant plus de moyen de défense elles déclenchent des processus de mort cellulaires. Même si les marqueurs de l'apoptose (caspase) et de la nécrose (PI) suivent une même évolution d'intensité au court du temps, la mort principale semble être l'apoptose de part la répartition uniforme sur la superficie du sphéroïde observée dans figure 6.10.1. Enfin, entre 5 h et 6 h après le début du traitement, les cellules ayant débutées au préalable leur mort cellulaire finissent par se dissocier du sphéroïde. Le détachement, l'une des dernières actions des cellules, est le résultat de dommages à l'ADN importants dès le début du transfert.

La présence de nécrose est également observable de manière indirecte. On observe sur la courbe correspondant au volume du sphéroïde une légère augmentation 4 h après le début du traitement. Ce volume 10% plus important que celui des sphéroïdes non-traités est un artéfact provenant du grossissement de cellules à la périphérie signe d'une mort cellulaire imminente généralement par nécrose.

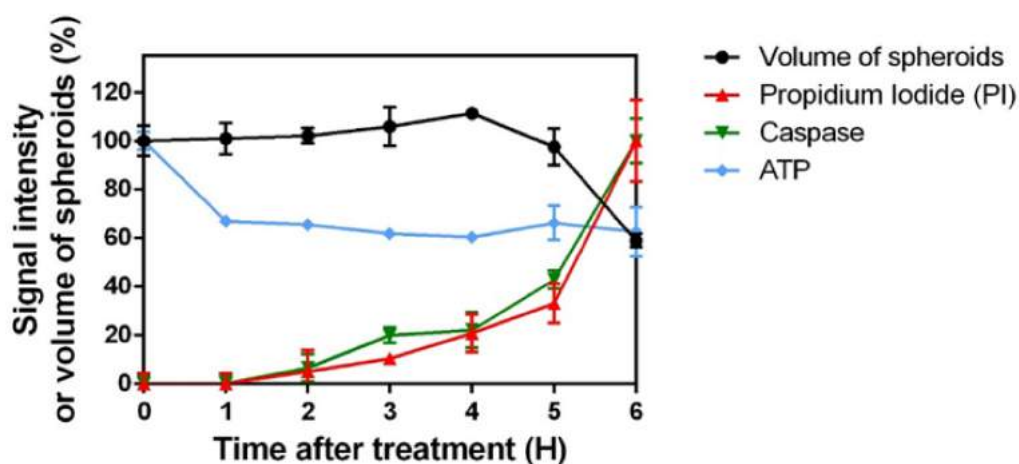


FIGURE 6.10.2 – Évolution durant les 6 premières heures après transfert de sphéroïdes HCT116 dans le PAM des différents signaux normalisés d'ATP, PI, caspases et du volume des sphéroïdes.

6.11 Effet du PAM lors d'un traitement avec un temps contact cours

Dans l'objectif d'un traitement *in vivo* de tumeurs il est important de prendre en compte un paramètre supplémentaire lors qui est le temps de contact entre le PAM et le sphéroïde. Lors des précédentes mesures, le sphéroïde est placé soit 4 h en contact avec le PAM pour l'observation des dommages à l'ADN (le temps de contact a été fixé à 4 h pour effectuer la mesure avant le détachement des cellules) ou en continu dans le cas des suivis de volume sur 9 jours.

Dans le cas *in vivo*, la durée de résidence d'un médicament dans la zone d'injection est limitée dans le temps (très probablement inférieure à la demi-heure). De plus, la diffusion lente rend difficile la modélisation correcte de ce paramètre. Pour pouvoir estimer le potentiel d'un traitement par PAM nous avons choisi de fixer un temps de contact court de 10 min pour se rapprocher des conditions réelles d'un traitement *in vivo*.

À partir des marquages immunofluorescents des dommages à l'ADN dans les deux conditions de temps de contact, nous avons pu observer un profil de fluorescence de γ -H2AX issu des coupes cryogéniques représentées figure 6.11.1. Sur cette figure, on observe tout d'abord une légère différence de diamètre entre les deux conditions imputable, soit à une petite variations de taille des sphéroïdes avant traitement, soit à la position des coupes dans le sphéroïde, du fait que les sphéroïdes ne sont pas toujours parfaitement rond ce qui induit une légère différence des coupes.

On observe tout d'abord une fluorescence aux extrémités du profil concordant avec la répartition sur les couches périphériques du sphéroïde des cellules présentant des dommages à l'ADN. On observe également que l'intensité de fluorescence est bien plus élevée dans le cas d'un temps de contact de 4 h avec une valeur de l'ordre de 250 alors qu'elle n'est que de 50 pour un temps de contact de 10 min. La quantité de dommage à l'ADN, directement déduite par l'intensité de fluorescence, est donc proportionnelle au temps de contact. Il est à noter également que contrairement à l'intensité, la répartition des dommages est similaires avec une trentaine de micromètres d'épaisseur dans les deux cas.

Nous avons émis l'hypothèse dans des sections précédentes que le taux de dommage à l'ADN était proportionnel à la concentration de peroxyde d'hydrogène dans le milieu activé par plasma et que la pénétration était limitée par un gradient de pression à l'intérieur du sphéroïde. Par conséquent, le PAM ayant été exposé 120 s (pour les deux cas de temps de contact) et que le temps de transfert est le même dans les deux cas (10 min), les sphéroïdes se retrouvent en contact avec la même concentration de peroxyde d'hydrogène ce qui conduit à une même pénétration.

L'analyse des dommages à l'ADN indique que le traitement de courte durée induit peu de dommages ce qui peut être problématique lors d'une campagne de traitement *in vivo*. Si l'on observe sur la figure 6.11.2 l'évolution de volume des deux conditions sur les neufs

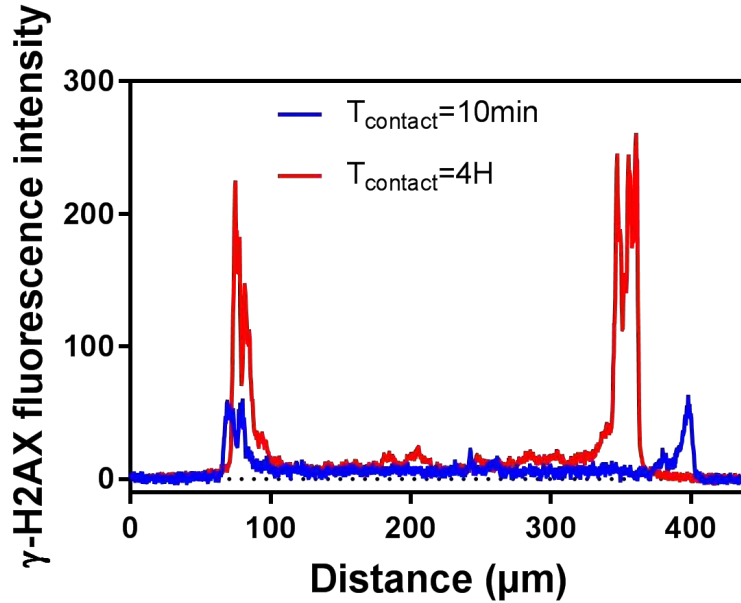


FIGURE 6.11.1 – Profil de fluorescence des dommages à l'ADN dans le cas d'un temps de contact court avec le PAM (10 minutes) représentatif d'un traitement *in vivo* et contact long (4 heures). Conditions expérimentales : $T_{\text{exp}} = 120$ s, $T_{\text{trans}} = 10$ min.

jours suivants le traitement, on observe distinctement deux processus différents en fonction du temps de contact.

Dans le cas d'un temps de contact classique de neuf jours, on observe une première diminution rapide du ratio T/C au premier jours après traitement. Cet effet est imputable au détachement des cellules en périphérie du sphéroïde suite à des dommages à l'ADN importants (vitesse de croissance négative : $-1.61 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{jour}$). Ensuite, du jour 1 à 9 le ratio T/C est constant traduisant une reprise de croissance faible des cellules de $0.95 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{jour}$ comparer aux $2.88 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{jour}$ des contrôles. Cette inhibition de croissance est causée par au moins une espèce présente dans le PAM car si le milieu de culture est remplacé par du milieu non traité au bout de 4 h de contact, le détachement initial est identique mais la reprise de croissance du jour 1 à 9 est bien plus élevée avec une valeur proche de $2.1 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{jour}$ ¹.

En ce qui concerne le temps de contact court de 10 min, deux phases sont également observées. La première est une baisse du ratio T/C entre les jours 0 et 6 jusqu'à atteindre un ratio de 0.4. Cette baisse du ratio représente une diminution drastique de la vitesse de croissance des sphéroïdes ayant été traités par PAM ($0.78 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{jour}$). Après le jour 6 et jusqu'à la fin de nos mesures, ce ratio croît doucement pour atteindre au jour 9 une valeur de 0.5. Cette augmentation du ratio correspond à une vitesse de croissance d'environ $1.86 \times 10^7 \mu\text{m}^3/\text{jour}$.

1. NB : contrairement aux précédentes mesures réalisées à 120 s d'exposition au jet d'hélium, l'inhibition de croissance obtenue lors de ces mesures est plus importante passant de 0.6 à 0.4. Cette modification des résultats est causée par le changement du fournisseur du milieu de culture.

Lors d'un traitement avec temps de contact court, l'hypothèse la plus vraisemblable est que les dommages à l'ADN ne sont plus suffisants pour induire la mort des cellules attaquées. En effet, aucun détachement n'est observé mais la vitesse de prolifération est réduite d'un facteur 3 par rapport au contrôle. Il est donc envisageable que dans ces conditions de traitement les cellules limitent leurs proliférations au profit d'une réparation des dommages à l'ADN. Une fois les réparations effectuées les cellules reprennent une vitesse de croissance plus élevée puisqu'elles sont dans un milieu neuf (non activé par plasma) contenant tout les facteurs de croissance essentiels.

Par conséquent lors de campagne de mesure *in vivo* il est essentiel de réaliser plusieurs traitements à minima 1 fois tout les 6 jours avant la reprise de croissance des cellules cancéreuses. Cette méthode de traitement répétitif a déjà fait l'objet de publication lors du traitement direct de cellules cancéreuses *in vivo* par jet de plasma [156, 158] et également par PAM [134, 157]. Dans ce dernier cas de figure le traitement par PAM a été débuté le lendemain de l'injection sous la peau d'un modèle murin de cellules cancéreuses en suspension dans un gel. Le protocole ne permet pas d'identifier clairement si les effets d'un traitement par PAM sont liés au traitement des cellules avant la formation de tumeur ou après.

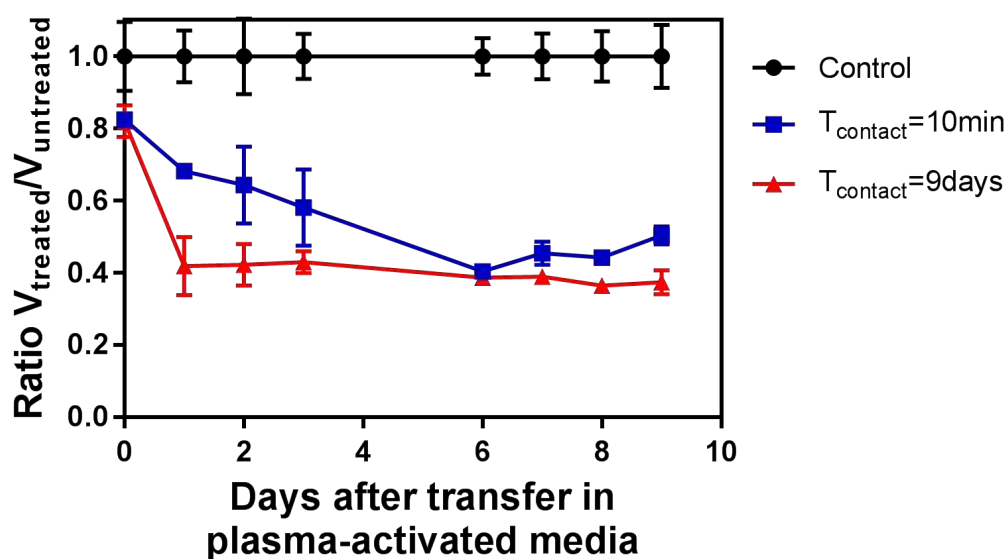


FIGURE 6.11.2 – Influence du temps de contact (10 minutes et 9 jours) sur la croissance des sphéroïdes HCT116 suite à un traitement par PAM.

6.12 Conclusion

Nous avons pu démontrer au court de ce chapitre la capacité d'un traitement basé sur l'activation de milieu de culture par plasma d'hélium sur des modèle 3D des sphéroïdes cancéreux du colon HCT116. Cette méthode de traitement a été étudiée en fonction des paramètres liés à la durée d'activation par jet de plasma et temps de transfert après obtention

du PAM. Ce milieu activé par plasma interagit avec les sphéroïdes à travers deux schémas particuliers. Le premier a été identifié comme une attaque oxydative liée au peroxyde d'hydrogène qui induit des dommages à l'ADN que les cellules périphériques ne peuvent contrôler par des moyens de défense classiques. Ainsi elles finissent par engager des processus de mort cellulaires, principalement l'apoptose, conduisant in fine à un détachement de ces cellules endommagées du reste du sphéroïde et donc à une perte de volume importante. Le deuxième effet est une inhibition de la vitesse de prolifération après le transfert des sphéroïdes dans le PAM. Cette limitation de la vitesse de prolifération est attribuable pour le moment soit à une interaction entre les radicaux libres générés par le plasma et les facteurs de croissance du milieu soit à la présence de nitrites et de nitrates.

Nous avons également optimisé le stockage du PAM après son activation pour obtenir des effets identiques sur les sphéroïdes jusqu'à une semaine après son activation. La durée des effets génotoxiques et cytotoxiques du PAM sur les sphéroïdes est potentiellement plus longue mais nos mesures se sont limitées à une étude d'une semaine.

La prise en compte d'une durée de contact entre le PAM et le sphéroïde nous a permis d'entrevoir les réactions d'une tumeur lors d'une campagne de traitements *in vivo*. Ces premiers résultats ont montré que les dommages à l'ADN était proportionnel au temps de contact. Ainsi pour un temps de contact de 10 min, que nous estimons représentatif d'un traitement *in vivo*, le nombre de dommages n'est pas assez important pour entraîner la mort cellulaire. Cependant lors de la phase de réparation, le sphéroïde possède une vitesse de prolifération très faible participant ainsi à un retard de croissance. Toutefois, le milieu étant renouvelé, la reprise de croissance est importante au bout de quelques jours. C'est pourquoi lors de campagnes de mesures *in vivo* il sera primordial de réaliser des injections de PAM au moins une fois par semaine.

Chapitre 7

Interaction entre le jet de plasma DBD hélium et le milieu de culture

Les liquides activés par jets de plasma à la pression atmosphérique sont capables d'induire l'arrêt de prolifération et la mort de cellules cancéreuses HCT116. Cependant les mécanismes responsables de cette activité antiproliférative restent encore mal connus. De nombreuses études ont clairement mis en évidence que les plasmas froids à la pression atmosphérique peuvent produire de l'oxyde nitrique (NO), des espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que l'anion superoxyde, les radicaux hydroxyles et dans une moindre mesure de l'oxygène singulet [180, 92, 94, 205, 206, 207, 208, 194, 209, 210, 132]. Ces radicaux, générés dans les milieux de culture voir même au sein des cellules peuvent être à l'origine de l'activité anti-tumorale induite par le PAM lors de l'activation par jets de plasma. Pour vérifier ces hypothèses, il est nécessaire de caractériser et de quantifier la production des radicaux dans les milieux de culture et de la corrélér aux effets cytotoxiques et génotoxiques du PAM.

L'objectif de cette partie est de comprendre les réactions à l'interface entre le plasma et différents liquides dans le but de déterminer les produits de cette interactions et leurs effets sur les cellules cancéreuses. Ainsi, le rôle du peroxyde d'hydrogène dans les dommages à l'ADN sur les cellules cancéreuses va pouvoir être clarifié et sa cinétique de formation sera également proposée. Durant cette étude, trois liquides ont été étudiés : de l'eau milliQ, du milieu de culture cellulaire et du milieu de culture avec sérum de veau fœtal (SVF). En effet, les milieux de cultures et le sérum ayant des compositions complexes, il a été nécessaire de réaliser les mesures de détection dans un milieu simple comme l'eau milliQ afin de pouvoir discriminer les espèces directement générées par le jet de plasma DBD hélium de celles issues de l'interaction avec les composants du milieu de culture cellulaire. L'effet à long terme des liquides activés par plasma sur les sphéroïdes sera également étudié à travers l'analyse de produits radicalaires, leur quantification le cas échéant et leurs interactions avec les molécules présentes dans les milieux de cultures cellulaires.

7.1 Radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) et anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

7.1.1 Radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$)

Après exposition d'une solution contenant de l'eau et du DMPO (252.5 mM) pendant 120 s à un jet de plasma DBD hélium, nous avons obtenu par mesure RPE le spectre donné figure 7.1.1. Ce spectre est composé de deux entités distinctes : un signal intense (#) (au dessus de 25 000 d'intensité) composé de quatre pics, et un second signal (*) plus faible composé de trois pics.

La légère différence d'intensité entre les pics du même signal provient de l'anisotropie du mélange. Cela signifie que le radical piégé n'est pas dirigé que dans une seule et même direction de l'espace mais qu'il est plutôt réparti de manière aléatoire.

Dans notre cas, la composante principale du signal (#) obtenue avec un piègeur DMPO dans de l'eau milliQ, a une structure 1 :2 :2 :1, et des constantes de couplages hyperfines $a_N = a_H = 15\text{G}$ et un facteur $g=2.0056$. Ce signal correspond au radical DMPO-OH traduisant par conséquent le fait que le jet de plasma génère le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) dans l'eau. Ceci est cohérent avec les résultats de la littérature [180, 92, 94, 205, 206, 207, 208].

La composante secondaire du signal (*) est un triplet de plus faible intensité qui a pour constantes de couplages hyperfines $a_N = a_H = 15\text{G}$, $g=2.0056$. Ce signal peut être attribué à l'adduit de DMPO – CH_3 [205]. L'adduit DMPO – CH_3 ne peut provenir que de la solution contenant le piègeur. Cette hypothèse semble être confirmée par l'absence de dépendance entre l'intensité du signal et le temps d'exposition des liquides au jet de plasma. Cette observation a également été faite lors des travaux de Tresp *et al* où différentes solutions de DMPO provenant de différents fournisseurs sont étudiées par RPE avec et sans exposition au plasma. Dans certains cas, un signal identique au notre est observé même en l'absence de traitement plasma [205].

La présence de radical hydroxyle dans les liquides après traitement par jet de plasma peut être attribuée à l'interaction entre les espèces excitées formées par le plasma et les molécules de la surface du liquide. L'observation du radical hydroxyle dans un milieu de culture est issue de deux phénomènes différents. La première voie de production peut être induite par l'interaction d'un atome d'oxygène avec une molécule H_2O induisant la création de deux radicaux hydroxyle aqueux [211, 212, 213]. La deuxième voie de production est la solvation du OH gazeux présent dans le plasma qui devient alors un radical hydroxyle aqueux. La présence d'atomes d'oxygène et de radicaux hydroxyle en phase gazeuse a été observée à partir de leur rayonnement spécifique par spectroscopie d'émission [132]. Cela indique que les deux voies de formation du radical hydroxyle sont probablement actives lors de l'exposition de liquides aux plasmas.

Nous avons évalué la cinétique de décroissance du signal RPE de l'adduit DMPO-OH dans les trois liquides étudiés (eau milliQ, DMEM avec ou sans SVF) exposés 150 s au jet de plasma DBD d'hélium. Cette cinétique est effectuée jusqu'à 2000 s après l'activation des

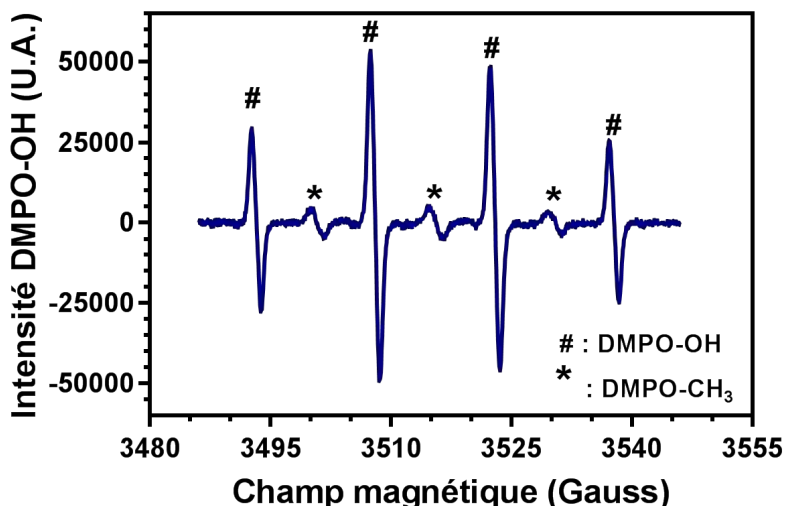


Figure 7.1.1 – Spectre RPE obtenu après exposition d’une solution eau + DMPO pendant 120 s au jet de plasma hélium

liquides. La figure 7.1.2. donne la décroissance du signal DMPO-OH en fonction du temps dans les trois liquides. L’intensité de l’adduit DMPO-OH à l’instant $t = 0\text{s}$ est obtenue par ajustement de la courbe par un polynôme de degré 3 des données expérimentales. Pour un liquide donné, le signal RPE du DMPO-OH décroît en fonction du temps après exposition. Du fait de cette décroissance du signal il est difficile de comparer les signaux dont l’acquisition a été réalisées à deux temps différents après la fin de l’exposition au plasma. De plus, le type de solvant utilisé peut influencer la durée de demi-vie de l’adduit. Dans le présent travail, la quantité de radicaux hydroxyle piégés dans les liquides par le piègeur DMPO est estimée à partir de l’intensité du signal RPE de l’adduit DMPO-OH à l’instant $t=0\text{s}$ obtenue par extrapolation des courbes de décroissances. Pour s’assurer de la bonne validité du protocole, la mesure d’un échantillon est réalisée 4 fois à 4 temps différents afin d’obtenir une incertitude de mesure.

Cette méthode nous a permis également de vérifier certaines hypothèses concernant la durée de demi vie de l’adduit DMPO-OH en fonction du solvant utilisé. On remarque dans le tableau 7.1 que la durée de demi vie peut être modifiée en fonction du type de solvant. Dans l’eau par exemple, nos expériences ont montré une durée de demi vie de 820s (très proche des 870s théorique [206]) alors qu’elle est de 1043s et 442s respectivement dans le DMEM et le DMEM+10%SVF. Le DMEM étant une solution tamponnée à pH 7,4 cela peut modifier l’état de protonation de l’adduit DMPO-OH et ainsi augmenter sa stabilité. Par contre, pour le DMEM +10%SVF, la présence de protéines et de lipides dans le sérum de veau peuvent participer à sa décomposition en réagissant avec l’adduit.

La quantité de radicaux $\bullet\text{OH}$ piégés dans les liquides par le piègeur DMPO est directement liée à l’intensité du signal RPE de DMPO-OH. L’intensité DMPO-OH a été estimée directement à partir de la mi-hauteur du second pic du spectre RPE. Comme le montre

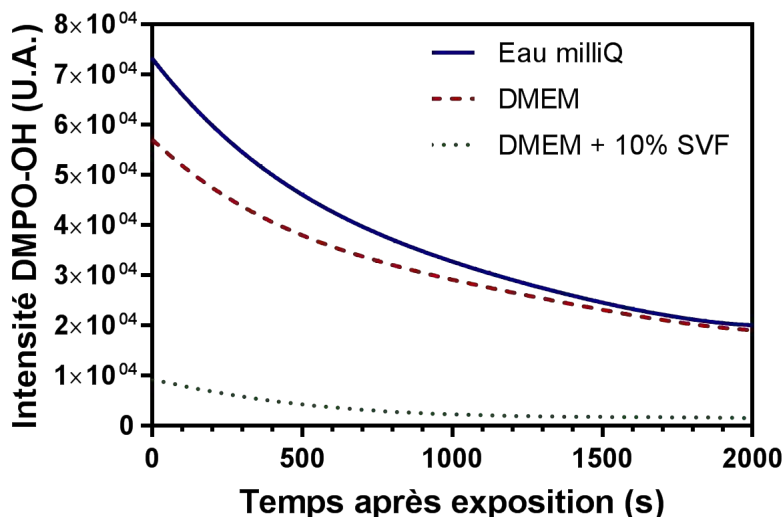


Figure 7.1.2 – Décroissance en fonction du temps de l'intensité du signal DMPO-OH en fonction de la nature du liquide activé par jet de plasma DBD Hélium pendant une durée d'exposition de 150 s.

Type de solvant	Demi vie de l'adduit DMPO-OH (s)
Eau milliQ	820
DMEM	1043
DMEM+10%SVF	442

Table 7.1 – Durée de demi vie de l'adduit DMPO-OH en fonction du type de solvant

la figure 7.1.3, la quantité d'adduit DMPO-OH générée dans les liquides augmente de façon linéaire avec le temps d'exposition au jet de plasma (avec un coefficient de régression linéaire $R_{\text{EAU}}^2 = 0,99$, $R_{\text{DMEM}}^2 = 0,98$, $R_{\text{DMEM+SVF}}^2 = 0,92$) indiquant une augmentation de la production de radicaux hydroxyle. Kanazawa *et al* ont déjà montré la relation linéaire entre la quantité de radicaux $\bullet\text{OH}$ dans l'eau et le temps d'exposition à un jet de plasma fonctionnant à l'hélium en utilisant une technique de dosimétrie chimique basée sur la réaction de l'acide téréphthalique (TA) avec des radicaux $\bullet\text{OH}$ [214].

L'intensité du signal RPE de l'adduit DMPO-OH dans l'eau milliQ est plus élevée d'environ $0,36 \pm 0,03$ par rapport à l'intensité dans le DMEM et $8,25 \pm 1,06$ dans le DMEM + SVF. Ces observations suggèrent que la quantité de radical $\bullet\text{OH}$ détectée par RPE diminue avec la complexité de la composition du milieu. En effet, lorsque des radicaux $\bullet\text{OH}$ sont générés dans de l'eau milliQ ils ne sont entourés que de molécules d'eau, de piègeur et de quelques autres radicaux libres. Par conséquent le nombre de réactions chimiques possibles est limité. Lorsque l'on expose des milieux de culture cellulaire au jet de plasma (DMEM ± SVF dans notre cas), les radicaux hydroxyle générés peuvent oxyder les composants du milieu de culture comme les acides aminées, les vitamines et les protéines. Ainsi, on assiste à une compétition entre l'oxydation des biomacromolécules contenues dans les milieux de culture cellulaire et l'action du piègeur DMPO ce qui induit une diminution du signal

observé par spectroscopie RPE.

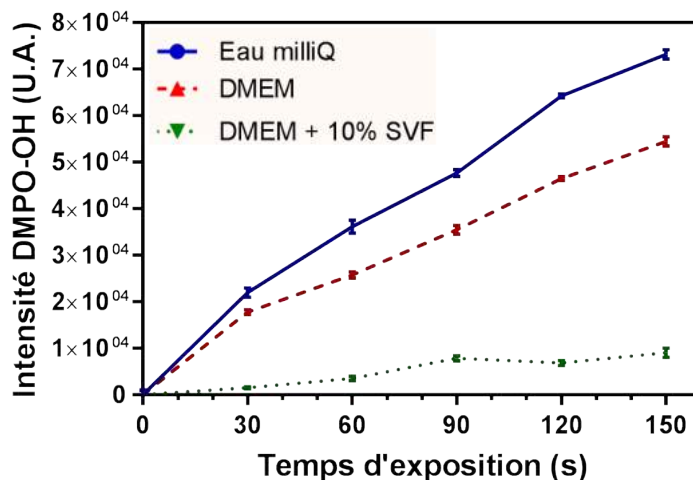


Figure 7.1.3 – Évolution de la production de $\text{OH}^\bullet$ dans différents milieux de culture en fonction du temps d'exposition. La seconde transition du quartet DMPO-OH est utilisée pour déterminer l'intensité du signal.

Ces réactions entre les acides aminés et les radicaux $\bullet\text{OH}$ ont été prédites par simulation de dynamique moléculaire des réactifs [212] et observées par spectrométrie de masse haute résolution [210]. Ces données indiquent que dans les milieux de culture cellulaires il y a formation et accumulation de composés biologiques oxydés conduisant à une diminution des éléments nutritifs essentiels à la croissance cellulaire. Cela peut expliquer en partie l'effet cytotoxique des liquides activés par plasma observé dans le chapitre précédent sur sphéroïdes HCT116. De plus, cela suggère que la cytotoxicité des radicaux $\bullet\text{OH}$ produits par jet de plasma peut être due principalement à la production d'espèces chimiques cytotoxiques plutôt qu'à un effet direct sur les cellules.

7.1.2 Présence de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

La plupart des piègeurs de radicaux libres utilisés lors des campagnes de mesures RPE ne réagissent pas qu'avec un seul radical en particulier mais sont plutôt multi-réactionnels avec différentes affinités et également différents temps de piégeage d'où la complexité d'analyser certains spectres. Dans notre cas, le signal RPE obtenu après activation d'un liquide + DMPO est clairement défini comme le spectre de l'adduit DMPO-OH (cf. figure 7.1.1). Mais le mécanisme est plus complexes qu'il n'y paraît. En effet, même si le DMPO a une préférence notable pour le piégeage du radical $\bullet\text{OH}$ (cinétique de réaction $k_{\text{OH}} > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [206, 205]) il peut également piéger l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pour former l'adduit DMPO-OOH avec une vitesse de réaction beaucoup plus faible (cinétique de réaction $k_{\text{O}_2^-} < 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [206, 205]). La difficulté réside dans le fait que cet adduit DMPO-OOH tend rapidement à se décomposer en DMPO-OH ce qui le rend d'une part difficile à détecter par RPE et qui

d'autre part peut corrompre la quantification du radical hydroxyle.

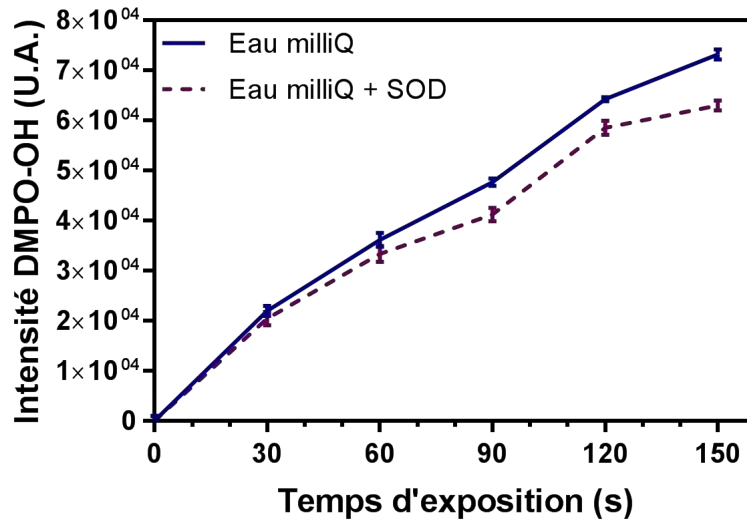


FIGURE 7.1.4 – Intensité RPE de l'adduit DMPO-OH avec et sans ajout de superoxyde dismutase dans l'eau milliQ

Pour mettre en évidence la présence de l'anion superoxyde dans les liquides activés par plasma et estimer sa concentration, nous avons ajouté de la superoxyde dismutase (SOD). La SOD est une métalloprotéine présente dans la quasi totalité des organismes aérobiques et permet la dismutation de l'anion superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. En ajoutant de la SOD dans le liquide en quantité suffisante (150 Unités de SOD par puits [206]) nous venons bloquer la voie de création de l'adduit DMPO-OOH du fait de la très grande affinité entre la SOD et l'anion superoxyde. La figure 7.1.4 donne l'évolution de l'intensité du DMPO-OH en fonction du temps d'exposition au jet de plasma dans l'eau. On constate qu'en présence de la SOD, le signal est moins intense d'environ $10.2 \pm 3.34\%$. Cela indique qu'une partie du signal RPE de DMPO-OH provient de la décomposition du DMPO-OOH en DMPO-OH. L'anion superoxyde est donc produit dans les liquides suite à l'exposition au jet de plasma DBD hélium en quantité moindre par rapport au radical hydroxyle. Il est intéressant de noter que la quantité d'anion superoxyde générée augmente linéairement avec le temps d'exposition comme observé par Arjunan *et al* en utilisant du Tempo-9AC (sonde fluorescente) et un plasma DBD généré dans l'air ambiant [209]. Il est important de noter que cette tendance est identiques pour les deux autres liquides étudiés.

7.2 Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

De précédentes études ont mis en évidence la formation de H_2O_2 suite à l'interaction entre les jets de plasma et les liquides [205, 209, 194]

Le peroxyde d'hydrogène est l'une des principales espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les plasmas froids. Dans le précédent chapitre, il a été mis en évidence que

le H_2O_2 peut être considéré comme un agent génotoxique important produit au cours de l'exposition du milieu de culture DMEM au jet de plasma DBD hélium. Dans ce paragraphe, la formation du peroxyde d'hydrogène par le jet de plasma DBD hélium a été caractérisée et quantifiée en utilisant une méthode fluorimétrique (Hydrogène Peroxidase Assay Kit) dont la procédure est décrite dans la partie matériel et méthode correspondant à la détection des espèces dans les liquides activés par plasma (cf. chapitre 2).

La figure 7.2.1 présente l'évolution de la concentration du peroxyde d'hydrogène en fonction du temps d'exposition au jet de plasma hélium dans l'eau milliQ, le DMEM et le DMEM + 10% SVF. La concentration en peroxyde d'hydrogène dans l'eau milliQ et les milieux de culture augmente de manière linéaire avec le temps d'exposition au jet de plasma (avec un coefficient de régression linéaire $R^2_{EAU} = 0,93$, $R^2_{DMEM} = 0,97$, $R^2_{DMEM+SVF} = 0,99$). Contrairement aux radicaux OH et l'anion superoxyde, la concentration en peroxyde d'hydrogène n'est pas dépendante de la composition du liquide activé par le jet de plasma. Cette observation suggère que contrairement aux autres radicaux, le peroxyde d'hydrogène ne réagit pas avec les acides aminés et autres protéines contenus dans les milieux de culture. De plus, aucun piègeur naturel du peroxyde d'hydrogène n'est présent dans les milieux de culture comme la catalase et la vitamine C.

Lors des essais *in vitro* (cf. chapitre 6) nous avons estimé la concentration de peroxyde d'hydrogène nécessaire pour obtenir des effets biologiques similaires à des traitements par liquides activés par plasma pour des temps d'exposition de 60 s et 120 s respectivement à 0.27 ± 0.09 mM et 0.74 ± 0.19 mM. La méthode fluorimétrique a permis de déterminer que l'exposition d'un liquide au jet de plasma DBD hélium conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène dans des concentrations de 0.41 ± 0.10 mM et 1.09 ± 0.09 mM pour des temps d'exposition respectifs de 60s et 120s. Une seconde méthode biologique basée sur l'estimation du détachement cellulaire en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène a montré des résultats similaires. Le tableau 7.2 résume les différentes concentrations en peroxyde d'hydrogène estimées en fonction du temps d'exposition. Étant donné les incertitudes de mesures, les résultats obtenus avec la méthode fluorimétrique et les méthodes biologique sont comparables.

Par ailleurs, les concentrations de H_2O_2 obtenues sont similaires à celles obtenues par Tresp *et al* en utilisant un jet d'argon pour le traitement de solutions salines, salines tamponnées ainsi que dans des milieux de culture [205]. La croissance linéaire de la concentration en peroxyde d'hydrogène en fonction du temps d'exposition a également été identifiée par Adachi *et al* à partir de l'utilisation d'un jet de plasma d'argon et de milieu de culture cellulaire DMEM [194].

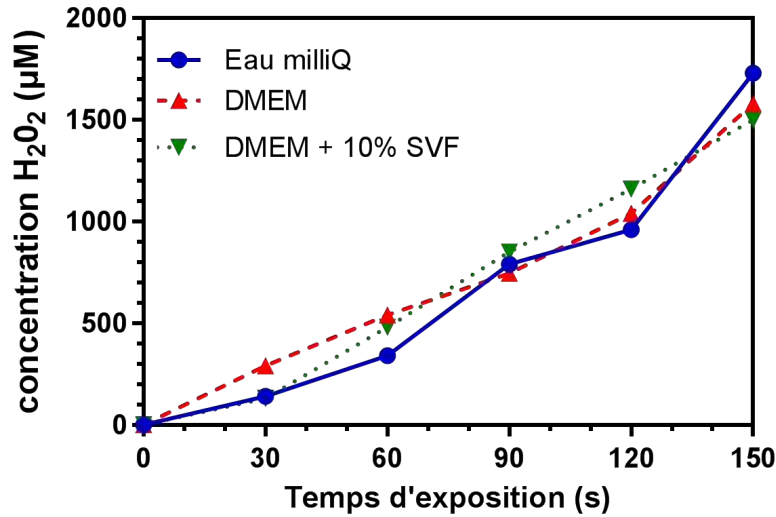


FIGURE 7.2.1 – Évolution de la production de H_2O_2 dans différents liquides activés par plasma en fonction du temps d'exposition

TABLE 7.2 – Concentration en peroxyde d'hydrogène dans les liquides activés par plasma estimée à partir d'une analyse fluorimétrique et de deux méthodes biologiques basées sur l'analyse des dommages à l'ADN et du détachement cellulaire.

Temps d'exposition (s)	Concentration en peroxyde d'hydrogène dans les liquides activés par plasma (mM)		
	Fluorimétrie	Dommages à l'ADN	Détachement cellulaire
60	0.41 ± 0.10	0.27 ± 0.09	0.40 ± 0.30
120	1.04 ± 0.09	0.74 ± 0.19	0.72 ± 0.48
240	N/A	3.16 ± 0.59	3.18 ± 0.69

7.3 Oxygène singulet (1O_2)

L'oxygène singulet peut être généré dans l'eau et les milieux de culture cellulaire après traitements par jet de plasma Hélium [206, 94] ou d'Air [209].

Pour caractériser la formation de l'oxygène singulet dans différents milieux après traitement par plasma, la spectroscopie RPE a été réalisée en utilisant 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMP, 2mM) qui est un piègeur spécifique à l'oxygène singulet.

Le signal RPE obtenu dans l'eau milliQ après 150s d'exposition au jet de plasma en présence de TEMP est composé (voir figure 7.3.1.a) d'un triplet de transition avec un ratio d'intensité de 1 :1 :1. Les constantes de couplages hyperfines déterminées à partir de ces spectres sont $a_N = a_H = 16G$ et $g=2.0059$. Ce signal, détecté quelque soit le liquide activé par jet de plasma, est typiquement représentatif de l'adduit TEMP- 1O_2 . Ceci indique par conséquent la présence d'oxygène singulet dans les trois solvants étudiés après exposition au jet de plasma. La quantité d'oxygène singulet générée dans l'eau ainsi que dans les autres

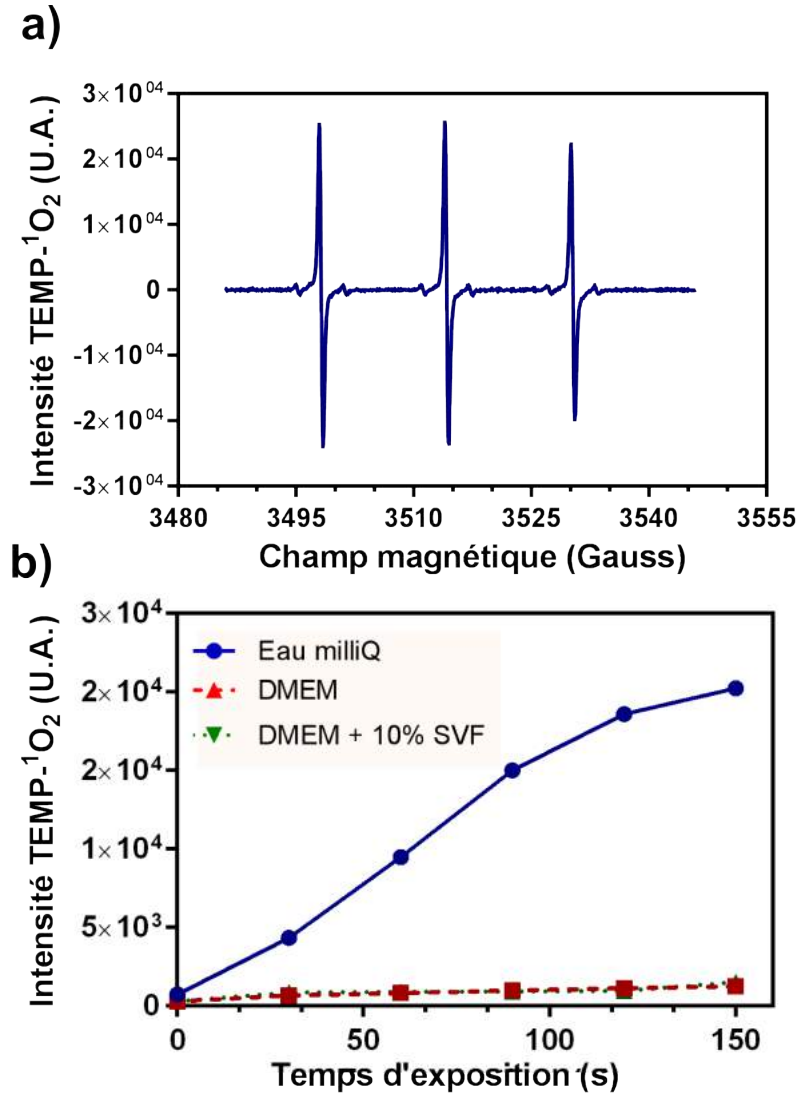


Figure 7.3.1 – (a) Spectre TEMP- 1O_2 obtenu après 150s de traitement plasma dans l'eau milliQ. (b) Évolution de la production de 1O_2 dans trois solvants en fonction du temps d'exposition. La première transition du spectre TEMP-O est utilisée pour déterminer l'intensité du signal.

milieux de culture augmente linéairement avec le temps d'exposition (avec des coefficients de régression linéaire $R^2_{EAU} = 0,98$, $R^2_{DMEM} = 0,95$, $R^2_{DMEM+SVF} = 0,88$) (figure 7.3.1.b). L'intensité du signal que produit l'adduit TEMP- 1O_2 est négligeable dans les milieux de culture cellulaire DMEM avec ou sans sérum. Ceci peut être expliqué par la composition des milieux de culture qui contiennent de la cystéine et des tryptophanes. En effet, ces acides aminés sont connus pour leur réactivité avec l'oxygène singulet induisant ainsi une diminution drastique du nombre de molécules que le piègeur TEMP peut piéger. L'oxygène singulet ainsi produit par l'interaction du jet de plasma avec le milieu contribuera à la fois à la formation de radicaux d'oxyde dans le PAM et à la déplétion de nutriments cellulaires.

7.4 Oxyde nitrique (NO•)

La détection et la quantification de l'oxyde nitrique dans les liquides activés par plasma froid sont basées sur une méthode issue des travaux de Toshiharu *et al* concernant l'effet de l'oxyde nitrique sur le système vasculaire [215]. Cette méthode de détection réside dans l'utilisation du carboxy-PTIO qui est un piègeur capable de réagir de manière stœchiométrique avec l'oxyde nitrique pour produire d'une part du carboxy-PTI et d'autre part des nitrates [215, 216]. La particularité du carboxy-PTIO et du carboxy-PTI c'est qu'ils possèdent une signature RPE distincte.

Lors de l'exposition d'une solution contenant le piègeur carboxy-PTIO (166 μ M du CPTIO dans l'eau milliQ) au jet plasma froid durant 150s, l'analyse par spectroscopie RPE donne le signal représenté dans figure 7.4.1.a. Ce signal RPE est composé uniquement de deux composantes RPE d'espèces distinctes :

- la composante principale du signal RPE 7.4.1 est corrélée au produit carboxy-PTI (voir figure .b) résultant de l'interaction entre le piègeur et l'oxyde nitrique,
- la composante secondaire est quant à elle issue des molécules du piègeur carboxy-PTIO résiduel qui n'ont pas réagi avec des radicaux lors de l'exposition (voir figure 7.4.1.c).

Il est alors possible de déterminer la concentration en oxyde nitrique généré par le jet de plasma dans les liquides en utilisant deux méthodes.

La première méthode, dite directe, consiste à comparer l'intensité du signal RPE du carboxy-PTI après exposition avec une courbe étalon reliant l'intensité du spectre du type :

$$[\text{NO}^\bullet] = f(\text{intensité du signal carboxy - PTI}). \quad (7.4.1)$$

La seconde méthode dite indirecte est basée sur l'analyse du signal RPE du carboxy-PTIO résiduel après exposition. À partir d'une courbe étalon du type :

$$[\text{carboxy - PTIO}] = f(\text{intensité du signal carboxy - PTIO}) \quad (7.4.2)$$

En effet, il est possible de déterminer la quantité de piègeur qui a réagi lors de l'exposition et par conséquent la concentration d'oxyde nitrique qui a été générée. Nous avons choisit la méthode indirecte pour la quantification de l'oxyde nitrique car la courbe d'étalonnage est obtenue sans ajout de aucun produit supplémentaire.

La difficulté majeure dans cette méthode de quantification est qu'il est indispensable d'identifier l'intensité des deux signaux RPE du carboxy-PTI et carboxy-PTIO résiduel à partir du spectre expérimental. Pour cela nous avons utilisé le logiciel Winsim qui permet de simuler plusieurs signaux radicalaires à partir des constantes de couplages et de déterminer la

contribution de chacun de ces signaux pour simuler le mieux possible le spectre expérimental.

Pour déterminer les constantes de couplages du piègeur carboxy-PTIO et carboxy-PTI des analyses par spectroscopie RPE de solutions contenant le piègeur carboxy-PTIO sans et avec exposition au plasma ont été effectuées. Le signal RPE du carboxy-PTIO (l'eau milliQ avec 166 μM du carboxy-PTIO) sans exposition au jet (voir figure 7.4.1.c) est composé de 5 transitions dont le ratio d'intensité est 1 :2 :3 :2 :1 et dont les structures de couplages hyperfines sont $a_N = a_H = 8.1 \text{ G}$ et $g = 2.0068$. Pour déterminer les constantes du produit carboxy-PTI il est nécessaire de se placer dans une situation où la concentration en oxyde nitrique est supérieure à la concentration initiale du piègeur.

Pour cela, une exposition de longue durée d'une solution contenant une faible quantité du piègeur carboxy-PTIO (166 μM) nous a permis de mesurer le signal du carboxy-PTI. La figure 7.4.1.b donne le spectre du carboxy-PTI qui est composé de 7 transitions dont les ratios d'intensité sont 1 :1 :2 :1 :2 :1 :1 et dont les constantes de couplages hyperfines sont $a_N = 9.8 \text{ G}$, $a_H = 4.4 \text{ G}$ et $g = 2.0068$. A noté que les constantes de couplages déterminées expérimentalement pour les deux radicaux sont en accord avec les données issues de la littérature [216, 215].

La présence de Carboxy-PTI dans l'eau après activation par jet de plasma confirme la génération d'oxyde nitrique. L'oxyde nitrique sous forme gazeuse a également été observé dans la plume plasma par spectroscopie d'émission dans de précédents travaux [132] en utilisant le même jet de plasma. Ceci laisse suggérer que l'oxyde nitrique observé dans les liquides peut provenir de la solvatation de l'oxyde nitrique gazeux. La génération d'oxyde nitrique dans les liquides après exposition au plasma a déjà été observée dans l'eau lors de traitement par plasma d'hélium [217] ou plasma d'argon [207] ainsi que dans des solutions salines tamponnées exposées à un plasma d'air [218, 219].

Dans la figure 7.4.2 est représentée l'évolution de la concentration de $\text{NO}^\bullet$ en fonction du temps d'exposition pour les différents liquides activés. Dans l'eau milliQ, la concentration en $\text{NO}^\bullet$ augmente linéairement avec le temps d'exposition (coefficient de régression linéaire $R_{\text{EAU}}^2 = 0,98$) jusqu'à atteindre $382.72 \pm 1.79 \mu\text{M}$ après 150 s d'exposition au jet de plasma DBD hélium. Dans les milieux de culture cellulaire, la formation du radical oxyde nitrique est faible ($8.84 \pm 2.62 \mu\text{M}$ après 150 s dans le DMEM) ou non significative (proche de 0 car en dessous de la limite de détection dans le DMEM+SVF). Dans le DMEM, ces résultats peuvent être expliqués par l'importante réactivité entre le radical $\text{NO}^\bullet$ et les biomacromolécules du milieu de culture. En effet, le $\text{NO}^\bullet$ et d'autres espèces connexes sont capables de modifier les protéines à travers des réactions chimiques indépendantes de la présence d'enzymes. La fixation d'un groupe d'oxyde nitrique à une transition métallique ou un thiol (particulièrement les résidus de cystéine) est appelé Nitrolysatation [220].

La nitration de la tyrosine est une protéine covalente résultant de l'addition d'un groupe nitro à l'une des deux ortho carbone équivalent du cercle aromatique des résidus de tyrosine [221]. Les protéines présents dans les milieux de culture en présence ou non de sérum et en

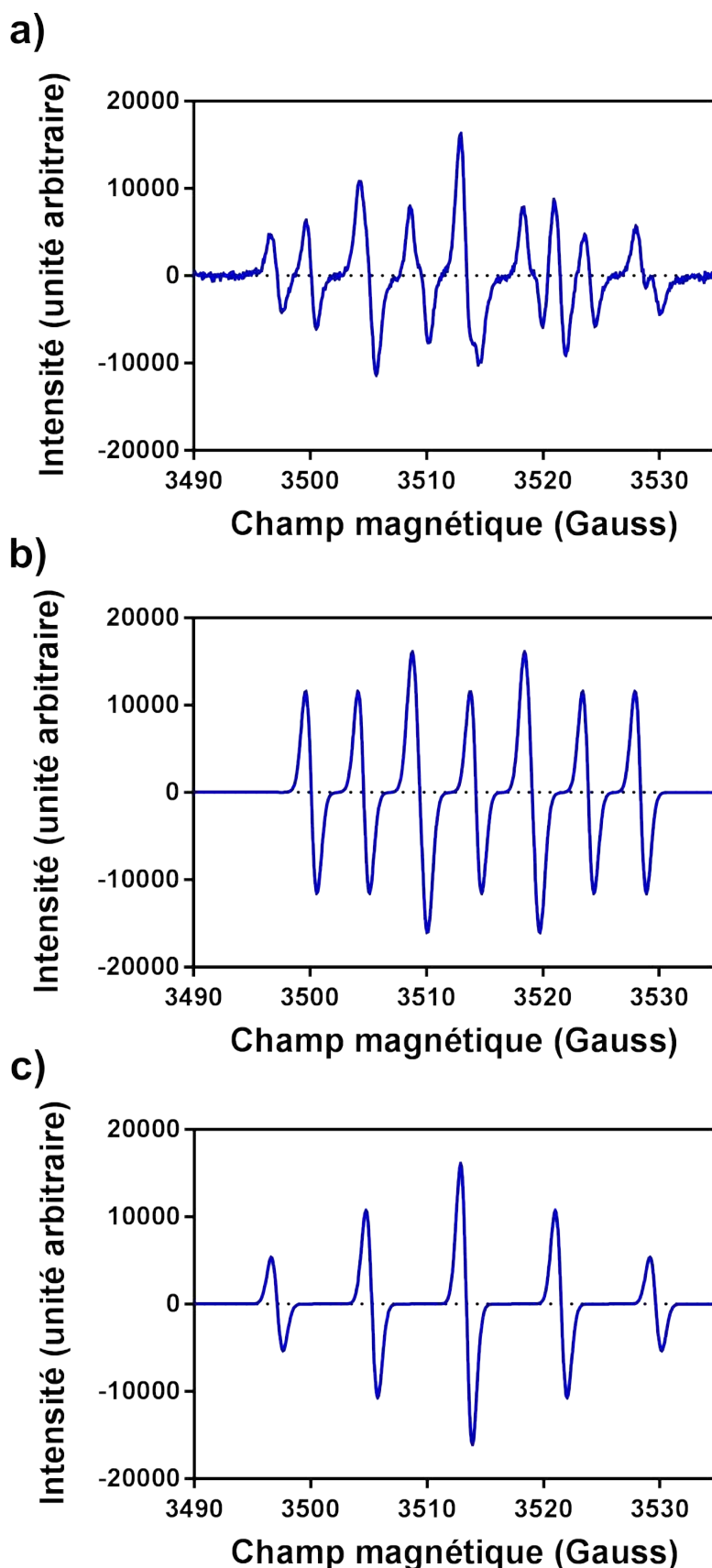


Figure 7.4.1 – Spectre RPE du C-PTIO dans l'eau avec et sans traitement plasma. (a) Spectre expérimental d'une solution d'eau milliQ contenant le piègeur C-PTIO après 60s de traitement par jet plasma DBD hélium. (b) Simulation RPE du signal C-PTIO. (c) Signal RPE du C-PTI résultant de l'interaction entre le C-PTIO et l'oxyde nitrique.

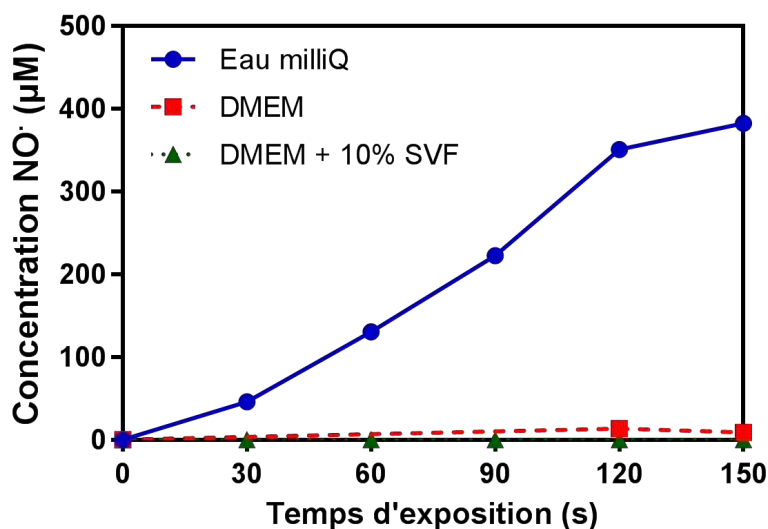


Figure 7.4.2 – Évolution de la production d'oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$) dans différents milieux de culture en fonction du temps d'exposition

particulier la L-cystéine peuvent également expliquer la faible concentration d'oxyde nitrique observée suite à un processus de quenching. Dans le DMEM+SVF la concentration proche de 0 du $\text{NO}^\bullet$ peut provenir de la présence de protéines anti-oxydantes comme par exemple l'albumine en plus des biomacromolécules du DMEM conduisant ainsi à une consommation totale du $\text{NO}^\bullet$.

7.5 Nitrite/nitrate (NO_2/NO_3)

La formation de nitrite et de nitrate induite par les jets de plasma durant l'exposition a été étudiée et quantifiée à travers l'utilisation d'un kit de dosage colorimétrique Nitrite/nitrate basé sur les réactifs de Griess suivant la procédure décrite dans la section matériels et méthodes (cf. chapitre 2). La figure 7.5.1 regroupe les évolutions du NO_2/NO_3 dans les trois liquides après exposition au jet de plasma DBD hélium. La concentration de nitrite dans l'eau milliQ et les milieux de culture (figure 7.5.1.a) augmente linéairement avec le temps d'exposition au jet de plasma hélium (avec des coefficients de régression linéaire $R_{\text{EAU}}^2 = 0,92$, $R_{\text{DMEM}}^2 = 0,97$, $R_{\text{DMEM+SVF}}^2 = 0,97$). La concentration en nitrite dans le milieu de culture avec sérum de veau fœtal est 2.87 ± 0.47 fois plus importante que dans le milieu sans sérum et 18.77 ± 2.26 fois plus que dans l'eau milliQ. Les incertitudes significatives concernant la concentration en nitrite peuvent être expliquées par les interactions entre les espèces induites par le jet de plasma dans les milieux DMEM et DMEM + 10% de SVF avec le réactif de Griess.

La quantification des nitrates est plus difficile et seuls les résultats dans l'eau miliQ et le milieu de culture sans sérum sont représentés dans la figure 7.5.1.b. En deçà de 90 s d'activation du milieu de culture sans sérum par jet de plasma la concentration de

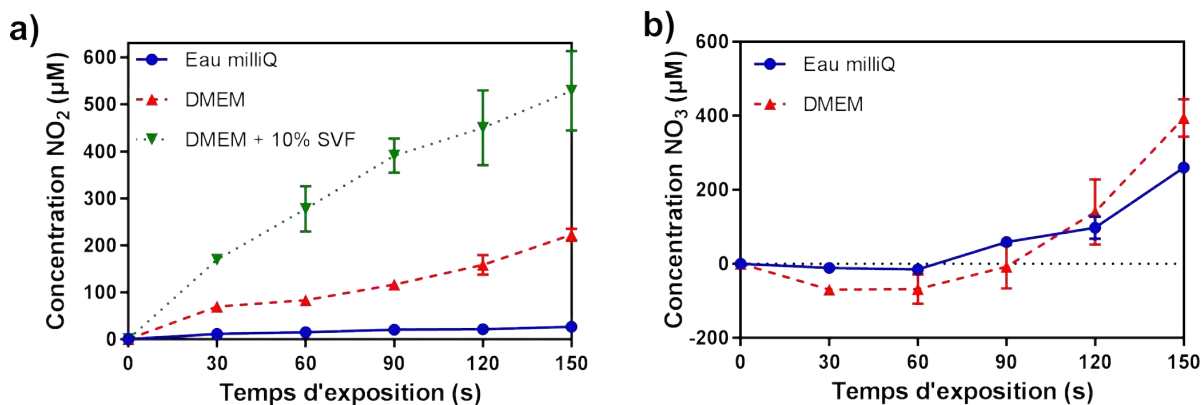


Figure 7.5.1 – Évolution de la production de nitrites et nitrates dans différents liquides activés par plasma en fonction du temps d'exposition

nitrate est égale à 0. Au delà, la concentration de nitrate semble augmenter linéairement avec le temps d'exposition. Après 150s de traitement la concentration en nitrate est plus élevée dans le milieu sans sérum que dans l'eau milliQ. L'incapacité de quantifier les nitrates dans DMEM + 10% de SVF est probablement liée à une faible concentration de nitrite inférieure à la limite de détection (2,5 µM). De plus, les valeurs négatives obtenues lors de la quantifications des nitrates en dessous de 90s d'exposition peuvent être expliquées par la non linéarité des courbes d'étalonnage (voir chapitre 4) dont l'incertitude augmente avec le facteur de dilution utilisé.

La concentration en nitrite est similaire aux estimations de Arjunan *et al* lors d'essais avec plasma d'air [209] et à ceux de Adachi *et al* avec un jet de plasma hélium [194].

Contrairement aux radicaux libres, les concentrations des nitrites et nitrates dans le PAM sont plus élevées dans les milieux complexes. Ceci reflète le fait que les nitrites et les nitrates ne réagissent pas directement avec les acides aminés et les protéines contenues dans les milieux de culture cellulaire. Dans l'eau, les nitrites et nitrates formés peuvent réagir avec les espèces réactives oxygénées et plus particulièrement avec le radical hydroxyle [222]. Dans des milieux de culture complexes comme le DMEM avec ou sans sérum de veau foetal cette réaction rentre en compétition avec l'oxydation des biomolécules par les ROS. Ceci peut expliquer la présence plus importante de nitrites et nitrates dans le DMEM que dans l'eau milliQ. L'absence de réaction entre les composants du milieu de culture et les nitrites/nitrates a déjà été mis en lumière par Adachi *et al* [194].

Il a été démontré que le nitrate et le nitrite peuvent être recyclés en NO dans les cellules [223]. Ainsi, ces anions inorganiques produits dans les liquides activés par plasma sont des sources potentielles de radicaux NO•. En plus, les espèces réactives de l'azote (RNS) sont connus pour avoir, en fonction de leur concentration, des effets délétères et/ou bénéfique sur la dynamique des cellules [224]. Les espèces RNS produites par les jets de plasma froids et leur concentration semblent induire la mort des cellules cancéreuses principalement offrant ainsi une sélectivité intéressante pour un traitement du cancer et expliquant l'effet sélectif

observé dans le chapitre 6 et dans la littérature [224].

7.6 Radical hydrogène ($H^\bullet$)

Le radical hydrogène a été détecté par spectroscopie RPE à travers l'utilisation du piègeur α -phenyl-N-tert-butyl-nitron- (PBN). Le signal RPE typique obtenu après exposition au jet de plasma d'une solution DMEM contenant le piègeur PBN (21.6 mM) est donné figure 7.6.1.a. Ce signal correspond à la signature RPE du PBN-H. L'adduit PBN-H génère un signal composé de 9 transitions dont le ratio d'intensité est 1 :2 :1 :1 :2 :1 :1 :2 :1 et dont les constantes de couplages hyperfines sont $a_N = 16.2$ G, $a_H = 10.3$ G, $g = 2.0776$. Ces données mettent en évidence la production de $H^\bullet$ dans les liquides activés par plasma. Nos résultats sont comparables à ceux trouvés dans la littérature [225, 226, 180].

La figure 7.6.1.b donne l'évolution de la concentration relative de $H^\bullet$ en fonction du temps d'exposition pour les trois liquides étudiés. Sans exposition au jet de plasma, un très faible signal associé à l'adduit PBN-H est observé dans l'eau milliQ et dans les milieux de culture cellulaire (voir figure 7.6.1.b). L'intensité du signal est totalement indépendante de la durée d'exposition au plasma dans le cas de l'eau milliQ alors qu'elle augmente linéairement dans les milieux de culture cellulaire avec ou sans sérum (coefficients de régression linéaire $R_{DMEM}^2 = 0,96$, $R_{DMEM+SVF}^2 = 0,97$). La formation de ce radical hydrogène est probablement associée au processus de transfert d'électron qui peut intervenir lors de l'oxydation des biomacromolécules dans les milieux de culture cellulaire par les espèces réactives oxygénées.

Ces résultats suggèrent que le jet de plasma produit de faibles quantités de radicaux hydrogène dans l'eau milliQ. Ceci est en accord avec les études par spectroscopie d'émission optique du jet de plasma DBD hélium où il a été montré que le plasma génère de très petites quantités d'hydrogène gazeux [132].

Dans le cas des milieux de culture complexes tels que DMEM et DMEM avec SVF, la formation de radicaux hydrogène peut être attribué en partie à la réaction des ROS comme par exemple le radical hydroxyle avec des acides aminés. En effet, deux récents articles ont montré que des réactions de nitration, d'oxydation et de déhydrogénisation peuvent induire le rejet du radical hydrogène dans le milieu [210, 227]. Comme le montre la figure 7.6.1.b, la formation de $H^\bullet$ est plus élevée dans le DMEM que dans DMEM + SVF. Cette différence peut être expliquée par la présence d'albumine dans du DMEM + SVF. Cette protéine est connue pour ses propriétés antioxydantes et sa capacité à piéger les radicaux libres [228]. Ce qui peut donc conduire à la diminution de la quantité de ROS capable de réagir avec les acides aminés du DMEM.

Cette interaction entre radicaux libres et les composants essentiels du milieu de culture cellulaire (acides aminés, vitamines, glucose, etc...) peut conduire à une diminution des facteurs de croissances et des éléments indispensable à la croissance cellulaire dans le milieu après exposition conduisant ainsi à un ralentissement voir un arrêt de la croissance cellulaire.

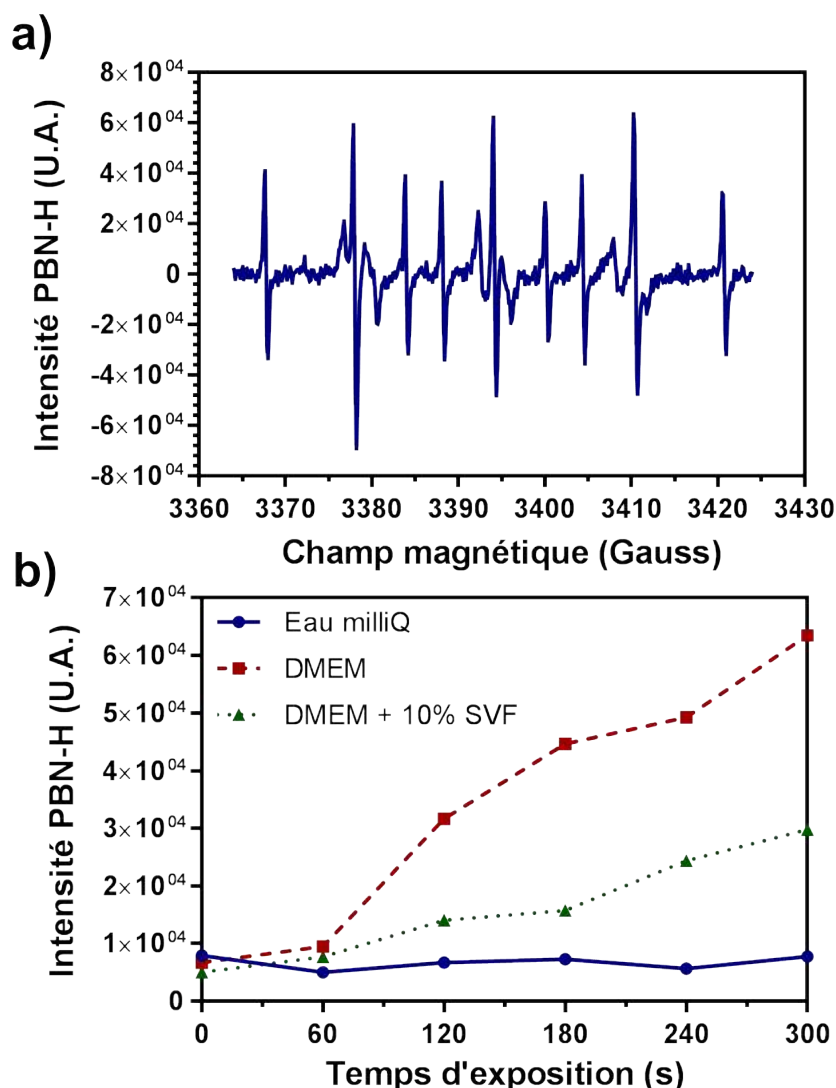


Figure 7.6.1 – (a) Spectre RPE obtenu après activation d’une solution DMEM durant 150s au jet de plasma hélium. (b) Évolution de la production de radical hydrogène ($H^\bullet$) dans différents liquides en fonction du temps d’activation. La transition centrale du signal est utilisée pour déterminer l’intensité du signal.

Cette hypothèse permettrait d’expliquer l’inhibition de croissance obtenu à long terme sur les sphéroïdes après le traitement par plasma d’hélium dans le chapitre 6.

7.7 Mécanismes d’interaction PAM/cellules cancéreuses

Le PAM peut être considéré comme étant une sources d’espèces réactives grâce à la formation d’espèces radicalaires et non-radicalaires après son activation par jet de plasma. La présence de ces espèces dans le PAM peut expliquer les effets génotoxique et cytotoxique observés lors du traitement indirect des sphéroïdes HCT116 (cf. chapitre 6). En effet, lors d’une exposition au jet de plasma, il y a formation d’espèces réactives stables, tels que le peroxyde d’hydrogène et les nitrites / nitrates qui peuvent pénétrer dans les cellules et

être des précurseurs potentiels d'espèces réactives intracellulaires. Un schéma récapitulant l'ensemble des espèces observées et caractérisées dans ce chapitre ainsi que leurs effets sur les cellules cancéreuses est représenté dans la figure 7.7.1.

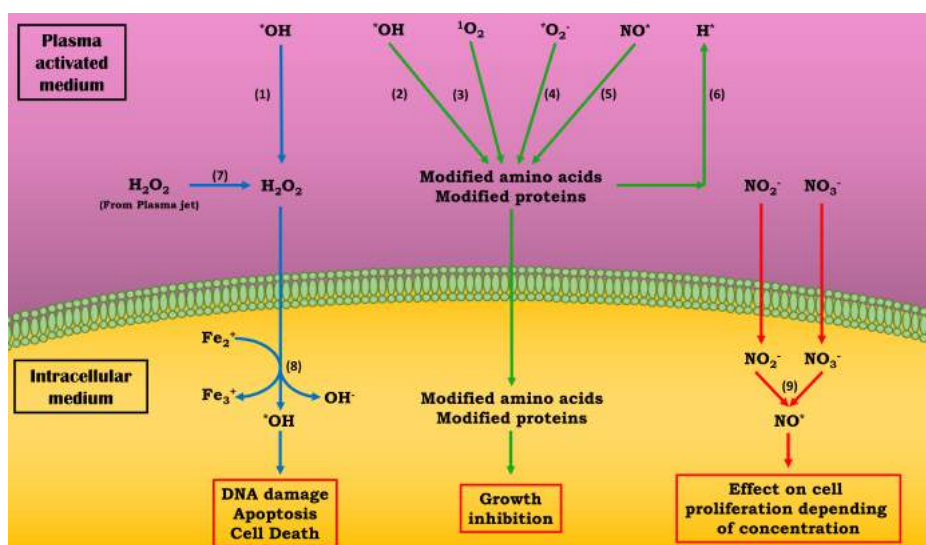


FIGURE 7.7.1 – Bilan des espèces générées dans un milieu de culture après exposition au jet de plasma DBD hélium et les réactions conduisant à des effets sur les cellules cancéreuses.

On distingue trois mécanismes d'interaction :

Le peroxyde d'hydrogène qui est capable de générer des dommages à l'ADN. Ces dommages peuvent être très probablement attribués à la réaction dans le milieu intracellulaire du fer avec le peroxyde d'hydrogène via une réaction de Fenton [229]. Cette réaction génère des radicaux hydroxyle qui peuvent directement induire des dommages à l'ADN.

La deuxième voie d'interaction est la modification des acides aminés et protéines. En effet, une modification et une déplétion en facteurs de croissance dans le milieu de culture peut entraîner un ralentissement voir un arrêt de prolifération cellulaire qui concorde avec les résultats à long terme observés lors du traitement *in vitro* des sphéroïdes HCT116.

Enfin, le dernier mode d'action des plasmas froids regroupe les nitrates et nitrites qui peuvent être recyclés dans le milieu intracellulaire en oxyde nitrique. Dans ces conditions, il a été montré que suivant la concentration en oxyde nitrique et en fonction du type cellulaire, ces espèces peuvent avoir un effet pro-prolifératif ou anti-prolifératif.

7.8 Conclusion

Nous avons mis en évidence et caractérisé la formation de certaines espèces radicalaires comme le radical hydroxyle, l'anion superoxyde, l'oxygène singulet et l'oxyde nitrique ainsi que des espèces non-radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène et les nitrites/nitrates suite à l'exposition de différents liquides au jet de plasma froid fonctionnant à l'hélium.

Ces espèces peuvent provenir directement de la solvation des molécules présentes dans le plasma ou d'une interaction de ces radicaux en milieu aqueux.

Dans un milieu complexe comme le DMEM, contenant de nombreuses biomolécules comme des protéines et des acides aminés, la concentration en radicaux diminue très fortement et s'accompagne d'une détection importante du radical hydrogène. L'hypothèse avancée est une réaction entre les biomolécules et les radicaux libres entraînant leur modification et le relargage de radical hydrogène dans le milieu [210, 227]. La diminution de signal observée est alors issue du quenching des radicaux par les biomolécules qui est privilégié par rapport au piègeur.

Enfin en présence de sérum (SVF) dans le milieu de culture, la concentration des espèces radicalaires diminue souvent drastiquement. Cela peut être attribué à un effet de quenching plus important de part la présence de nombreuses autres biomolécules dans le sérum ainsi qu'à la présence d'albumine connue pour ses propriétés antioxydantes et de piègeur de radicaux libres [228].

Concernant les espèces à longue durée de vie, on observe que la concentration en peroxyde d'hydrogène est indépendante du milieu de culture. Ces résultats sont en totale accord avec les mesures réalisées *in vitro* sur sphéroïdes. Lors de ces mesures, la présence ou non de sérum de veau fœtal dans le milieu ne modifié en rien la réponse des sphéroïdes aux traitements par plasma le premier jours particulièrement en ce qui concerne les dommages à l'ADN (voir annexe A).

Les nitrites et les nitrates sont quant à eux dépendant du milieu de culture mais leur concentration augmente avec la complexité du milieu exposé au plasma. En tout état de cause, cette dépendance indique que les nitrites et nitrates produits suite au traitement ne réagissent pas avec les biomolécules des milieux et donc vont être plus ou moins stable dans le temps.

Développement et caractérisation d'un jet de plasma DBD Argon

« Un nihiliste, c'est un homme
qui ne s'incline devant aucune
autorité, qui ne fait d'aucun
principe un article de foi, quel que
soit le respect dont ce principe
est auréolé. »

(IVAN TOURGUENIEV)

Chapitre 8

Conception d'un jet de plasma d'argon

Aux début de mes travaux de thèse, deux types de jets étaient utilisés dans le groupe de recherche PRHE pour des applications biomédicales dans l'air ambiant : un jet de plasma DBD fonctionnant avec de l'hélium et un jet Surfatron fonctionnant avec de l'argon. Nous venons de présenter un traitement indirect de cellules cancéreuses du colon *in vitro* impliquant le jet de plasma DBD fonctionnant avec de l'hélium. Ce jet a également été utilisé en application directe sur les mêmes cellules par Joseph Marie Plewa [132]. Le jet Surfatron a quant à lui m'a permis d'obtenir des informations préliminaires indispensables sur les méthodes d'analyses biologiques et son efficacité bactéricide a été évaluée sur des bactéries à l'état planctonique [10]. Ce travail a mis en évidence l'importance des radiations UV-C émises par les jets de plasma fonctionnant avec de l'argon. Dans nos conditions expérimentales, il a été observé que l'effet bactéricide de ce jet était principalement dû à ces radiations UV-C et dans une moindre mesure, à la présence peroxyde d'hydrogène dans le milieu.

Toutefois, le jet Surfatron n'est pas adapté pour le traitement de tumeurs en raison de son dispositif de refroidissement. En effet, il y a un risque de brûlure par le plasma (800 K) en cas de défaut de refroidissement de ce dispositif et la nécessité d'utiliser deux gaz (argon et air comprimé) est contraignante. Le jet DBD d'hélium n'est pas idéal non plus car, bien que la température apparente du jet soit compatible avec une application sur le vivant, l'hélium est un gaz non renouvelable et beaucoup plus onéreux que l'argon. De plus, les établissements médicaux sont, pour la plupart, déjà équipés d'un réseau de distribution d'argon. Enfin, l'analyse spectroscopique révèle la formation de plus d'espèces chimiques dans les jets plasma froids d'argon que d'hélium. C'est pourquoi un volet de cette thèse a été dédié à la conception d'un dispositif générant un jet de plasma froid DBD d'argon soufflé dans l'air ambiant, cette configuration permettant, a priori, de produire une quantité importante d'espèces actives à une température proche de la température ambiante. La solution la plus évidente aurait été d'utiliser le même dispositif DBD existant en remplaçant la bouteille d'hélium par une bouteille d'argon. Néanmoins, le champ disruptif de l'argon étant plus élevé que celui de l'hélium, ce choix aurait nécessité d'accroître la tension délivrée par le générateur au-delà des limites de ce dernier. Plutôt que d'investir dans un nouveau

générateur de haute tension, nous avons utilisé une autre géométrie d'électrode permettant de générer un champ électrique plus important sans changer de générateur de tension. L'architecture de ce générateur de jet plasma sera présentée dans la suite de ce chapitre. La caractérisation électrique et optique du jet sera ensuite présentée. Cette étape permettra de comparer les différents jets utilisés dans le cadre de cette thèse. Pour finir, une application directe *in vitro* de ce jet sur des tumeurs du colon sera présentée.

L'ensemble des analyses présentées dans cette partie a été publiée dans deux articles [230, 231].

8.1 Configuration du générateur jet de plasma DBD d'argon

Le nouveau dispositif générant un jet de plasma d'argon a été conçu autour d'une configuration DBD dite « cylindre-cylindre » différente de celle utilisée pour l'hélium. La fig. 8.1.1 représente une photographie du jet de plasma en fonctionnement. Plus précisément, il s'agit d'une électrode externe en aluminium (2) enroulée autour de la face externe d'un tube de quartz (1) et d'une électrode haute tension (3) à l'intérieur du tube constituée par une tige de cuivre (voir la figure 8.1.1). L'électrode interne est reliée au générateur de haute tension pulsée tandis que l'électrode externe est reliée à la masse de ce dernier. Pour limiter le risque d'apparition d'un arc électrique, il est préférable d'isoler l'électrode interne dans un second tube en quartz (4) dont une extrémité est fermée. L'argon est injecté avec un débit de quelques litres/min dans le tube en quartz à travers un débitmètre (Brooks). Le générateur de tension délivre les impulsion de haute tension avec une fréquence et une durée d'impulsion variables (respectivement de 1 Hz à 10 kHz et de 125 ns à 100µs). L'ensemble du dispositif à l'exception du générateur de tension est encastré dans un bloc cylindrique en plexiglas de 54 mm de diamètre faisant office de poignée. L'épaisseur de ce bloc a été calculée afin de garantir une distance suffisante entre l'électrode interne et l'utilisateur.

Pour plus de détails, les caractéristiques des principaux composants du dispositif sont résumées dans le tableau suivant :

Composant	Caractéristiques	n°
Tube externe	en quartz, $\varnothing_{\text{ext}} = 8 \text{ mm}$, épaisseur : 1 mm, longueur 37 mm	1
Électrode externe	feuille d'aluminium largeur 17 mm, épaisseur : 1 mm	2
Électrode interne	tige de cuivre $\varnothing = 2 \text{ mm}$, longueur : 71 mm	3
Tube interne	en quartz, $\varnothing_{\text{ext}} = 4 \text{ mm}$, épaisseur : 1 mm, longueur 50 mm	4
Générateur	Impulsion de tension 0-10 kV, 1 µs, 100Hz-9.69 kHz	5

TABLE 8.1 – Caractéristiques des principaux composants du générateur DBD de jet de plasma d'argon. La numérotation fait référence à la fig. 8.1.1

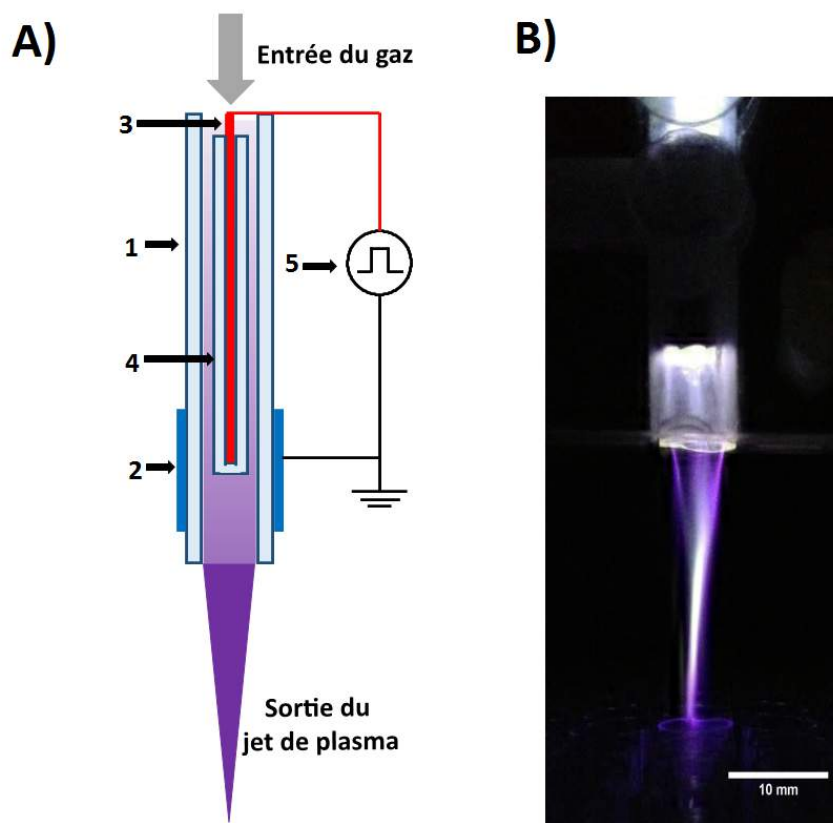


FIGURE 8.1.1 – (a) Représentation schématique en coupe du générateur DBD de jet de plasma froid développé pour fonctionner avec de l'argon. La numérotation fait référence au tab. 8.1 (b) photographie du dispositif générant un jet de plasma en fonctionnement

8.2 Distribution du champ électrique

Dans cette partie la configuration du dispositif sera indiquée à l'aide des acronymes S-DBD pour *Single-DBD* (dispositif composé du tube de quartz externe et une électrode métallique interne) et D-DBD pour *Double-DBD* (dispositif composé du tube de quartz et d'une électrode interne métallique recouverte d'un tube en quartz).

Le champ électrique régnant avant l'apparition de la décharge plasma a été simulé à l'aide d'un modèle par éléments finis 2D sous le logiciel ElecNet (Infolytica Corporation, Trial Edition, Version 7.4.1). La figure 8.2.1 représente la distribution du champ électrique géométrique dans les deux configurations possibles pour une puissance injectée d'environ 5 W dans les deux cas (estimation faite dans la section 8. »). On remarque que le champ électrique dans la configuration S-DBD est plus élevé à proximité de l'électrode interne (haute tension) puis décroît le long du gap inter-électrode. Dans la configuration D-DBD, l'évolution du champ électrique le long de la position radiale r indique la présence de deux discontinuités. La première où le champ électrique atteint environ 3.5 MV/m est localisée à l'interface entre l'électrode haute tension et le tube de quartz interne ($r = 1$ mm). À $r = 2$ mm le champ électrique présente une seconde discontinuité et atteint alors 7.4 MV/m. Cette position correspond à l'interface entre le tube de quartz interne et le flux de gaz. Le champ électrique maximal dans le gaz porteur atteint donc une valeur de l'ordre de 4.6 MV/m dans la configuration S-DBD tandis qu'il est plus élevé dans la configuration D-DBD avec une valeur de l'ordre de 7.4 MV/m. Ceci est causé par la différence entre les tensions inter-électrodes (6 kV pour la S-DBD et 9 kV dans la D-DBD) déterminées pour que les deux dispositifs consomment la même puissance. On observe aussi clairement l'effet de pointe localisé sur les bords de l'électrode haute tension dans la configuration S-DBD avec un champ local pouvant atteindre 9.5 MV/m. Dans la configuration D-DBD cet effet de pointe est globalement observable à l'interface de l'électrode haute tension et du tube de quartz interne mais n'a aucune influence notable sur le champ électrique géométrique dans le gap.

Lorsque la même tension est appliquée aux deux dispositifs (figure 8.2.2), un champ électrique maximum du même ordre de grandeur est observé dans le gap inter-électrodes (7.6 MV/m et 7.3 MV/m respectivement pour la S-DBD et D-DBD).

Ces calculs numériques permettent de prédire que les deux configurations S-DBD et D-DBD sont appropriées pour générer des décharges plasmas à pression atmosphérique avec l'alimentation électrique disponible. Ces deux configurations permettent aussi l'obtention d'un jet de plasma à partir d'une large variété de gaz plasmagènes puisque le champ électrique à l'intérieur du gap est plus élevé que le champ électrique disruptif à la pression atmosphérique de l'argon (0.6 MV/m), l'air (3 MV/m), le diazote N_2 (3.45 MV/m) et l'hélium (0.5 MV/m).

Le volume gazeux dans lequel le plasma peut être généré est presque deux fois plus

important dans la configuration S-DBD de par l'absence de la seconde barrière diélectrique que dans la configuration D-DBD. Nous allons voir que cela n'est pas sans conséquence lors de la comparaison de la consommation électrique des dispositifs.

De la même manière, le gap inter-électrode étant plus étroit dans la configuration D-DBD, la vitesse d'éjection du gaz en est modifiée si l'on impose un même débit à l'entrée des deux configurations. Pour un même débit, la vitesse du gaz est estimée être 1.6 fois plus élevée dans la configuration D-DBD par rapport à la configuration S-DBD ce qui peut entraîner l'apparition de turbulences et modifier les propriétés hydrodynamiques du jet dans la configuration D-DBD.

8.3 Caractérisation électrique de la décharge

Dans un jet de plasma DBD alimenté par une tension pulsée, chaque pulse de tension induit deux décharges plasma distinctes. Comme le montre la figure 8.3.1, des pics de courants sont observés de manière corrélée avec les fronts de tension. Ce type de comportement est typique des décharges capacitives[232, 233, 234, 105]. Le courant mesuré peut être décomposé en deux parties qui se superposent. La première correspond au courant de déplacement (ou courant capacitif) induit par la présence d'un diélectrique dans l'espace inter-électrodes. De part sa nature capacitive, ce courant n'apparaît que lors des variations de tensions. La seconde partie correspond au courant de conduction induit par la présence du plasma dans l'espace inter-électrodes.

La puissance électrique moyenne (ou puissance active) consommée lors de la décharge est une grandeur caractéristique généralement utilisée dans la littérature pour caractériser un dispositif plasma. Sa valeur est obtenue en moyennant sur une période T de l'impulsion de tension le produit courant $\times$ tension :

$$P = \frac{1}{T} \int_0^T i(t) \times u(t) dt \quad (8.3.1)$$

L'évolution de la puissance totale injectée dans le jet de plasma DBD argon en fonction de l'amplitude de l'impulsion de tension inter-électrodes est présentée dans le tableau ???. On constate une différence significative entre les deux configurations DBD puisque, pour une tension appliquée variant de 3 à 10 kV, la puissance injectée varie de 1.65 W à 11.70 W dans la configuration S-DBD et de 0.01 W à 6.22 W dans la configuration D-DBD. Ces observations sont en cohérence avec de précédentes études [235, 236]. On relève néanmoins un désaccord avec les travaux de *Quian et al* [237] car aucune corrélation n'a été observée entre la puissance injectée et le débit de gaz dans la plage de 1 à 4 l/min.

Si on impose un flux d'argon de 2 l/min et une durée d'impulsion de 1 μ s, le jet de

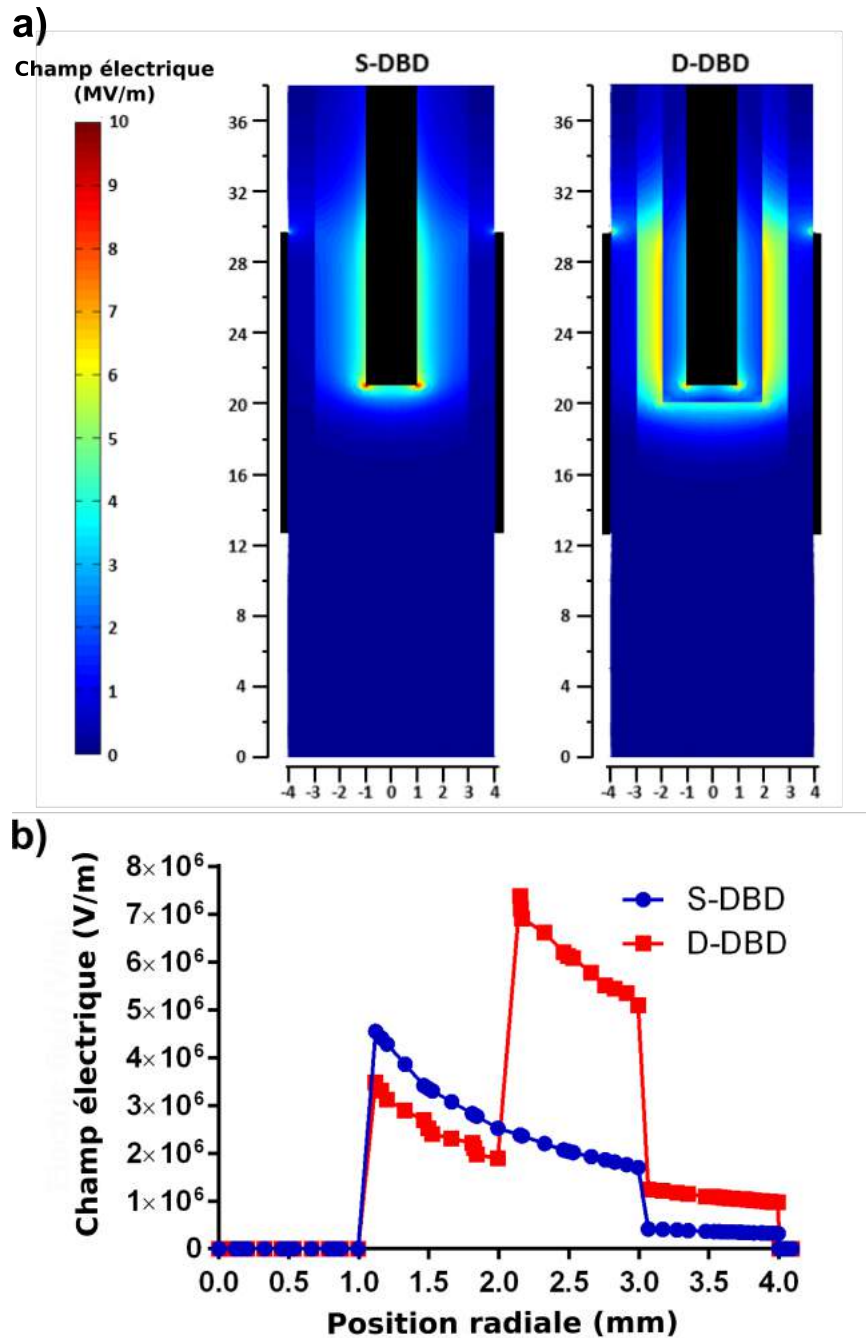


FIGURE 8.2.1 – a. Distribution du champ électrique géométrique pour les configurations S-DBD et D-DBD dans des conditions de puissances similaires. Tension appliquée entre les électrodes de : 6 kV (S-DBD) et 9 kV (D-DBD) correspondant à une puissance consommée par le plasma (voir tableau 8.2) de 5.32 W (S-DBD) et 5.12 W (D-DBD). Les électrodes sont coloriées en noir sur la figure. b. L'évolution du champ électrique radial dans les deux configurations DBD pour une position axiale de 24 mm.

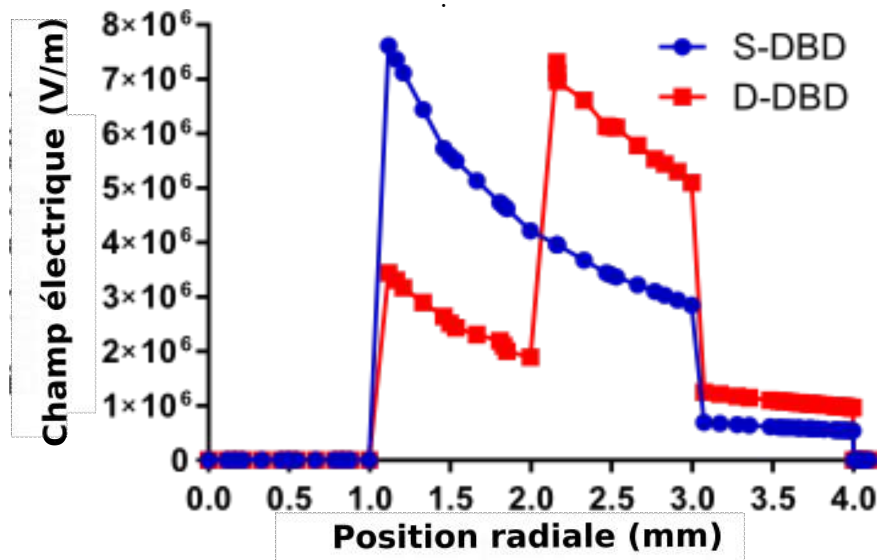


FIGURE 8.2.2 – Distribution du champ électrique géométrique pour les configurations S-DBD et D-DBD avec une tension appliquée aux électrodes de 9 kV dans les deux configurations pour une position axiale de 24 mm.

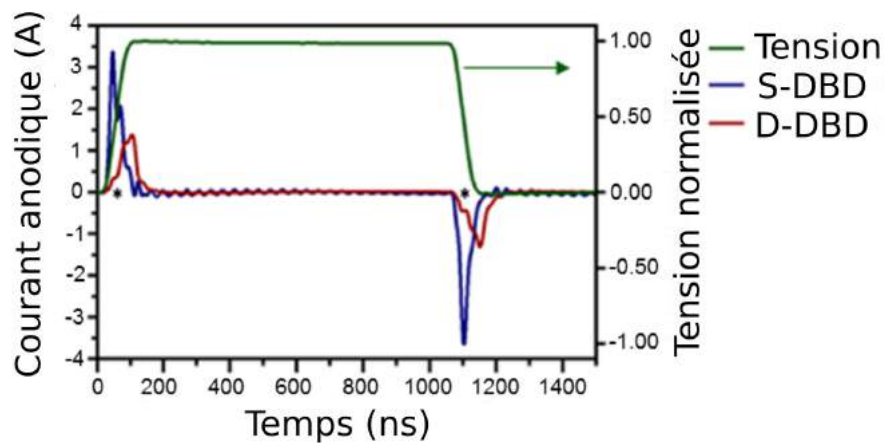


FIGURE 8.3.1 – Forme d'onde typique de la tension appliquée et du courant anodique mesuré du jet de plasma DBD argon (en configuration simple et double barrière diélectrique). Alimentation à la fréquence de 9.69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, débit d'argon de 2l/min et tension appliquée de 10kV.

TABLE 8.2 – Puissance consommée dans les deux configurations DBD en fonction de la durée de l'impulsion de tension. Conditions expérimentales : tension appliquée 10 kV, fréquence de 9.69 kHz, 2 L/min de flux d'argon.

Durée d'impulsion (μ s)	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75
Puissance S-DBD (W)	11.89	11.79	11.57	11.70	11.69	11.86	11.53
Puissance D-DBD (W)	3.43	4.52	5.45	6.22	6.35	6.29	6.41

plasma émerge dans l'air ambiant pour former une plume lorsque la tension inter-électrode dépasse 4 kV dans la configuration S-DBD et 6.5 kV dans la configuration D-DBD. Dans ces conditions, la puissance moyenne minimale nécessaire pour que le plasma émerge dans l'air se situe aux alentours de 3 W pour les deux configurations DBD.

Pour terminer l'analyse électrique du jet d'argon, on remarquera que, pour une même amplitude de tension inter-électrodes, la puissance moyenne injectée reste constante quelque soit la durée de l'impulsion de tension dans le cas S-DBD et pour une durée d'impulsion supérieure à 1 μ s dans le cas D-DBD (tableau 8.2). Pour la configuration D-DBD, cette puissance est très dépendante de la durée de l'impulsion lorsque cette dernière est inférieure à 1 μ s. Ces évolutions en puissance consommée sont corrélés aux variations du courant instantané en fonction de la durée d'impulsion (fig. 8.3.2). En effet, on remarque que le pic de courant négatif se produisant sur le front descendant de la tension inter-électrodes garde la même allure quelque soit la durée d'impulsion pour la configuration S-DBD ce qui n'est pas le cas pour la configuration D-DBD jusqu'à une durée d'impulsion de 1 μ s. L'hypothèse que nous avançons pour expliquer ce phénomène est que le courant de décharge relaxe plus lentement dans la configuration D-DBD que dans la configuration S-DBD (voir fig. 8.3.2). Ainsi, si la durée d'impulsion est trop courte, la décharge se produisant sur le front descendant de la tension vient interférer avec la décharge initiée lors du front montant précédent ce qui accroît la recombinaison en volume dans le gap inter-électrode tout en diminuant l'intensité du courant de conduction ainsi que la puissance consommée.

8.4 Caractérisation optique du jet de plasma

8.4.1 Identification des espèces radiatives

Les figures 8.4.1(a) et 8.4.1(d) regroupent une sélection de spectres d'émission allant des UV-C au proche infrarouge (200-900 nm) des espèces radiatives formées et/ou excitées par le jet de plasma dans la configuration S-DBD. Ces mesures ont été effectuées à une distance de 0.1 cm de la sortie du tube de quartz d'où émerge le plasma dans l'air. Ces molécules excitées et qui rayonnent sur la plage de sensibilité du spectromètre sont pratiquement toujours observées dans les jets de plasma d'argon émergeant dans l'air [234, 233, 236, 238, 239, 230].

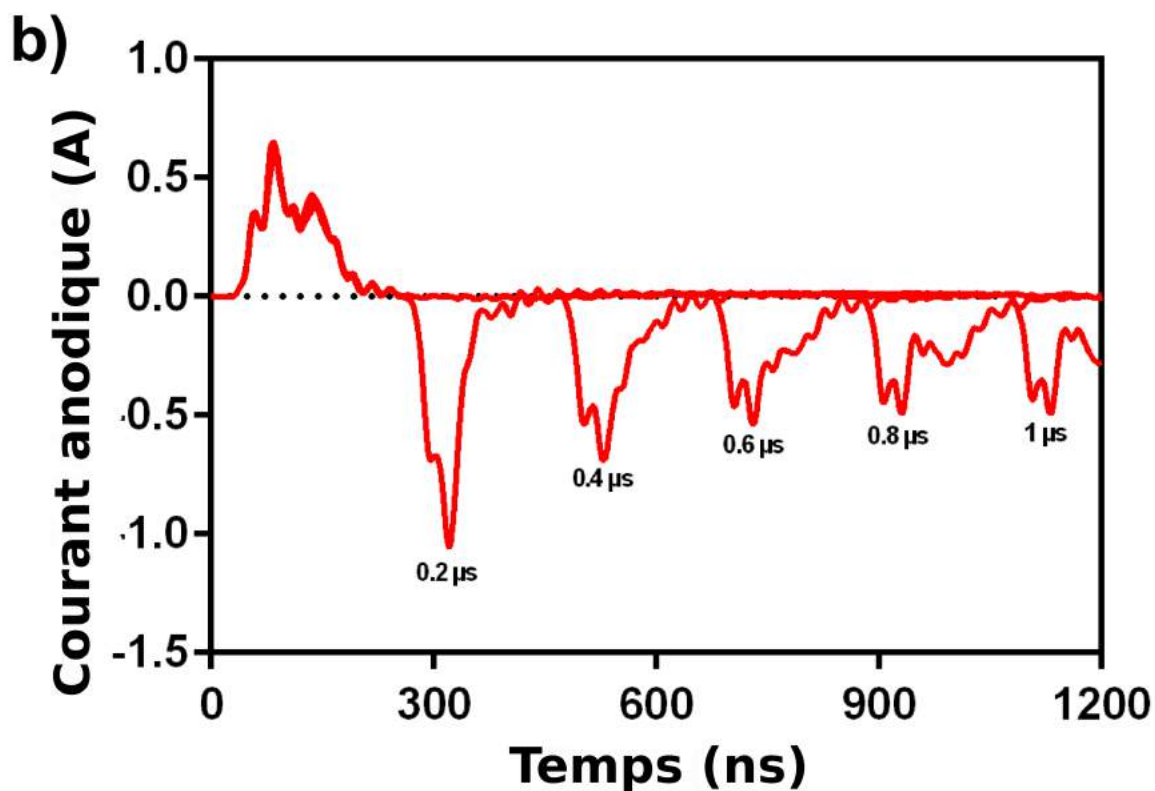
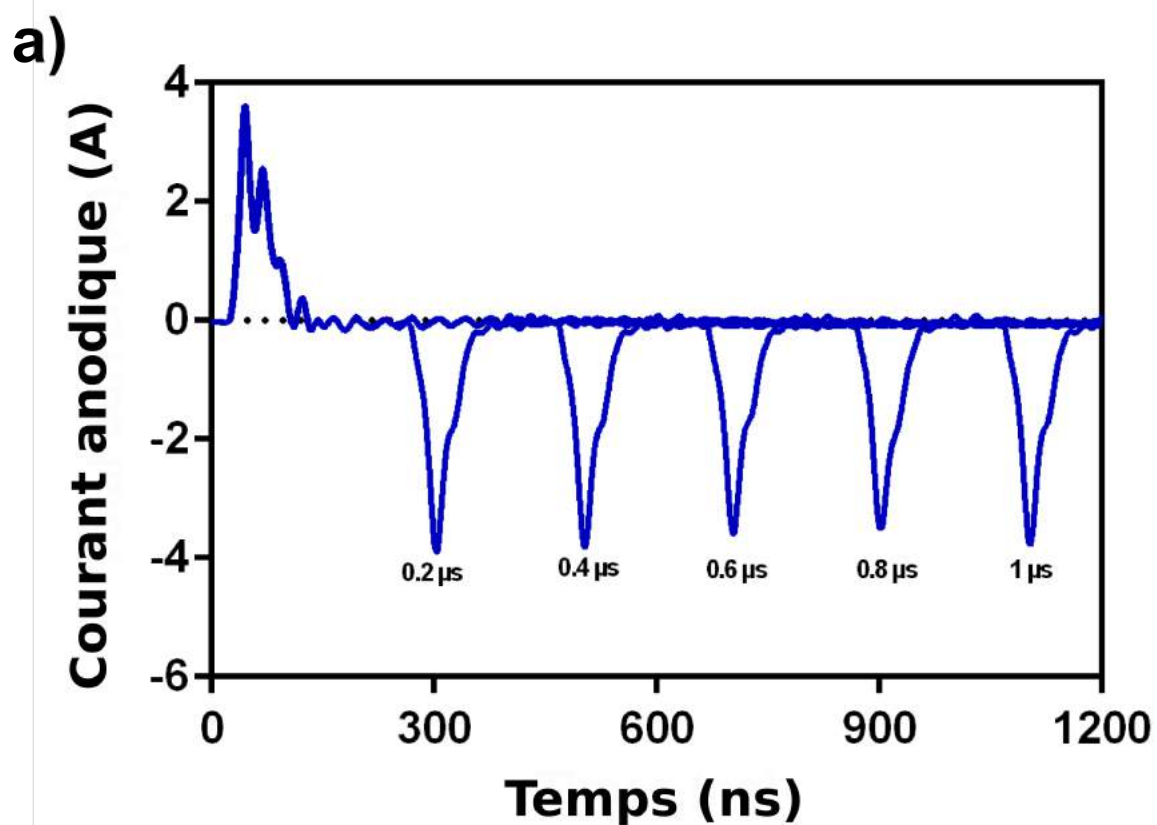


FIGURE 8.3.2 – Influence de la durée de l'impulsion de tension sur le courant de décharge négatif pour la configuration S-DBD (a) et D-DBD (b). Alimentation des jets de plasma à la fréquence de 9.69 kHz, un flux d'argon de 2 l/min et une tension de 10 kV.

Nous remarquons sans difficulté la présence de raies intenses situées entre 696 nm et 852 nm correspondantes aux transitions radiatives des niveaux 4p de l'argon vers les niveaux 4s. On distingue également de nombreuses bandes moléculaires émises par des impuretés du gaz plasmagène ou bien encore par des espèces formées lors de l'interaction du plasma avec l'air ou les impuretés du gaz porteur. Plus précisément, on identifie les bandes moléculaires de N_2 ($C^3\Pi_u \rightarrow B^3\Pi_g$) entre 315.8 nm et 434.3 nm, la bande moléculaire de OH ($A^2\Sigma_u \rightarrow X^2\Pi_g$) de 306 à 310 nm, les raies de l'oxygène atomique autour de 777 nm (état triplet) et 844 nm, les bandes de NO_γ ($A^2\Sigma_u \rightarrow X^2\Pi_g$) entre 210 nm et 270 nm ainsi que la raie H de la série de Balmer de l'hydrogène à 656 nm.

Nous avons également observé la présence du doublet caractéristique de Na à 589 nm et 589.6 nm présent uniquement dans les spectres de la configurations D-DBD. Cette espèce provient très probablement des impuretés désorbées par le quartz indiquant une forte interaction entre le plasma et le tube de quartz interne qui recouvre l'électrode haute tension dans la configuration D-DBD. Hormis ce détail, on identifie les mêmes espèces radiatives dans les jets de plasma des deux configurations DBD et c'est pourquoi seuls les spectres de la configuration S-DBD sont présentés ici.

8.4.2 Analyses quantitatives basées sur l'émission du plasma

8.4.2.1 Paramètres plasma

La détermination des paramètres plasma à partir des radiations émises par ce dernier a été présentée dans le chapitre 5. Nous ne nous attarderons donc pas sur ce point ici. Nous étudierons tout d'abord l'effet de la seconde barrière diélectrique de la configuration D-DBD sur les paramètres plasma puis nous verrons les évolutions des températures d'excitation et rotationnelle en fonction de la tension inter-électrodes ainsi que du flux d'argon.

La comparaison des paramètres plasma dans les deux configurations DBD possibles est présentée dans le tableau 8.3. À puissance consommée similaire et à l'exception de l'irradiance UV-C dont la valeur est très légèrement supérieure dans la configuration D-DBD, les caractéristiques plasmas apparaissent être significativement plus élevées dans la configuration S-DBD tout en restant comparables avec les caractéristiques de la configuration D-DBD¹.

La température rotationnelle, qui est habituellement considérée comme étant proche de la température apparente du jet, peut faire craindre une température apparente trop importante pour utiliser le jet de plasma sur le vivant. Toutefois, un thermomètre à mercure, placé à la sortie du tube où le plasma émerge dans l'air ambiant, indique une température apparente du jet de plasma aux alentours de 320 K quelque-soit la configuration DBD du

1. Pour la même amplitude de tension inter-électrodes, tous les paramètres plasma ont une valeur plus importante dans la configuration S-DBD probablement en raison de la puissance couplée au plasma qui est plus importante que dans la configuration D-DBD.

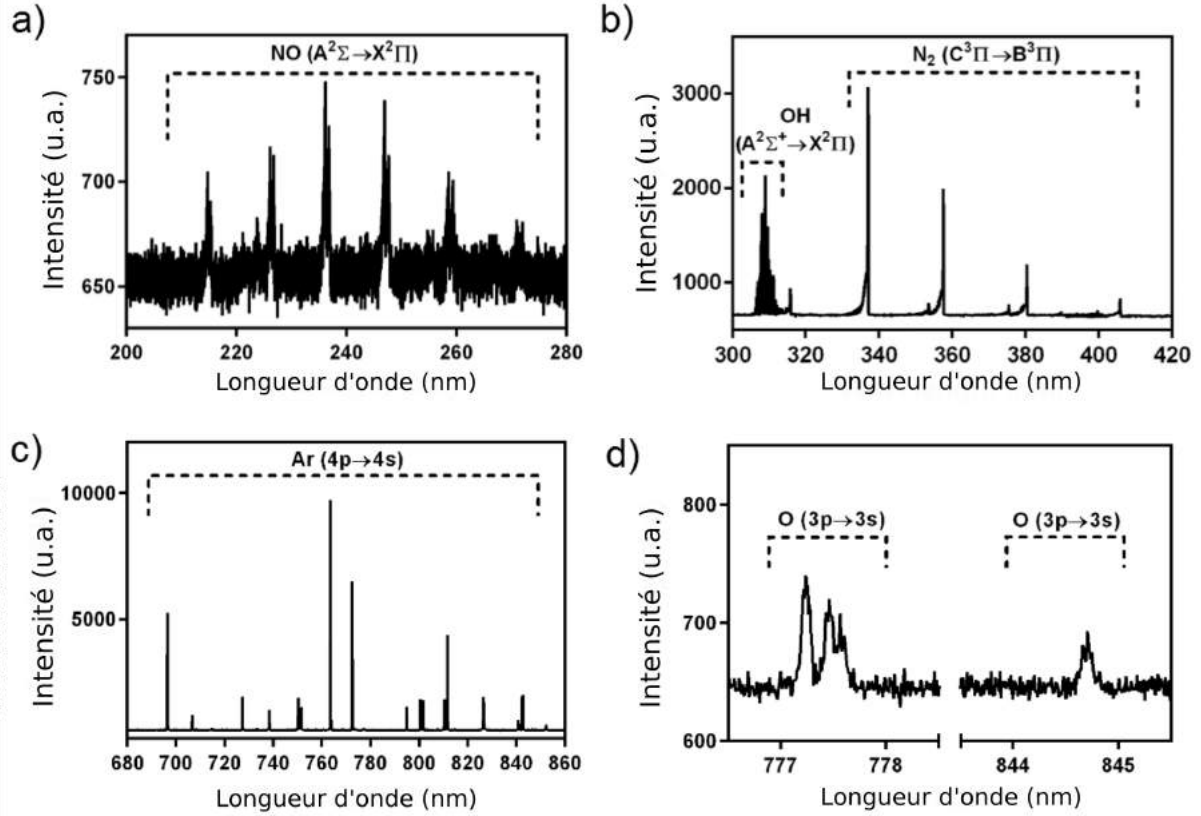


FIGURE 8.4.1 – Spectres UV-VIS-NIR à une distance de 0.1 cm de la sortie du tube de quartz composant le dispositif S-DBD. Conditions expérimentales : tension appliquée 10 kV, fréquence de répétition 9.69 kHz, durée de l'impulsion 1 μ s, flux d'argon 2 l/min.

TABLE 8.3 – Paramètres plasma pour les configurations S-DBD et D-DBD lors d'une consommation de puissance similaire (5W). Conditions expérimentales : Amplitude de la T tension inter-électrode de 9kV (D-DBD) et 6kV (S-DBD), durée de l'impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69kHz, flux d'argon 2l/min. Les analyses sont réalisées à 1mm près la sortie du tube de quartz exceptée l'irradiance UV-C mesurée à 17mm. La reproductibilité de chaque paramètre a été évaluée sur plusieurs heures.

	S-DBD	D-DBD	Reproductibilité
Température d'excitation (K)	5058	4350	± 300
Température rotationnelle (K)	407	380	± 13
Densité électronique (cm ⁻³)	2.51×10^{14}	2.43×10^{14}	$\pm 0.3 \times 10^{14}$
Oxygène atomique (ppm)	928	805	± 70
Irradiance UV-C (μ W.cm ⁻²)	20	23	N/A

dispositif. Par conséquent, notre dispositif plasma est compatible pour le traitement des matériaux thermosensibles, de liquides ou pour des applications biomédicales avec exposition directe au plasma.

On notera l'écart à l'équilibre thermodynamique du plasma produit par notre dispositif DBD. En effet, la température d'excitation de la population des atomes d'argon est un ordre de grandeur plus élevée que la température rotationnelle (tableau 8.4).

L'influence de la tension inter-électrode et du flux d'argon sur les paramètres plasma. Sur la plage de variation de ces deux paramètres expérimentaux (5-10 kV et 2-3 l/min d'Ar), seules des variations significatives de la température d'excitation et de la température rotationnelle ont été détectées. Les incertitudes et fluctuations sur la déterminations des autres paramètres plasma étaient trop importantes par rapport à la variation de ces derniers.

Une augmentation de la tension inter-électrode induit une augmentation de l'énergie de la population électronique et, par effet de conséquence, à des températures plasma plus importantes. C'est ce qui a été observé expérimentalement dans notre cas (voir tableau 8.4). Cette tendance est confirmée dans la littérature [237, 238]. Inversement, une augmentation du débit du gaz plasmagène se traduit par une diminution des températures du plasma comme on peut le remarquer sur le tableau 8.5.

Enfin, la fréquence de répétition des impulsions de tension ne semble avoir aucun impact sur les températures plasma dans la gamme de variation entre 1 kHz et 9.69 kHz tandis que la durée de l'impulsion de tension, en conformité avec les observations du courant de décharge, n'a une influence que pour une valeur inférieure à 0.8 μ s dans la configuration D-DBD. Dans ces conditions, nous avons observé une augmentation de la température d'excitation d'environ 250 K par rapport aux valeurs inscrites dans les tableaux 8.4 et 8.5.

TABLE 8.4 – Évolution de la température rotationnelle et de la température d'excitation en fonction de l'amplitude de la tension inter-électrode pour les configurations S-DBD et D-DBD. Fréquence de répétition des impulsions de tension de 9.69 kHz et durée d'impulsion de 1 μ s.

Débit d'argon : 2 L/min			
	Tension (kV)	Température d'excitation (K)	Température rotationnelle (K)
S-DBD	4	4980	375
	10	5180	450
D-DBD	8	4550	360
	10	4550	410

TABLE 8.5 – Évolution de la température rotationnelle et de la température d'excitation en fonction du flux d'argon pour les configurations S-DBD et D-DBD. Fréquence de répétition des impulsions de tension de 9.69 kHz et durée d'impulsion de 1 μ s.

Amplitude de la tension inter-électrodes : 10 kV			
	Flux d'argon (L/min)	Température d'excitation (K)	Température rotationnelle (K)
S-DBD	2	5180	450
	3	5126	419
D-DBD	2	4550	410
	3	4452	385

8.4.2.2 Estimation de la production d'oxygène atomique

La quantification des atomes d'oxygène présents en phase gazeuse dans le jet de plasma nous paraît être une donnée intéressante pour l'utilisation de notre jet de plasma pour des applications biomédicales. En effet, l'oxygène atomique permet, par exemple, la formation des espèces oxydantes à l'origine des effets observés sur des cellules cancéreuses dans les liquides activés par plasma [10, 132].

L'évolution de la concentration d'oxygène atomique à la sortie du tube de quartz dans les deux configurations DBD est représentée figure 8.4.2 en fonction de la tension inter-électrode et du débit de gaz plasmagène. On constate qu'en fonction des conditions expérimentales, la concentration absolue d'oxygène à la sortie du tube varie sur une plage comprise entre 500 ppm et 1000 ppm (incertitude de mesure de 50%). La concentration en oxygène atomique apparaît quasi-proportionnelle à la tension appliquée dans la configuration D-DBD (figure 8.4.2.a) tandis qu'elle atteint un seuil de saturation au delà d'une amplitude d'impulsion inter-électrodes de 6 kV dans la configuration S-DBD (figure 8.4.2.b). Il est intéressant de constater que l'augmentation du flux d'argon dans le dispositif S-DBD entraîne une augmentation significative de la concentration en oxygène atomique (de 400 ppm pour 1 l/min à 800 ppm pour 3 l/min) alors que le dispositif D-DBD une saturation est observée au delà d'un flux d'argon de 2 l/min.

L'augmentation de la production d'oxygène atomique avec l'augmentation de l'amplitude

de l'impulsion de tension inter-électrodes est certainement causée par l'augmentation de l'énergie des électrons conduisant à une meilleure efficacité de dissociation des molécules de dioxygène. Cette dépendance entre la production d'oxygène atomique et la tension inter-électrodes a déjà été observée par Hong *et al* [238] qui ont déterminé des concentrations d'oxygène atomique comparables aux nôtres dans le plasma formé par leur dispositif de jet de plasma d'argon avec une configuration DBD.

L'augmentation de la concentration d'oxygène atomique avec l'augmentation du débit d'argon est probablement due au fait qu'une proportion importante de l'oxygène atomique du jet de plasma provient des impuretés du gaz plasmagène utilisé. Le phénomène de saturation de la concentration d'oxygène atomique dans la configuration D-DBD au delà d'un débit de 2 l/min d'argon est cohérent avec l'apparition de turbulences au niveau de la plume plasma. L'apparition de ces turbulences sera discutée plus en détail lors de l'analyse de la longueur du jet à la section 8.5.

La figure 8.4.3 représente l'évolution de la concentration d'oxygène atomique dans l'axe du jet de plasma D-DBD après la sortie du tube de quartz (la distribution en oxygène atomique dans l'axe du jet de plasma est semblable quelque soit la configuration DBD choisie). Ces résultats sont comparés à la production d'oxygène atomique d'un jet de plasma Surfatron micro-onde fonctionnant avec de l'argon également. Ce jet de plasma micro-onde a été utilisé dans une étude précédente sur des bactéries *E.coli* pour mettre en évidence l'effet bactéricide des jets de plasma à travers d'une part la génération d'UV-C et d'espèces réactives oxygénées notamment le peroxyde d'hydrogène [10]. Pour les deux jets (DBD et MW), la concentration en oxygène atomique décroît le long de la plume plasma à mesure que le jet pénètre dans l'air ambiant.

On constate sur la figure 8.4.3 la forte propension du jet D-DBD à produire de l'oxygène atomique comparée au jet micro-onde avec un facteur de production 10 fois supérieur à la sortie du tube de quartz. On peut donc envisager que l'action des espèces oxydantes lors des traitements plasma effectués à partir du jet DBD développé sera plus importante qu'avec le jet Surfatron, plus particulièrement si les traitements se font à courte distance de la sortie du jet dans l'air.

8.4.2.3 Irradiance UV-C

Le rayonnement UV-C est extrêmement important dans le domaine biomédical puisque cette plage du spectre électromagnétique est particulièrement nocive pour les bactéries et les cellules vivantes en général [240]. C'est la raison pour laquelle il est important de quantifier l'irradiance UV-C produite par le jet DBD argon. La photodiode ainsi que son dispositif de conditionnement utilisés pour mesurer l'irradiance UV-C ont été présentés dans le chapitre 5. Le rayonnement UV-C a été mesurée en face du jet d'argon à différentes distances. Ceci afin

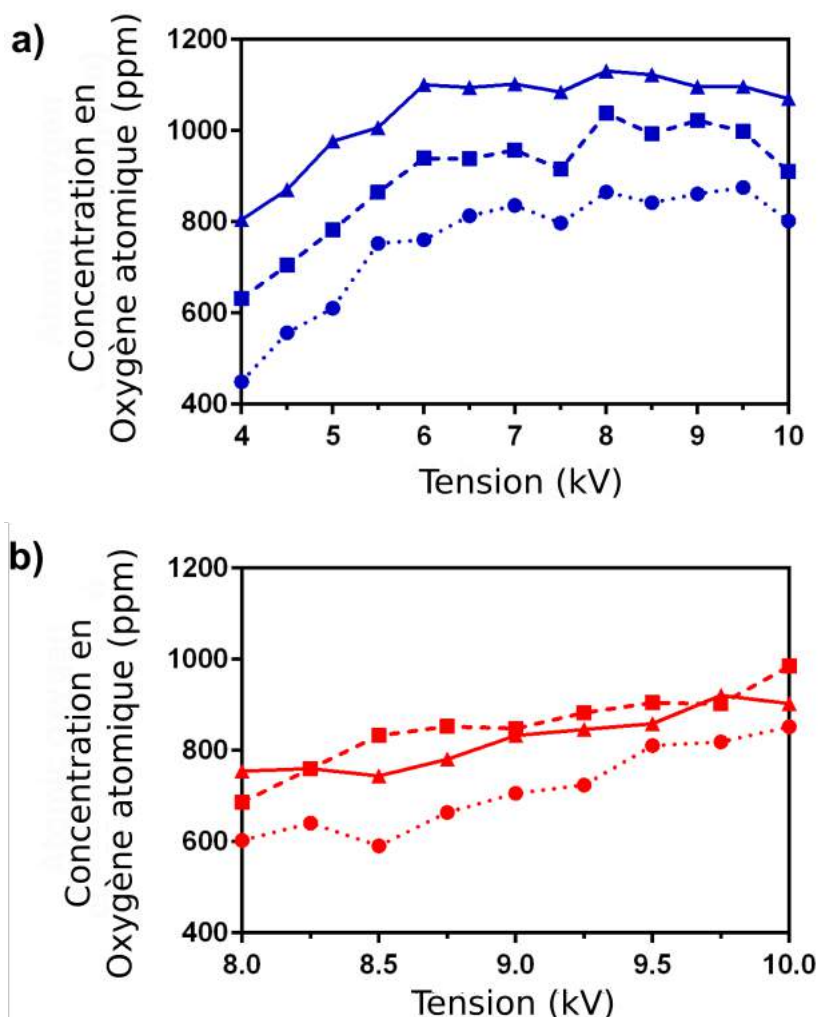


FIGURE 8.4.2 – Concentration d’oxygène atomique en fonction de la tension inter-électrode et pour des débits d’argon de 1 l/min (●), 2 l/min (■) et 3 l/min (▲). Mesures effectuées à 0.1 cm de la sortie du tube de quartz en configuration S-DBD (a) et D-DBD (b). Conditions expérimentales : durée de l’impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69 kHz.

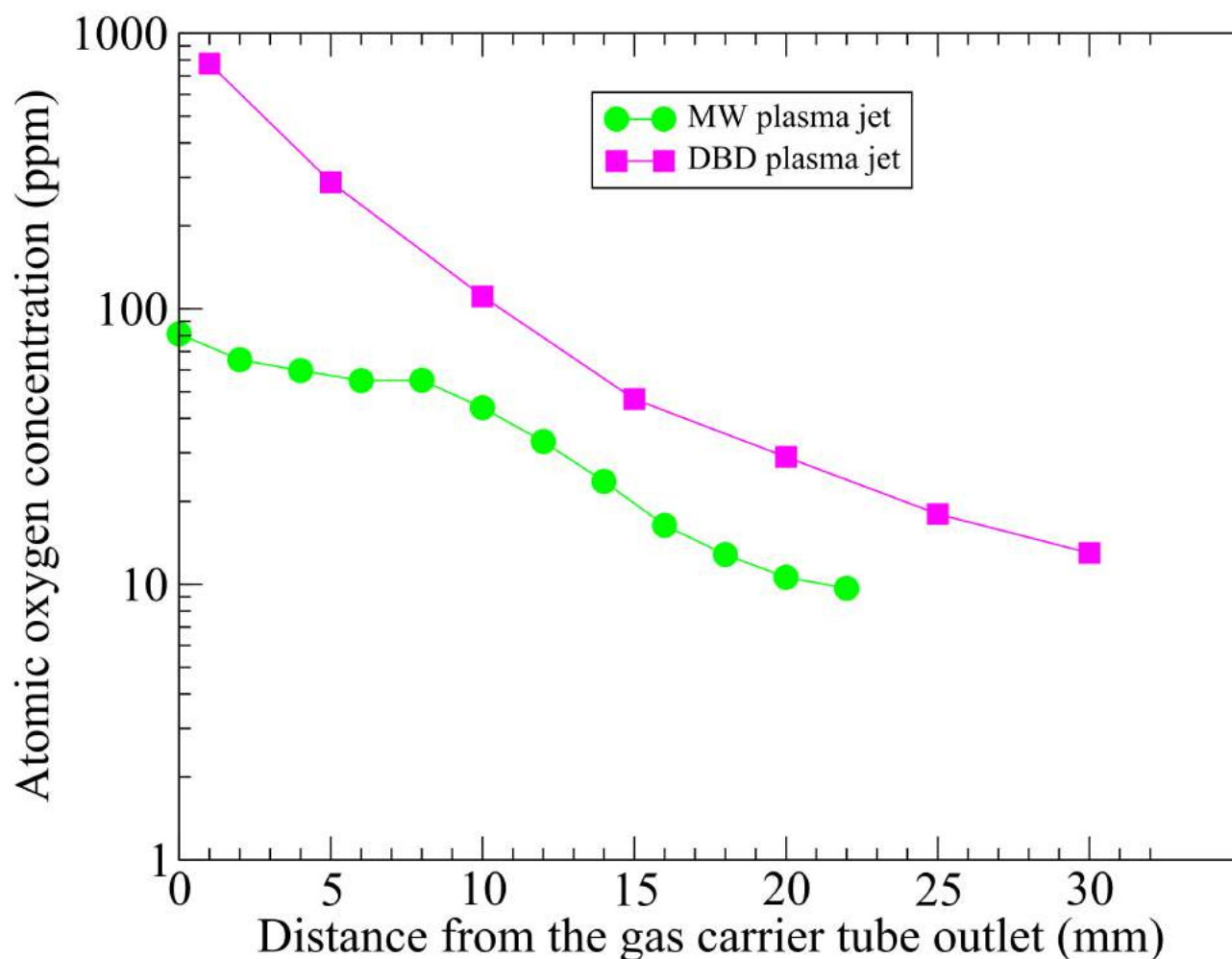


FIGURE 8.4.3 – Concentration en oxygène atomique dans l'axe du jet plasma D-DBD en fonction de la distance par rapport à la sortie du tube de quartz en comparaison avec un jet Surfatron micro-onde . Conditions expérimentales du jet Surfatron (MW) : puissance micro-onde 40W, flux d'argon 1 l/min, flux d'Air comprimé pour le refroidissement 22 l/min. Conditions expérimentales du jet plasma D-DBD : amplitude de la tension inter-électrode de 10 kV, durée de l'impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69 kHz, flux d'argon de 2 l/min.

d'évaluer l'irradiance UV-C reçue par un support biologique exposé au jet. Dans les deux configuration DBD utilisées l'irradiance UV-C mesurée est identique, c'est pourquoi seules les mesures obtenues dans la configuration D-DBD sont présentées. D'autre part, comme pour l'oxygène atomique, la comparaison du jet DBD avec le jet Surfatron nous a paru judicieuse, le rayonnement UV-C produit par ce dernier ayant été identifié comme étant la principale cause d'inactivation de bactéries planctoniques [10].

Les mesures de l'irradiance UV-C produite par les deux dispositifs plasma (D-DBD et Surfatron MW) en face du jet sont présentées figure 8.4.4. On constate que la production de rayonnement UV-C par le jet plasma D-DBD est environ deux fois moins intense que celle du jet Surfatron micro-onde dans les conditions expérimentales testées². Pour un traitement direct de seulement quelques minutes le niveau de l'irradiance produite par le jet D-DBD reste cependant supérieur aux valeurs d'irradiances nécessaires pour obtenir des effets bactéricides significatifs [145, 144, 241]. La prise en compte de ces radiations dans l'analyse de l'action du jet lors d'un traitement plasma est donc extrêmement importante. Pour le cas particulier des traitements indirects de liquides, le rayonnement UV-C peut induire ou favoriser certaines réactions chimiques influençant ainsi la production des espèces réactives dans le PAM lors de l'exposition au jet de plasma. Les UV-C peuvent également interagir avec des éléments présents naturellement dans les milieux de culture cellulaire tels que les acides aminés ce qui peut entraîner des effets à long terme sur des cellules cancéreuses.

8.5 Longueur du jet de plasma et vitesse de la balle plasma

La longueur du jet de plasma a été étudiée avec une caméra haute vitesse en fonction de la configuration DBD du jet, de l'amplitude et de la durée des impulsions de tension ainsi que du débit d'argon. L'analyse des images a été effectuée selon la méthode détaillée dans le chapitre 5. Les images ainsi obtenues sont compilées et regroupées dans la figure 8.5.1. Cette imagerie rapide révèle le comportement classique des jets de plasma DBD pulsés qui consistent en une succession de balles plasma générées lors des fronts montants et descendants de l'impulsion de tension inter-électrodes.

Des données de la figure 8.5.1 on identifie clairement deux différences entre les jets de plasma produits dans les configurations S-DBD et D-DBD. La première concerne la longueur du jet de plasma. En effet, si l'on observe la balle plasma générée sur le front montant de la tension, elle se déplace, dans nos conditions expérimentales, jusqu'à une distance de 3.5 cm après la sortie du tube de quartz dans la configuration S-DBD alors qu'elle atteint environ 5.5 cm au maximum dans la configuration D-DBD. La seconde différence concerne la vitesse

2. Il est possible d'augmenter significativement la puissance MW du Surfatron pour produire davantage de radiations mais cela augmente également la température du jet.

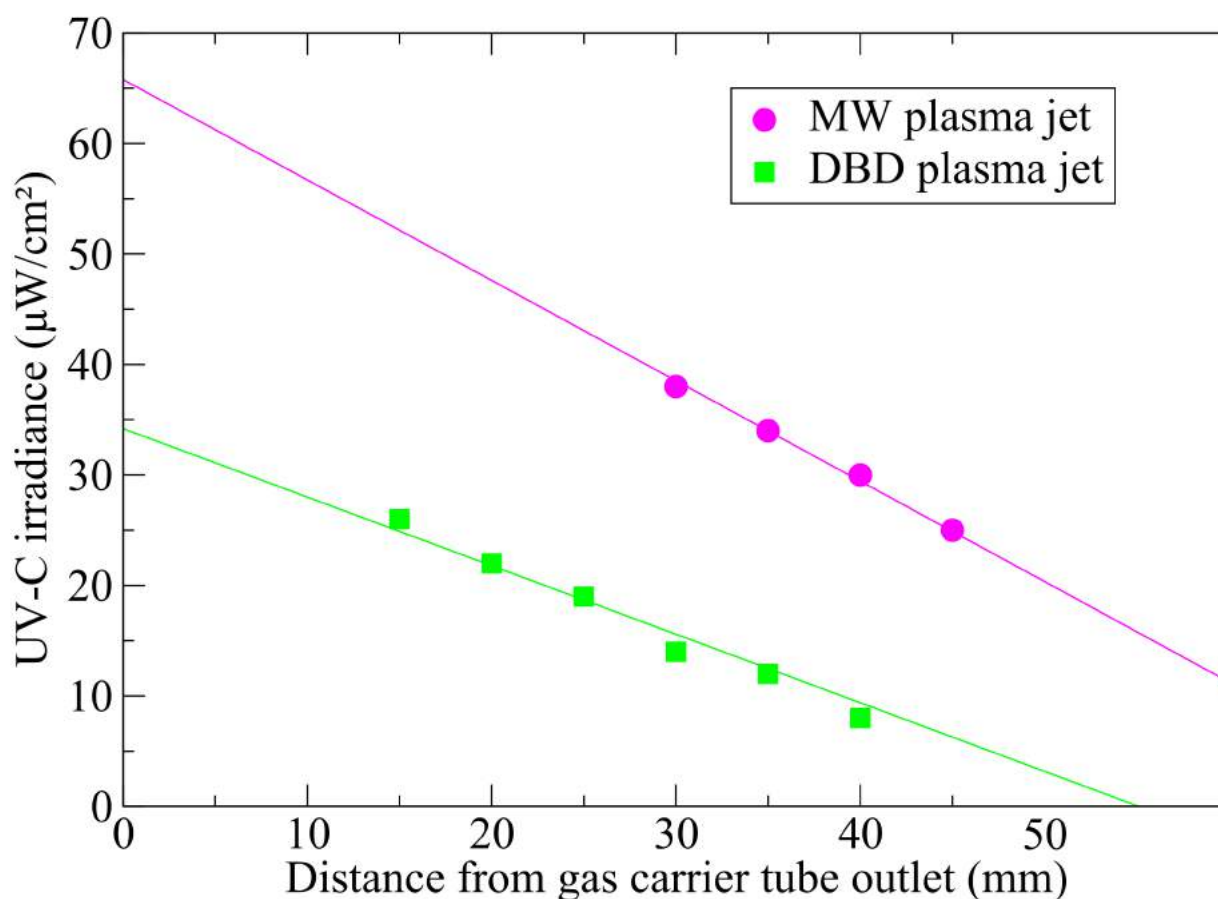


FIGURE 8.4.4 – Évolution de l'irradiance UV-C en face du jet D-DBD à différentes distances de la sortie du tube de quartz en comparaison avec un jet Surfatron micro-onde. Conditions expérimentales du dispositif Surfatron : puissance micro-onde 40W, débit d'argon 1 l/min, débit d'air comprimé pour le refroidissement 22 l/min. Conditions expérimentales du dispositif D-DBD : amplitude des impulsions de tension 10 kV, durée d'une l'impulsion 1 μs , fréquence de répétition 9.69 kHz, flux d'argon 2 l/min.

de propagation de cette balle plasma dans l'air ainsi que dans le tube de quartz. Dans les conditions expérimentales similaires décrites à la figure 8.5.1 et alors que la distance séparant la zone de production du plasma et la sortie du tube en quartz est identique dans les deux configurations, la balle à besoin de 235 ± 15 ns pour émerger dans l'air en configuration S-DBD alors qu'elle a besoin que de 315 ± 10 ns pour parcourir le même chemin en configuration D-DBD. La vitesse de la balle correspondante, mesurée 2 mm en aval du tube de quartz, est de 3.35×10^5 m/s contre 1.02×10^5 m/s respectivement pour les configurations S-DBD et D-DBD. La balle plasma est donc plus lente mais se propage plus loin dans la configuration D-DBD que dans la configuration S-DBD pour la même tension inter-électrodes et le même débit de gaz.

Aux regards des conclusions de Jomaa [242], la longueur du plasma est principalement dépendante de la dilution du gaz porteur dans l'air ambiant. Plus précisément, la dilution de l'argon dans l'air ambiant va augmenter les processus inélastiques avec les composés de l'air ce qui diminue progressivement l'énergie des électrons à mesure que le front d'ionisation progresse. Il en résulte une diminution de la longueur du jet de plasma. C'est pourquoi l'augmentation du flux de gaz porteur va diminuer la dilution du gaz plasmagène dans l'air ambiant (tant qu'il ne se produit pas de turbulences) et permettre au jet de plasma d'être plus long. Si on tient compte de la réduction de la section transversale du gap inter-électrode due au second diélectrique dans la configuration D-DBD, on estime que la vitesse du flux d'argon dans le tube est 1.6 fois plus élevée dans cette configuration que dans la configuration S-DBD. Il est probable que ce soit la raison pour laquelle la longueur apparente du jet est plus importante en configuration D-DBD.

La vitesse de propagation de la balle plasma est quant à elle majoritairement gouvernée par le champ électrique. D'après nos simulations de champ électrique, nous avons constaté la présence locale d'un champ électrique particulièrement important dû à l'effet de pointe au bout de électrode interne du dispositif. En configuration S-DBD, ce champ électrique est directement en contact avec l'argon alors qu'il est dans le quartz en configuration D-DBD. Nous pensons que cette différence est responsable de la vitesse de propagation plus rapide dans la configuration S-DBD.

Comme on peut l'observer sur la figure 8.5.2, la longueur du jet plasma D-DBD est proportionnelle au flux d'argon jusqu'à une valeur de 2.25 l/min. Pour des valeurs plus élevées de flux, la tendance est inversée probablement due à l'apparition de turbulences en sortie de jet qui vont favoriser la dilution de l'argon dans l'air ambiant. On observe d'ailleurs l'élargissement du jet et une diminution de la longueur de ce dernier ce qui semble étayer cette hypothèse. La présence de ces turbulences permet également de donner une explication à la saturation en oxygène atomique observée dans le jet D-DBD lorsque le flux de gaz augmente de 2 à 3 l/min. La figure 8.5.3 regroupe ces informations pour différents niveaux de tensions appliquées dans les deux configurations DBD.

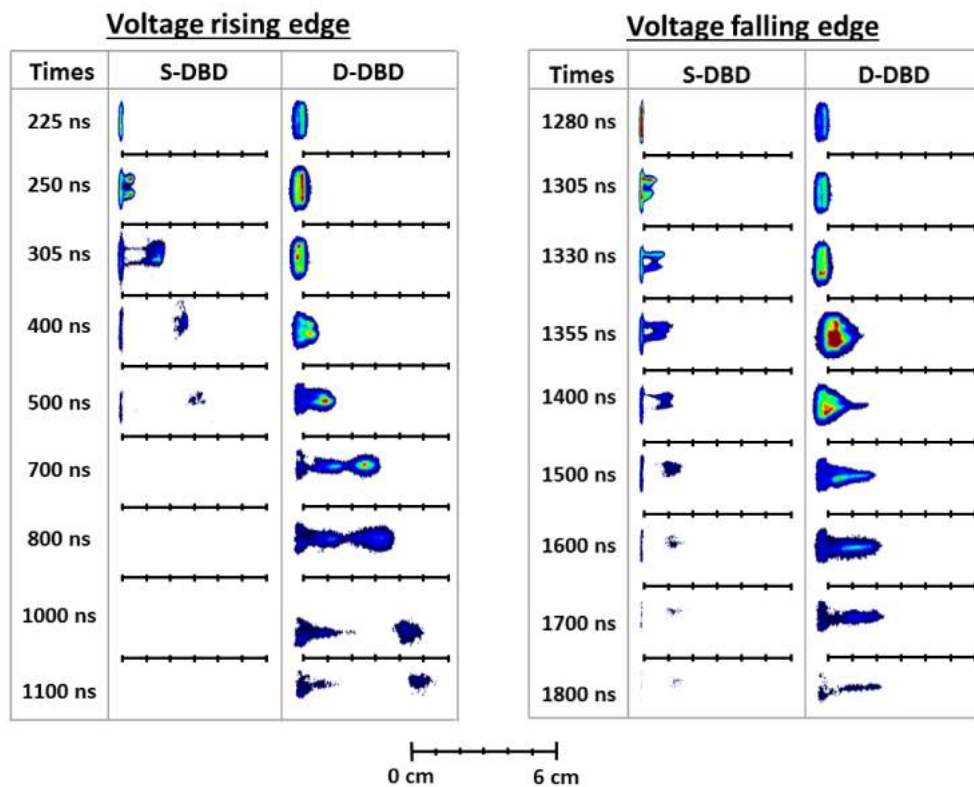


FIGURE 8.5.1 – Développement du jet plasma DBD après la sortie du tube de quartz. La référence de temps ($t=0$) correspond au front positif de l'impulsion de tension. Conditions expérimentales : tension appliquée : 10kV, durée de l'impulsion : 1 μ s ; fréquence de répétition : 9.69 kHz, Débit d'argon : 2.25 l/min.

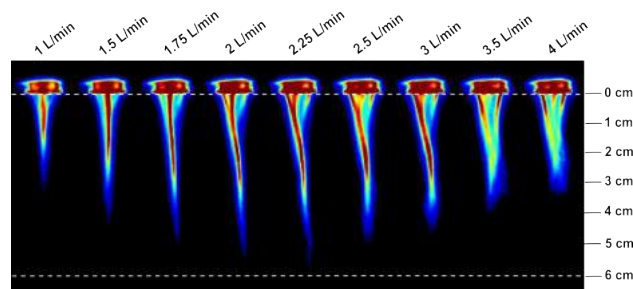


FIGURE 8.5.2 – Photographies du jet de plasma dans la configuration D-DBD pour différents débits d'argon. Conditions expérimentales : Amplitude des impulsion de tension de 10 kV, durée de l'impulsion 1 μ s, fréquence de répétition 9.69 kHz.

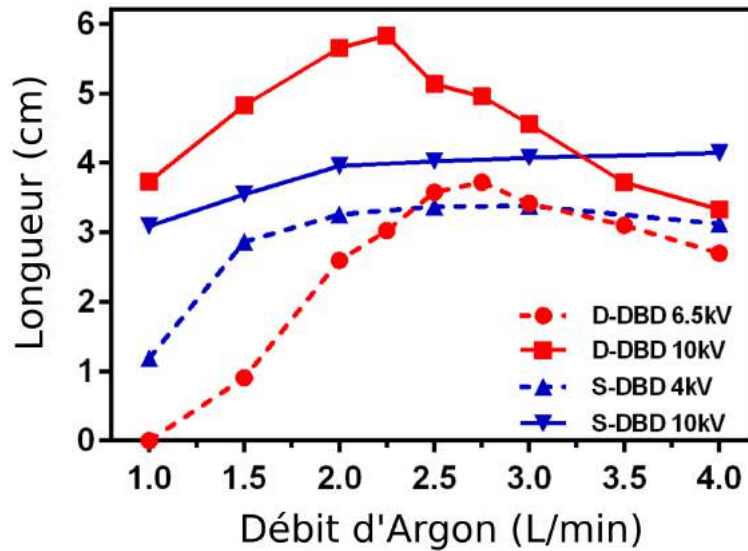


FIGURE 8.5.3 – Longueur de la plume plasma dans les deux configurations du jet de plasma en fonction du débit de gaz porteur et de la tension appliquée aux électrodes. Conditions expérimentales : durée de l'impulsion $1\mu\text{s}$, fréquence de répétition 9.69 kHz.

Comme nous avons observé l'influence notable de la durée d'impulsion sur les caractéristiques électriques et physiques du plasma dans la configuration D-DBD, une étude similaire a été réalisée sur la longueur et la vitesse de la balle plasma à la sortie du tube de quartz. Ces données sont synthétisées dans le tableau 8.6. La configuration D-DBD est plus sensible à la durée du pulse de tension que la configuration S-DBD pour laquelle longueur et vitesse sont quasiment indépendantes de la durée d'impulsion. Les informations issues de la caméra rapide (figure 8.5.1) montrent que la balle de plasma générée lors du front de montée positif de la tension arrive à la sortie du tube de quartz au bout de 230 ± 15 ns dans le cas de la configuration S-DBD et 310 ± 10 ns pour la configuration D-DBD. Par conséquent, pour de faibles durées d'impulsion, la propagation de la balle plasma générée lors du front positif de l'impulsion de tension est nécessairement perturbée par la proximité du champ électrique qui va donner naissance à la seconde décharge plasma suite au front de tension descendant. Dans ce cas la modification du champ électrique entre les électrodes modifie le déplacement de la balle plasma dans la configuration D-DBD ce qui se traduit par une perte de vitesse du front d'ionisation et une longueur de la plume plasma réduite.

TABLE 8.6 – Évolution de la longueur et de la vitesse de propagation de la balle plasma en fonction de la durée d'impulsion de tension. Conditions expérimentales : amplitude des impulsions de tension : 10kV, flux d'argon : 2 l/min, fréquence de répétition : 9.69 kHz.

Durée d'impulsion (μ s)	Longueur de la plume plasma (cm)		Vitesse ($\times 10^5$ m/s)	
	S-DBD	D-DBD	S-DBD	D-DBD
0.25	3.29	2.34	3.51	0.5
1	3.37	5.67	3.35	1.02

8.6 Traitement des sphéroïdes HCT 116

Après cette série d'analyses, la configuration D-DBD est privilégiée à la configuration S-DBD pour les applications potentielles du dispositif en raison du risque de formation d'un arc électrique en S-DBD. Le dispositif D-DBD a été utilisé pour le traitement des sphéroïdes HCT 116 avec les paramètres suivantes :

- Débit d'argon de 3 l/min ;
- Tension inter-électrodes de 10 kV ;
- Durée des impulsions de tension de 1 μ s ;
- Fréquence de répétition de 9.69 kHz ;
- Distance de traitement *in vitro* de 3 cm.

Ces paramètres correspondent à ceux utilisés lors des traitements indirects *in vitro* de tumeurs avec le dispositif DBD hélium (voir chapitre 6). Les résultats obtenus précédemment avec le dispositif DBD hélium constitueront donc une base de comparaison pour évaluer l'efficacité du jet d'argon.

Nous avons donc effectué des traitements indirects *in vitro* de tumeurs du colon HCT116 avec le dispositif D-DBD argon dans les mêmes conditions que lors des traitements avec le dispositif DBD hélium hormis la distance de traitement qui est plus importante dans le cas du jet D-DBD argon (3 cm contre 2 cm) ce qui devrait pénaliser ce dernier en terme d'efficacité car les concentrations d'espèces actives et l'irradiance UV-C sont plus faibles à 3 cm de la sortie du tube en quartz qu'à 2 cm.

Dans un premier temps, nous avons comparé le nombre de cellules positives aux dommages à l'ADN 4 h après le transfert des micro tumeurs dans le milieu activé par plasma³. Comme l'indique le tableau 8.7, le taux de dommages à l'ADN pour un traitement par jet de plasma DBD argon est de l'ordre de 51.94 % pour une durée d'activation du liquide de 120 s. Pour une même durée d'activation du liquide avec le plasma DBD hélium, le taux de cellules positives aux dommages à l'ADN était significativement inférieur (29.96 %). On remarque qu'il faut une durée d'activation du liquide avec le jet DBD hélium deux fois plus longue (240 s contre 120 s) qu'avec le jet D-DBD argon pour produire la même proportion de cellules dont l'ADN est endommagé.

3. Les tumeurs ont été immergées dans le liquide activé par plasma 15 min après l'activation

TABLE 8.7 – Proportion de cellules positives aux dommages à l'ADN 4h après activation du liquide avec les dispositifs plasma utilisés (Les tumeurs ont été immergées dans le liquide 15 min après l'activation plasma de ce dernier). Conditions expérimentales : Amplitude des impulsions de tension de 10 kV, durée d'une impulsion de 1 μ s, fréquence de répétition de 9.69 kHz, flux d'argon de 3 l/min, distance de traitement de 2 cm pour le jet DBD hélium et 3 cm pour le jet D-DBD argon.

	DBD hélium	DBD hélium	D-DBD argon
Durée d'activation du liquide (s)	120	240	120
Cellules avec dommage à l'ADN (%)	29.96 ± 5.08	49.50 ± 4.69	51.94 ± 4.81

Dans un second temps nous avons cherché à étudier la réaction à long terme des micro tumeurs après traitements. Pour cela, le volume des micro tumeurs a été mesuré quotidiennement pendant les neuf jours suivants le traitement puis normalisé par rapport au volume des sphéroïdes non traités (voir figure 8.6.1). Comme pour le taux de cellules positives aux dommages à l'ADN, la courbe des volumes normalisés pour une durée d'activation du liquide de 120 s avec jet de plasma D-DBD argon est sensiblement identique à celle obtenue après une durée d'activation de liquide de 240 s avec le jet DBD hélium.

L'inhibition de croissance ayant la même allure avec les deux dispositifs plasma, nous faisons l'hypothèse que les mécanismes d'altération des micro-tumeurs sont identiques. Il est par conséquent très probable que la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le liquide activé par plasma soit plus importante pour une activation du liquide avec le jet D-DBD argon qu'avec le jet DBD hélium. Pour confirmer cette hypothèse, les analyses chimiques effectuées sur le jet de plasma DBD hélium devront également être réalisées sur le jet de plasma DBD argon.

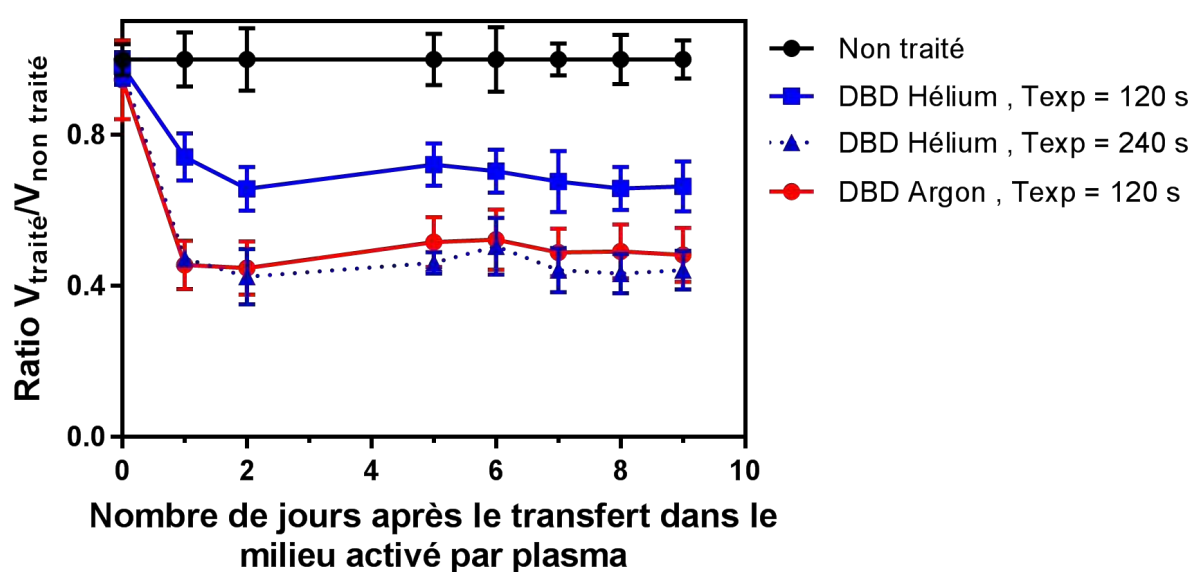


FIGURE 8.6.1 – Croissance relative des sphéroïdes après activation plasma du PAM avec le jet de plasma DBD hélium et le jet de plasma D-DBD argon ($T_{exp} = 120$ s et 240 s, $T_{trans} = 15$ min, $T_{stockage} = +37$ °C). Les sphéroïdes sont traités à $J=0$ et observés pendant les 9 jours suivants. Les données sont exprimées comme la moyenne $\pm$ écart-type évalués à partir de 4 expériences indépendantes.

Conclusions et perspectives

Mes travaux de recherche ont été consacrés à la compréhension mécanistique des traitements par plasma froid de cellules cancéreuses colorectales. Plus précisément, cette thèse s'est intéressée à l'activation de liquide par exposition aux jets de plasma froid DBD pour le traitement de tumeurs HCT 116 du cancer colorectal.

Les expérimentations décrites dans ce mémoire ont montré le potentiel génotoxique et citotoxique des traitements indirects par plasma froid à travers un retard de croissance tumorale. Ce retard de croissance est constituée de deux phases distinctes. La première consiste en un détachement des cellules périphériques de la micro tumeur qui intervient seulement quelques heures après le transfert des micro tumeurs dans les liquides activés par plasma. La seconde phase est une vitesse de prolifération réduite conduisant à un retard de croissance constant pendant au moins 9 jours des micro tumeurs suite à un traitement indirect par jet de plasma froid.

Le détachement des cellules périphériques est induit par la formation du radical hydroxyle à l'intérieur des cellules à partir du peroxyde d'hydrogène contenu dans le liquide activé par plasma. La réaction de Fenton permettant le relargage du radical hydroxyle dans le milieu intracellulaire conduit probablement à des réactions entre le radical et le contenu intracellulaire et plus particulièrement l'ADN. Les dommages à l'ADN ainsi générés peuvent dépasser la capacité des cellules à se réparer déclenchant alors une mort par apoptose des cellules et un détachement cellulaire du reste de la tumeur. Ce taux de dommages à l'ADN peut accroître si on augmente le temps d'exposition du liquide au jet de plasma. Il est important de souligner que le stockage du PAM à une température idéale pour la conservation du peroxyde d'hydrogène dans le liquide permet de préserver ses propriétés génotoxiques.

La vitesse de prolifération réduite suite au traitement a été identifiée comme imputable à des espèces générées dans le liquide suite à l'exposition au plasma. En effet, lorsque le liquide activé par plasma est changé par du milieu non exposé après le traitement il a été observé une reprise de croissance importante. L'activation avec le jet de plasma génère un nombre important de radicaux dans les liquides qui vont réagir avec les composants du liquides et plus particulièrement tous les éléments essentiels à la croissance cellulaire comme les acides aminés et les facteurs de croissances. Ces réactions vont modifier les éléments indispensables à la croissance cellulaire et donc induire à long terme une vitesse de prolifération réduite. De plus, lors de l'activation du liquide, le jet va induire la formation de nitrites et nitrates ayant

un rôle dépendant de leur concentration. En effet, il a été démontré que, pour de faibles concentrations, les nitrites et nitrates ont un effet pro-prolifératif alors qu'une concentration élevée de ces derniers est au contraire anti-proliférative.

Il a également été démontré que les jets de plasma présentent une sélectivité lors du traitement du cancer avec une attaque préférentiellement ciblée sur les cellules cancéreuses et non sur les cellules saines. Cette observation a été faite lors du traitement de micro tumeurs réalisées à partir de cellules de fibroblastes. L'hypothèse quant à cette sélectivité serait liée un niveau de peroxyde d'hydrogène plus élevé dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines combiné à des moyens de défenses limités. Pour valider les hypothèses concernant la sélectivité du plasma, il serait judicieux d'étudier les sensibilités au peroxyde d'hydrogène de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et saines.

En modulant le temps de contact entre les liquides activés par plasma et les micro tumeurs nous avons pu étudier les effets du temps de contact court entre le PAM et les sphéroïdes. Dans ces expérimentations nous avons mis en contact les micro tumeurs et les liquides activés par plasma seulement 10 minutes pour recréer la diffusion dans le corps suite à l'injection de liquides activés dans une tumeur. Contrairement au temps de contact dit long aucun détachement cellulaire n'est observé lors de ces expériences. La réponse des micro tumeurs se compose d'une première phase pendant laquelle la vitesse de prolifération des cellules est réduite pour réparer les dommages à l'ADN induits par le peroxyde d'hydrogène lors du traitement. Suite aux réparations, une reprise de croissance est observée 6 jours après traitement conduisant à une diminution de l'efficacité du traitement à long terme. La différence de comportement lors des traitements étant imposée par le nombre de dommages à l'ADN observés. Dans le cas de contact court entre les micro tumeurs et les liquides activés par plasma, les dommages à l'ADN sont relativement peu importants et peuvent donc être réparés. De plus, lorsque la phase de réparation est terminée les micro tumeurs se situent dans un milieu de culture contenant tous les facteurs de croissance nécessaires à une reprise de croissance importante.

À partir de l'ensemble de ces observations nous avons réalisé une série de manipulations sur le traitement de cellules cancéreuses du cancer colorectal sur modèle murin *in vivo* (dont le protocole est entièrement décrit dans la section 3.2.3 de ce mémoire). Le suivi de volume est effectué pendant 20 jours le volume de tumeurs (voir figure 8.0.1) répartis en 3 groupes : une série de souris avec des tumeurs non traitées, un groupe de souris avec tumeurs traité avec 50 μ L de milieu de culture DMEM non activé par plasma (injecté 3 fois par semaine) et un dernier groupe de souris avec tumeurs est traité à la même fréquence que le deuxième groupe avec 50 μ L de milieu de culture exposé 120s au plasma. Alors qu'aucune distinction entre les groupes n'est observée pendant les 13 premiers jours, on observe un détachement de la courbe des tumeurs traitées par le PAM. Ainsi au bout de 20 jours, les tumeurs traitées de manière indirecte par plasma présentent un volume inférieur de 242 mm^3 aux volumes des micro tumeurs non traitées par PAM (contrôle et tumeurs traitées par injection de milieu nutritif non exposé au plasma). Ces résultats correspondent à une inhibition de croissance

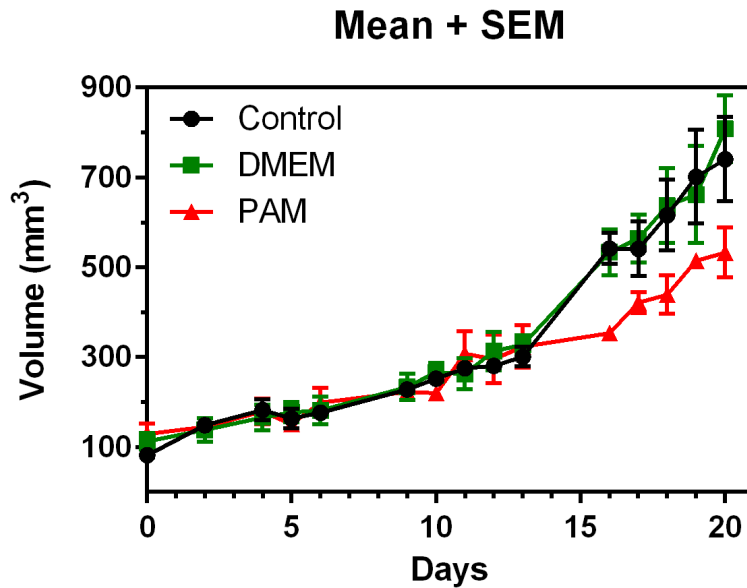


FIGURE 8.0.1 – Évolution du volume tumorale de xénogreffe hétérotopique de cellules colorectales sur modèle murin lors du traitement indirect par liquides activés par plasma froid DBD hélium. ○, tumeurs non traitées ; □, injection de 50μL de milieu DMEM non exposé au plasma 3 fois par semaine ; △, injection de 50μL de milieu DMEM exposé 120s au jet de plasma DBD hélium 3 fois par semaine.

20 jours après le début du traitement de 69%. Cette expérience montre effectivement les capacités du traitement indirect par plasma pour le traitement *in vivo* du cancer colorectal. Elle montre également que l'efficacité du traitement est liée à l'injection répétée du liquide activé par plasma avec un effet identifiable à long terme.

Les perspectives d'études *in vivo* concerne principalement le volume du liquide activé injecté lors du traitement et le temps d'exposition du liquide au jet de plasma. Concernant les études *in vitro* sur micro tumeurs ils est envisageable de diminuer le temps de contact entre les liquides activés par plasma et les micro tumeurs pour essayer de retrouver le comportement observé *in vivo*.

Le second objectif durant ces travaux de thèse a été de développer un dispositif plasma au sein du groupe PRHE. Après de nombreuses caractérisations physique du plasma, nous avons démontré que le dispositif plasma DBD argon était tout à fait adapté à des applications biomédicales. L'ajout d'une seconde barrière diélectrique dans ce dispositif ne modifie que très peu les propriétés du plasma tout en permettant une application directe lors d'expérimentations *in vivo* en évitant la formation d'arcs électriques. Des essais préliminaires sur des micro tumeurs du cancer colorectal ont montré une plus grande efficacité de ce dispositif plasma DBD argon vis à vis du jet DBD hélium utilisé dans le groupe de recherche pour les applications biomédicales. Par conséquent, ce nouveau dispositif DBD argon doit être étudié plus en détail sur modèle *in vitro* et *in vivo* pour mieux appréhender les nou-

velles capacités de ce dispositif. Dans les perspectives, il serait important d'analyser et de quantifier les différentes espèces radicalaires et non radicalaires produites dans le liquide suite à l'activation de liquides par le jet de plasma d'argon. Il faudrait également évaluer la production de peroxyde d'hydrogène dans les liquides activés par le jet DBD argon. Il est également envisageable de doser la production d'espèces oxydatives en phase gazeuse par le plasma au travers de techniques comme la LIF (Laser Induced Fluorescence) et de la comparer à l'efficacité biologique des différents jets disponibles au laboratoire LAPLACE.

En conclusion, les éléments apportés par ces travaux montrent que le traitement indirect par liquides activés par plasma est une solution prometteuse en tant qu'agent antitumoral et plus particulièrement dans le traitement du cancer colorectal. Le traitement indirect par plasma se décompose en plusieurs modes d'actions qu'il est possible d'optimiser en adaptant le protocole de traitement, le stockage des liquides activés par plasma, le dispositif plasma utilisé ainsi que alimentation électrique. Cette nouvelle stratégie thérapeutique a montré des résultats *in vivo* encourageants ainsi qu'une sélectivité lors des phases d'expérimentation. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le principe de sélectivité, particulièrement en mesurant la sensibilité de différentes lignées cellulaires cancéreuses et saines ainsi que leurs moyens de protection contre le stress oxydatif.

Annexes

Annexe A

Influence de la présence de sérum de veau dans le milieu activé par plasma sur les dommages à l'ADN

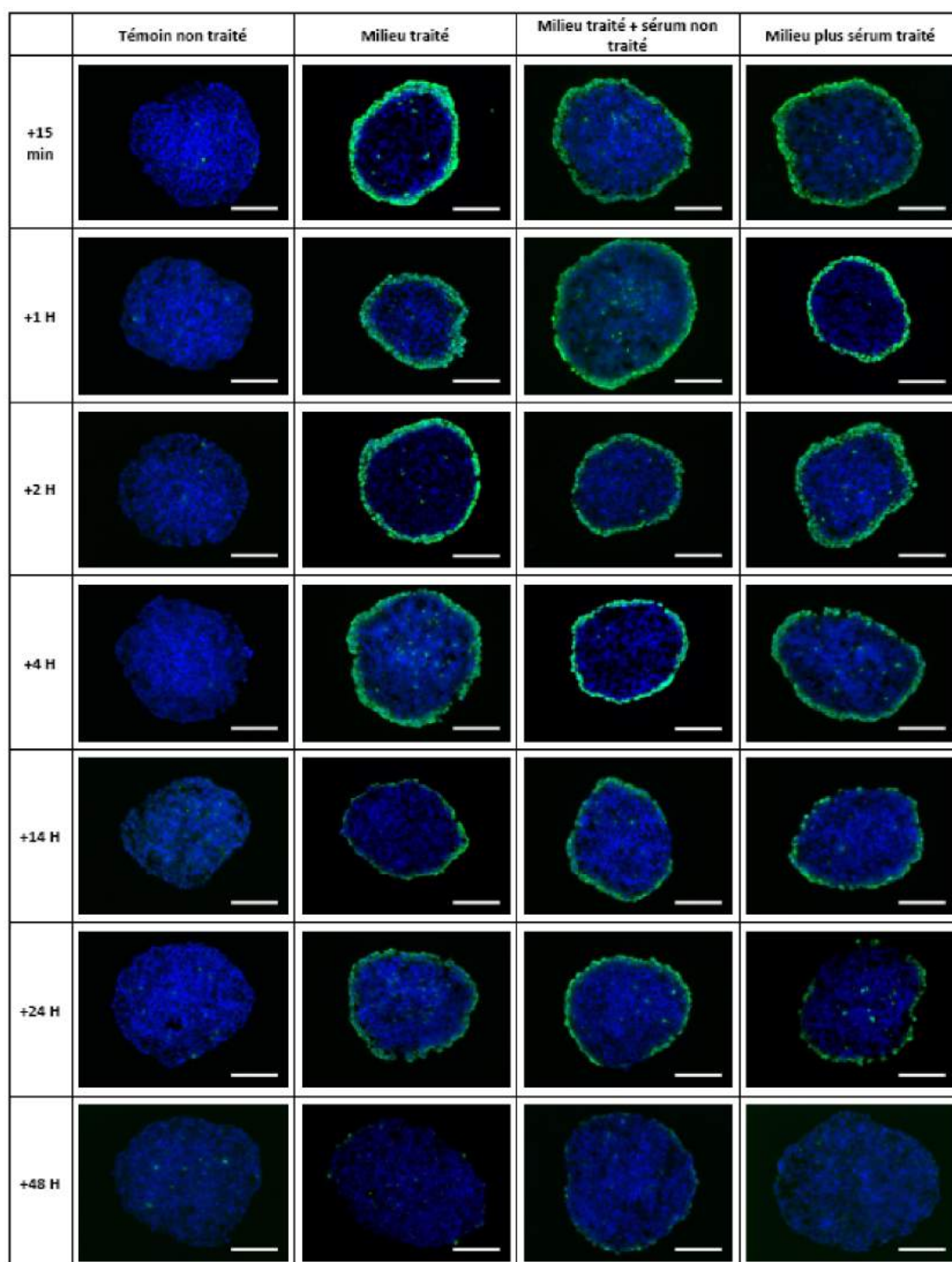


FIGURE A.0.1 – Influence du sérum de veau dans le milieu activé par plasma sur les dommages à l'ADN. Temps d'exposition de 120s et stockage à +37°C. Pas de variations significatives du taux de dommage à l'ADN en présence de sérum.

Annexe B

Protocole de quantification de l'adenosine triphosphate dans le sphéroïde et le surnageant

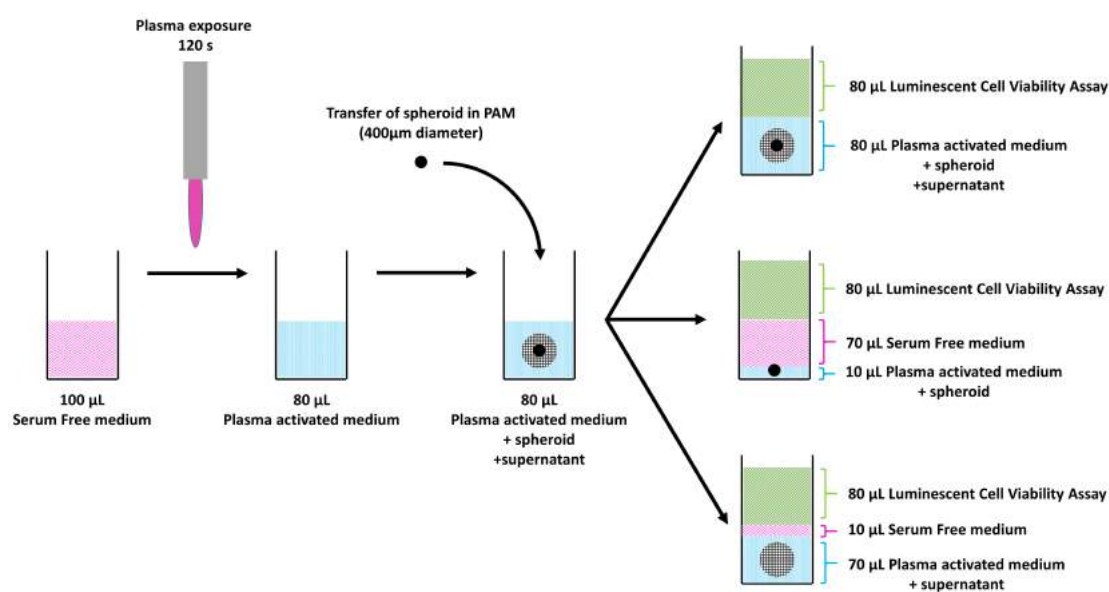


FIGURE B.0.1 – Protocole de quantification de l'adenosine triphosphate dans le sphéroïde et le surnageant.

Bibliographie

- [1] H. A. Coller, “The essence of quiescence,” *Science*, vol. 334, no. 6059, pp. 1074–1075, 2011.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer : The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646 – 674, 2011.
- [3] P. Pourquier, “Agents alkylants,” *Bulletin du Cancer*, vol. 98, no. 11, pp. 1237 – 1251, 2011.
- [4] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, “Photodynamic therapy of cancer : an update,” *CA : A cancer journal for clinicians*, vol. 61, no. 4, pp. 250–281, 2011.
- [5] M. Makeieff, J. Thariat, E. Reyt, and C. Righini, “Treatment of cervical paragangliomas,” *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, vol. 129, no. 6, pp. 308 – 314, 2012.
- [6] M. Yousfi, N. Merbahi, J. P. Sarrette, O. Eichwald, A. Ricard, J. P. Gardou, O. Ducasse, and M. Benhenni, “Non thermal plasma sources of production of active species for biomedical uses : Analyses, optimization and prospect,” in *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*, R. Fazel-Rezai, Ed. InTech, 2011.
- [7] P. G. Slade and E. D. Taylor, “Electrical breakdown in atmospheric air between closely spaced (0.2 μm -40 μm) electrical contacts,” in *Electrical Contacts, 2001. Proceedings of the Forty-Seventh IEEE Holm Conference on*, 2001, pp. 245–250.
- [8] K. H. Schoenbach, A. El-Habachi, W. Shi, and M. Ciocca, “High-pressure hollow cathode discharges,” *Plasma Sources Science and Technology*, vol. 6, no. 4, p. 468, 1997.
- [9] A. Fridman, A. Chirokov, and A. Gutsol, “Non-thermal atmospheric pressure discharges,” *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 38, no. 2, pp. R1–R24, jan 2005.
- [10] F. Judée, G. Wattieaux, N. Merbahi, M. Mansour, and M.-P. Castanié-Cornet, “The antibacterial activity of a microwave argon plasma jet at atmospheric pressure relies mainly on uv-c radiations,” *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 47, no. 40, p. 405201, 2014.

- [11] G. Wattieaux, M. Yousfi, and N. Merbahi, "Optical emission spectroscopy for quantification of ultraviolet radiations and biocide active species in microwave argon plasma jet at atmospheric pressure," *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy*, vol. 89, pp. 66 – 76, 2013.
- [12] S. Chandrasekaran, H. Deng, and Y. Fang, "Pten deletion potentiates invasion of colorectal cancer spheroidal cells through 3d matrigel," *Integr. Biol.*, vol. 7, pp. 324–334, 2015.
- [13] S. Kalghatgi, C. M. Kelly, E. Cerchar, B. Torabi, O. Alekseev, A. Fridman, G. Friedman, and J. Azizkhan-Clifford, "Effects of non-thermal plasma on mammalian cells," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, 2011.
- [14] I. N. du CAnceR, "Les cancers en france." Les données, 2014.
- [15] F. Binder-Foucard, A. Belot, P. Delafosse, L. Remontet, A. Woronoff, and N. Bossard, "Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en france entre 1980 et 2012," 2013.
- [16] I. curie, "Une personne sur deux sera atteinte d'un cancer au cours de sa vie. ensemble, prenons les cancers de vitesse," 2007.
- [17] I. national du cancer, "Plan cancer 2014-2019," 2015.
- [18] M. Tiainen, D. Pajalunga, F. Ferrantelli, S. Soddu, G. Salvatori, A. Sacchi, and M. Crescenzi, "Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined to g0 but can enter g1 upon growth factor stimulation," vol. 7, pp. 1039–1050, 1996.
- [19] S. J. Elledge, "Cell cycle checkpoints : Preventing an identity crisis," *Science*, vol. 274, no. 5293, pp. 1664–1672, dec 1996.
- [20] S. Giuriato and D. W. Felsher, "How cancers escape their oncogene habit," *Cell Cycle*, vol. 2, no. 4, pp. 328–331, jul 2003.
- [21] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, jan 2000.
- [22] A. J. Levine and M. Oren, "The first 30 years of p53 : growing ever more complex," *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, no. 10, pp. 749–758, oct 2009.
- [23] F. Toledo and G. M. Wahl, "Regulating the p53 pathway : In vitro hypotheses, in vivo veritas," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 12, pp. 909–923, 2006.
- [24] R. Baskar, J. Dai, N. Wenlong, R. Yeo, and K.-W. Yeohl, "Biological response of cancer cells to radiation treatment," *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 1, no. 24, 2014.
- [25] J. M. Lee and A. Bersteinl, "p53 mutations increase resistance to ionizing radiation," *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, vol. 90, no. 12, pp. 5742–5746, 1993.
- [26] Y. K. Jeong, M.-S. Kim, J. Y. Lee, E. H. Kim, and H. Hal, "Metformin radiosensitizes p53-deficient colorectal cancer cells through induction of g2/m arrest and inhibition of dna repair proteins," *PloS One*, vol. 10, no. 11, p. e0143596, 2015.

-
- [27] A. Petitjean, E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S. V. Tavtigian, P. Hainaut, and M. Olivier, "Impact of mutant p53 functional properties on tp53 mutation patterns and tumor phenotype : lessons from recent developments in the iarc tp53 database," *Human Mutation*, vol. 28, no. 6, pp. 620–629, 2007.
- [28] S. Tandon, C. Tudur-Smith, R. D. Riley, M. T. Boyd, and T. M. Jones, "A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 19, no. 2, pp. 574–587, 2013.
- [29] L. Rode, B. G. Nordestgaard, and S. E. Bojesen, "Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64637 individuals from the general population," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 107, no. 6, p. djv074, 2010.
- [30] M. A. Blasco, "Mice with bad ends : mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging," *EMBO Journal*, vol. 24, no. 6, pp. 1095–1103, 2005.
- [31] L. Hayflick, "Myth-busting about first mass-produced human cell line," *Nature*, vol. 464, no. 7285, pp. 30–30, 2010.
- [32] R. F. Newbold, "The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer," *Mutagenesis*, vol. 17, no. 6, pp. 539–550, 2002.
- [33] K. L. Rock and H. Kono, "The inflammatory response to cell death," *Annual Review of Pathology Mechanisms of Disease*, vol. 3, pp. 99–126, 2008.
- [34] M. Henriquez, R. Armisen, A. Stutzin, and A. F. Quest, "Cell death by necrosis, a regulated way to go," *Current Molecular Medicine*, vol. 8, no. 3, pp. 187–206, 2008.
- [35] P. Davidovich, C. J. Kearney, and S. J. Martin, "Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis," *Biological chemistry*, vol. 395, no. 10, pp. 1163–1171, 2014.
- [36] A. Efeyan, W. C. Comb, and D. M. Sabatini, "Nutrient-sensing mechanisms and pathways," *Nature*, vol. 517, no. 7534, pp. 302–310, 2015.
- [37] I. Vitale, L. Galluzzi, M. Castedo, and G. Kroemer, "Mitotic catastrophe : a mechanism for avoiding genomic instability," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 12, no. 6, pp. 385–392, 2011.
- [38] D. Maskey, S. Yousefi, I. Schmid, I. Zlobec, A. Perren, R. Friis, and H.-U. Simona, "Atg5 is induced by dna-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy," *Nature communications*, vol. 4, no. 2130, 2013.
- [39] S. Elmore, "Apoptosis : A review of programmed cell death," *Toxicologic Pathology*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [40] J. E. Chipuk, T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler, and D. R. Green, "Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis," *Science*, vol. 303, no. 5660, pp. 1010–1014, 2004.

- [41] J. Folkman, "Fundamental concepts of the angiogenic process," *Current molecular medicine*, vol. 3, no. 7, pp. 643–651, 2003.
- [42] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, and L. A. Kunz-Schughart, "Multicellular tumor spheroids : An underestimated tool is catching up again," *Journal of Biotechnology*, vol. 148, no. 1, pp. 3 – 15, 2010.
- [43] J. E. Talmadge and I. J. Fidler, "Aacr centennial series : the biology of cancer metastasis historical perspective," *Cancer Research*, vol. 70, no. 14, pp. 5649–5669, 2010.
- [44] A. Nordholm-Carstensen, P.-M. Krarup, L. N. Jorgensen, P. A. Wille-Jorgensen, and H. Harling, "Occurrence and survival of synchronous pulmonary metastases in colorectal cancer : A nationwide cohort study," *European Journal of Cancer*, vol. 50, no. 2, pp. 447 – 456, 2014.
- [45] P. Rich, "The molecular machinery of keilin's respiratory chain," *Biochim. Soc. Trans.*, vol. 31, no. 6, pp. 1095–1105, dec 2003.
- [46] V. Potter, "The biochemical approach to the cancer proble," vol. 17, no. 2, pp. 691–697, 1958.
- [47] M. G. V. Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the warburg effect : The metabolic requirements of cell proliferation," *Science*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, may 2009.
- [48] E. Conover, "Environment, more than genetics, shapes immune system," *Science*, jan 2015.
- [49] C. M. Vajdic and M. T. van Leeuwen, "Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation," *International Journal of Cancer*, vol. 125, no. 8, pp. 1747–1754, oct 2009.
- [50] C. M. Koebel, W. Vermi, J. B. Swann, N. Zerafa, S. J. Rodig, L. J. Old, M. J. Smyth, and R. D. Schreiber, "Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state," *Nature*, vol. 450, no. 7171, pp. 903–907, nov 2007.
- [51] M. D. Vesely, M. H. Kershaw, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, "Natural innate and adaptive immunity to cancer," *Annual Review of Immunology*, vol. 29, no. 1, pp. 235–271, apr 2011.
- [52] M. W. L. Teng, J. B. Swann, C. M. Koebel, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, "Immune-mediated dormancy : an equilibrium with cancer," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 84, no. 4, pp. 988–993, jun 2008.
- [53] R. Kim, M. Emi, and K. Tanabe, "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape," *Immunology*, vol. 121, no. 1, pp. 1–14, may 2007.
- [54] D.-J. Kim, Y.-K. Shim, J. Park, H.-J. Kim, and J.-G. Han, "Demonstration of organic volatile decomposition and bacterial sterilization by miniature dielectric barrier discharges on low-temperature cofired ceramic electrodes," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 55, no. 4, p. 040302, mar 2016.

- [55] F. Pagès, J. Galon, M.-C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautès-Fridman, and W.-H. Fridman, "Immune infiltration in human tumors : a prognostic factor that should not be ignored," *Oncogene*, vol. 29, no. 8, pp. 1093–1102, nov 2009.
- [56] B. H. Nelson, "The impact of t-cell immunity on ovarian cancer outcomes," *Immunol Rev*, vol. 222, no. 1, pp. 101–116, apr 2008.
- [57] D. C. Strauss and J. M. Thomas, "Transmission of donor melanoma by organ transplantation," *The Lancet Oncology*, vol. 11, no. 8, pp. 790–796, aug 2010.
- [58] Étienne Chatelut, "Pharmacology of platinum compounds : differences between the three molecules and factors of interpatient variability," *Bulletin du Cancer*, vol. 98, no. 11, pp. 1253 – 1261, 2011.
- [59] Z. H. Siddik, "Cisplatin : mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance," *Oncogene*, vol. 22, no. 47, pp. 7265–7279, 2003.
- [60] A. Lansiaux, "Antimetabolites," *Bulletin du Cancer*, vol. 98, no. 11, pp. 1263 – 1274, 2011.
- [61] C. Dumontet, "Antitubulin agents," *Bulletin du Cancer*, vol. 98, no. 11, pp. 1275 – 1285, 2011.
- [62] P. Pourquier and A. Lansiaux, "Molecular determinants of response to topoisomerase i inhibitors," *Bulletin du Cancer*, vol. 98, no. 11, pp. 1287 – 1298, 2011.
- [63] A. Lansiaux and P. Pourquier, "Molecular determinants of response to topoisomerase ii inhibitors," *Bulletin du Cancer*, vol. 98, no. 11, pp. 1299 – 1310, 2011.
- [64] P. Comella, R. Casaretti, C. Sandomenico, A. Avallone, and L. Franco, "Role of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer," *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol. 5, pp. 229–238, 2009.
- [65] T. Mazard, A. Causse, J. Simony, W. Leconet, N. Vezzio-Vie, A. Torro, M. Jarlier, A. Evrard, M. Del-Rio, E. Assenat, P. Martineau, M. Ychou, B. Robert, and C. Gonga, "Sorafenib overcomes irinotecan resistance in colorectal cancer by inhibiting the abcg2 drug-efflux pump," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 12, no. 10, pp. 2121–2134, 2013.
- [66] F. Maindrault-Goebel, C. Louvet, T. André, E. Carola, J. Lotz, J. Molitor, M. Garcia, V. Gilles-Amar, V. Izrael, M. Krulik, and A. de Gramont, "Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (folfox6)," *European Journal of Cancer*, vol. 35, no. 9, pp. 1338 – 1342, 1999.
- [67] E.-K. Lee, C. Revil, C. A. Ngoh, J. Lister, J.-M. Kwon, M.-H. Park, S.-J. Park, Y.-S. Park, S.-J. Shin, M.-A. Lee, N.-S. Lee, D.-Y. Zang, E.-J. Bae, and M.-J. Kang, "Clinical and cost effectiveness of bevacizumab + folfiri combination versus folfiri alone as first-line treatment of metastatic colorectal cancer in south korea," *Clinical Therapeutics*, vol. 34, no. 6, pp. 1408 – 1419, 2012.

- [68] C. Foote, "Detection and characterization of singlet oxygen," in *Reactive Oxygen Species in Chemistry, Biology, and Medicine*, A. Quintanilha, Ed. Springer US, 1988, pp. 107–116.
- [69] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbélik, J. Moan, and Q. Peng, "Photodynamic therapy," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, no. 12, pp. 889–905, 1998.
- [70] D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nature reviews cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 380–387, 2003.
- [71] M. Korbélik and G. Kros, "Cellular levels of photosensitisers in tumours : the role of proximity to the blood supply," *British journal of cancer*, vol. 70, no. 4, pp. 604–610, 1994.
- [72] D. E. Dolmans, A. Kadambi, J. S. Hill, C. A. Waters, B. C. Robinson, J. P. Walker, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Vascular accumulation of a novel photosensitizer, mv6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy," *Cancer research*, vol. 62, no. 7, pp. 2151–2156, 2002.
- [73] T. M. Busch, E. P. Wileyto, M. J. Emanuele, F. D. Piero, L. Marconato, E. Glatstein, and C. J. Koch, "Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen," *Cancer research*, vol. 62, no. 24, pp. 7273–7279, 2002.
- [74] M. Korbélik, G. Kros, J. Kros, and G. J. Dougherty, "The role of host lymphoid populations in the response of mouse emt6 tumor to photodynamic therapy," *Cancer research*, vol. 56, no. 24, pp. 5647–5652, 1996.
- [75] M. Korbélik and G. J. Dougherty, "Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors," *Cancer research*, vol. 59, no. 8, pp. 1941–1946, 1999.
- [76] C. A. Perez, J. M. Michalski, J. A. Purdy, T. H. Wasserman, K. Williams, and M. A. Lockett, "Three-dimensional conformal therapy or standard irradiation in localized carcinoma of prostate : preliminary results of a nonrandomized comparison," *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, vol. 47, no. 3, pp. 629 – 637, 2000.
- [77] P. C. Gerszten and W. C. Welch, "Cyberknife radiosurgery for metastatic spine tumors," *Neurosurgery Clinics of North America*, vol. 15, no. 4, pp. 491 – 501, 2004.
- [78] A. Fridman and L. A. Kennedy, *Plasma Physics and Engineering*. Informa UK Limited, 2003.
- [79] A. Fridman, *Plasma Chemistry*. Cambridge University Press (CUP), 2008.
- [80] S. Choi, P. Puligundla, and C. Mok, "Corona discharge plasma jet for inactivation of escherichia coli o157 :h7 and listeria monocytogenes on inoculated pork and its impact on meat quality attributes," *Annals of Microbiology*, vol. 66, no. 2, pp. 685–694, 2016.

-
- [81] M. Dors, E. Metel, J. Mizeraczyk, and E. Marotta, "Coli bacteria inactivation by pulsed corona discharge in water," *International Journal of Plasma Environment Science and Technology*, vol. 2, no. 1, pp. 34–37, 2008.
 - [82] D. Dobrynin, G. Friedman, A. Fridman, and A. Starikovskiy, "Inactivation of bacteria using dc corona discharge : Role of ions and humidity," *New journal of physics*, vol. 13, p. 103033, 2011.
 - [83] H. Zerrouki, "Mécanismes d'interaction entre les décharges à base d'azote et la matière vivante." Ph.D. dissertation, University Paul Sabatier - France, 2016.
 - [84] T. Kuwahara, T. Kuroki, K. Yoshida, N. Saeki, and M. Okubo, "Development of sterilization device using air nonthermal plasma jet induced by atmospheric pressure corona discharge," *Thin Solid Films*, vol. 523, pp. 2 – 5, 2012.
 - [85] F. Marchal, H. Robert, N. Merbahi, C. Fontagné-Faucher, M. Yousfi, C. E. Romain, O. Eichwald, C. Rondel, and B. Gabriel, "Inactivation of gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 45, no. 34, p. 345202, 2012.
 - [86] Z. Kovalova, K. Tarabova, K. Hensel, and Z. Machala, "Decontamination of streptococci biofilms and bacillus cereus spores on plastic surfaces with dc and pulsed corona discharges," *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, vol. 61, no. 2, p. 24306, 2013.
 - [87] Z. Kovalova, M. Leroy, M. J. Kirkpatrick, E. Odic, and Z. Machala, "Corona discharges with water electrospray for escherichia coli biofilm eradication on a surface," *Bioelectrochemistry*, vol. In Press, pp. –, 2016.
 - [88] X. Tan, S. Zhao, Q. Lei, X. Lu, G. He, and K. Ostrikov, "Single-cell-precision microplasma-induced cancer cell apoptosis," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, p. e101299, 2014.
 - [89] H. K. Schoenbach and K. Becker, "20 years of microplasma research : a status report," *The European Physical Journal D*, vol. 70, no. 2, pp. 1–22, 2016.
 - [90] G. Isbary, J. Körtzner, A. Mitra, Y.-F. Li, T. Shimizu, J. Schroeder, J. Schlegel, G. Morfill, W. Stolz, and J. Zimmermann, "Ex vivo human skin experiments for the evaluation of safety of new cold atmospheric plasma devices," *Clinical Plasma Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 36–44, jun 2013.
 - [91] J. F. Kolb, A. M. Mattson, C. M. Edelblute, X. Hao, M. A. Malik, and L. C. Heller, "Cold dc-operated air plasma jet for the inactivation of infectious microorganisms," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 40, no. 11, pp. 3007–3026, 2012.
 - [92] H. Feng, R. Wang, P. Sun, H. Wu, Q. Liu, J. Fang, W. Zhu, F. Li, and J. Zhang, "A study of eukaryotic response mechanisms to atmospheric pressure cold plasma by using saccharomyces cerevisiae single gene mutants," *Applied Physics Letters*, vol. 97, no. 13, p. 131501, 2010.

- [93] T. Maisch, T. Shimizu, Y.-F. Li, J. Heinlin, S. Karrer, G. Morfill, and J. L. Zimmermann, “Decolonisation of MRSA, s. aureus and e. coli by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, p. e34610, apr 2012.
- [94] P. Sun, J. Pan, Y. Tian, N. Bai, H. Wu, L. Wang, C. Yu, J. Zhang, W. Zhu, K. H. Becker, and J. Fang, “Tooth whitening with hydrogen peroxide assisted by a direct-current cold atmospheric-pressure air plasma microjet,” *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 38, no. 8, pp. 1892–1896, 2010.
- [95] J. Pan, P. Sun, Y. Tian, H. Zhou, H. Wu, N. Bai, F. Liu, W. Zhu, J. Zhang, K. H. Becker, and J. Fang, “A novel method of tooth whitening using cold plasma microjet driven by direct current in atmospheric-pressure air,” *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 38, no. 11, pp. 3143–3151, 2010.
- [96] H.-E. Wagner, R. Brandenburg, K. Kozlov, A. Sonnenfeld, P. Michel, and J. Behnke, “The barrier discharge : basic properties and applications to surface treatment,” *Vacuum*, vol. 71, no. 3, pp. 417 – 436, 2003.
- [97] P. Rajasekaran, P. Mertmann, N. Bibinov, D. Wandke, W. Viöl, and P. Awakowicz, “Filamentary and homogeneous modes of dielectric barrier discharge (DBD) in air : Investigation through plasma characterization and simulation of surface irradiation,” *Plasma Processes and Polymers*, vol. 7, no. 8, pp. 665–675, jul 2010.
- [98] P. Rajasekaran, “Atmospheric-pressure dielectric barrier discharge (dbd) in air : Plasma characterisation for skin therapy,” 2011.
- [99] W. Siemens, *Poggendorff’s ann phys chem*, vol. 102, p. 66, 1857.
- [100] M. Grabowski, M. Hołub, M. Balcerak, S. Kalisiak, and W. Dąbrowski, “Black pepper powder microbiological quality improvement using DBD systems in atmospheric pressure,” *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, vol. 71, no. 2, p. 20811, jul 2015.
- [101] D. Dobrin, M. Magureanu, N. B. Mandache, and M.-D. Ionita, “The effect of non-thermal plasma treatment on wheat germination and early growth,” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 29, pp. 255–260, may 2015.
- [102] G. Fridman, M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, H. Ayan, A. Fridman, A. Gutsol, and A. Brooks, “Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air,” *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, vol. 26, no. 4, pp. 425–442, jun 2006.
- [103] J. Heinlin, G. Morfill, M. Landthaler, W. Stolz, G. Isbary, J. L. Zimmermann, T. Shimizu, and S. Karrer, “Plasma medicine : possible applications in dermatology,” *JDDG : Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, vol. 8, no. 12, pp. 968–976, aug 2010.
- [104] D. Dobrynin, A. Wu, S. Kalghatgi, S. Park, N. Shainsky, K. Wasko, E. Dumani, R. Ownbey, S. Joshi, R. Sensenig, and A. D. Brooks, “Live pig skin tissue and wound toxicity of cold plasma treatment,” *Plasma Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 93–108, 2011.

-
- [105] M. Yousfi, O. Eichwald, N. Merbahi, and N. Jomaa, "Analysis of ionization wave dynamics in low-temperature plasma jets from fluid modeling supported by experimental investigations," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 21, no. 4, p. 045003, jun 2012.
 - [106] S. Wu, Y. Cao, and X. Lu, "The state of the art of applications of atmospheric-pressure nonequilibrium plasma jets in dentistry," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 44, no. 2, pp. 134–151, feb 2016.
 - [107] Q. Nie, Z. Cao, C. S. Ren, D. Z. Wang, and M. G. Kong, "A two-dimensional cold atmospheric plasma jet array for uniform treatment of large-area surfaces for plasma medicine," *New Journal of Physics*, vol. 11, no. 11, p. 115015, nov 2009.
 - [108] Z. Cao, Q. Nie, D. L. Bayliss, J. L. Walsh, C. S. Ren, D. Z. Wang, and M. G. Kong, "Spatially extended atmospheric plasma arrays," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 19, no. 2, p. 025003, feb 2010.
 - [109] E. Robert, T. Darny, S. Dozias, S. Iseni, and J. M. Pouvesle, "New insights on the propagation of pulsed atmospheric plasma streams : From single jet to multi jet arrays," *Physics of Plasmas*, vol. 22, no. 12, p. 122007, dec 2015.
 - [110] M. Moisan, Z. Zakrzewski, and R. Pantel, "The theory and characteristics of an efficient surface wave launcher (surfatron) producing long plasma columns," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 12, no. 2, pp. 219–237, feb 1979.
 - [111] M. Moisan and Z. Zakrzewski, "Plasma sources based on the propagation of electromagnetic surface waves," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 24, no. 7, pp. 1025–1048, jul 1991.
 - [112] M. Chaker, M. Moisan, and Z. Zakrzewski, "Microwave and RF surface wave sustained discharges as plasma sources for plasma chemistry and plasma processing," *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, vol. 6, no. 1, pp. 79–96, mar 1986.
 - [113] H. Zerrouki, V. Rizzati, C. Bernis, A. Nègre-Salvayre, J. P. Sarrette, and S. Cousty, "Escherichia coli nmorphological changes and lipid a removal induced by reduced pressure nitrogen afterglow exposure," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 4, pp. 1–14, 2015.
 - [114] B. J. Park, K. Takatori, M. H. Lee, D.-W. Han, Y. I. Woo, H. J. Son, J. K. Kim, K.-H. Chung, S. O. Hyun, and J.-C. Park, "Escherichia coli sterilization and lipopolysaccharide inactivation using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure," *Surface and Coatings Technology*, vol. 201, no. 9-11, pp. 5738–5741, feb 2007.
 - [115] D. Purevdorj, N. Igura, I. Hayakawa, and O. Ariyada, "Inactivation of escherichia coli by microwave induced low temperature argon plasma treatments," *Journal of Food Engineering*, vol. 53, no. 4, pp. 341–346, aug 2002.
 - [116] Z.-H. Lin, J.-S. Wu, C.-Y. T. Tschang, C.-F. Su, T. Wu, Y.-N. Shen, C.-T. Liu, W.-Y. Jang, and M.-T. Ho, "Development and characterization of a portable atmospheric-pressure argon plasma jet for sterilization," nov 2015.

- [117] Q. Zhang, J. Zhuang, T. von Woedtke, J. F. Kolb, K.-D. Weltmann, J. Zhang, and J. Fang, "Combination of pulsed electric fields and non-thermal plasma jet for more effective bacterial decontamination," may 2015.
- [118] J.-H. Lee, E.-H. Choi, K.-M. Kim, and K.-N. Kim, "Effect of non-thermal air atmospheric pressure plasma jet treatment on gingival wound healing," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 49, no. 7, p. 075402, jan 2016.
- [119] X. Zhou, Z. Xiong, Y. Cao, X. Lu, and D. Liu, "The antimicrobial activity of an atmospheric-pressure room-temperature plasma in a simulated root-canal model infected with enterococcus faecalis," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 38, no. 12, pp. 3370–3374, dec 2010.
- [120] C. Jiang, M.-T. Chen, A. Gorur, C. Schaudinn, D. E. Jaramillo, J. W. Costerton, P. P. Sedghizadeh, P. T. Vernier, and M. A. Gundersen, "Nanosecond pulsed plasma dental probe," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 6, no. 8, pp. 479–483, aug 2009.
- [121] J. Pan, K. Sun, Y. Liang, P. Sun, X. Yang, J. Wang, J. Zhang, W. Zhu, J. Fang, and K. H. Becker, "Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with enterococcus faecalis biofilms in vitro," *Journal of Endodontics*, vol. 39, no. 1, pp. 105–110, jan 2013.
- [122] T. Carus and K. Rackebrandt, "Collateral tissue damage by several types of coagulation (monopolar, bipolar, cold plasma and ultrasonic) in a minimally invasive, perfused liver model," *ISRN Surgery*, vol. 2011, pp. 1–7, 2011.
- [123] M. Hoffmann, H.-P. Bruch, P. Kujath, and S. Limmer, "Cold-plasma coagulation in the treatment of malignant pleural mesothelioma : results of a combined approach," *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, vol. 10, no. 4, pp. 502–505, jan 2010.
- [124] S. Kalghatgi, G. Fridman, M. Cooper, G. Nagaraj, M. Peddinghaus, M. Balasubramanian, V. Vasilets, A. Gutsol, A. Fridman, and G. Friedman, "Mechanism of blood coagulation by nonthermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 35, no. 5, pp. 1559–1566, oct 2007.
- [125] Y.-W. Hung, L.-T. Lee, Y.-C. Peng, C.-T. Chang, Y.-K. Wong, and K.-C. Tung, "Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing : An animal study," *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 79, no. 6, pp. 320–328, jun 2016.
- [126] S. Fathollah, S. Mirpour, P. Mansouri, A. R. Dehpour, M. Ghoranneviss, N. Rahimi, Z. S. Naraghi, R. Chalangari, and K. M. Chalangari, "Investigation on the effects of the atmospheric pressure plasma on wound healing in diabetic rats," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 19144, feb 2016.
- [127] S. Bekeschus, A. Schmidt, K.-D. Weltmann, and T. von Woedtke, "The plasma jet kINPen – a powerful tool for wound healing," *Clinical Plasma Medicine*, vol. In Press, jan 2016.

-
- [128] G.-M. Xu, X.-M. Shi, J.-F. Cai, S.-L. Chen, P. Li, C.-W. Yao, Z.-S. Chang, and G.-J. Zhang, "Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice," *Wound Rep and Reg*, vol. 23, no. 6, pp. 878–884, nov 2015.
 - [129] P. Chu, "Plasma-surface modification of biomaterials," *Materials Science and Engineering : R : Reports*, vol. 36, no. 5-6, pp. 143–206, mar 2002.
 - [130] P. Cools, R. Morent, and N. D. Geyter, *Advances in Bioengineering*. InTech, jul 2015.
 - [131] K. Kostov, T. Nishime, A. Castro, A. Toth, and L. Hein, "Surface modification of polymeric materials by cold atmospheric plasma jet," *Applied Surface Science*, vol. 314, pp. 367–375, sep 2014.
 - [132] J.-M. Plewa, M. Yousfi, C. Frongia, O. Eichwald, B. Ducommun, N. Merbahi, and V. Lobjois, "Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multicellular tumor spheroids," *New Journal of Physics*, vol. 16, no. 4, p. 043027, 2014.
 - [133] M. Keidar, R. M. Walk, A. Shashurin, P. Srinivasan, A. D. Sandler, S. Dasgupta, R. Ravi, R. Guerrero-Preston, and B. Trink, "Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy," *British journal of cancer*, vol. 105, no. 9, pp. 1295–1301, 2011.
 - [134] F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, H. Kano, M. Hori, and F. Kikkawa, "Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemoresistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 12, pp. 1–10, 2013.
 - [135] R. Bhat and R. Stamminger, "Preserving strawberry quality by employing novel food preservation and processing techniques - recent updates and future scope - an overview," *Journal of Food Process Engineering*, vol. 38, no. 6, pp. 536–554, feb 2015.
 - [136] A. Berardinelli, L. Vannini, L. Ragni, and M. E. Guerzoni, *Plasma for Bio-Decontamination, Medicine and Food Security*, Z. Machala, K. Hensel, and Y. Akishev, Eds. Springer Netherlands, 2012.
 - [137] J. Wan, J. Coventry, P. Swiergon, P. Sanguansri, and C. Versteeg, "Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low-temperature plasma," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 20, no. 9, pp. 414–424, sep 2009.
 - [138] L. K. Randeniya and G. J. J. B. de Groot, "Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits : A review," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 12, no. 7, pp. 608–623, jun 2015.
 - [139] K. Matra, "Non-thermal plasma for germination enhancement of radish seeds," *Procedia Computer Science*, vol. 86, pp. 132–135, 2016.

- [140] P. Sookwong, S. Yodpitak, J. Doungkaew, J. Jurithayo, D. Boonyawan, and S. Mahatheeranont, "Application of oxygen-argon plasma as a potential approach of improving the nutrition value of pre-germinated brown rice," *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 2, no. 12, pp. 946–951, nov 2014.
- [141] N. Y. Babaeva, N. Ning, D. B. Graves, and M. J. Kushner, "Ion activation energy delivered to wounds by atmospheric pressure dielectric-barrier discharges : sputtering of lipid-like surfaces," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 45, no. 11, p. 115203, mar 2012.
- [142] D. Mendis, M. Rosenberg, and F. Azam, "A note on the possible electrostatic disruption of bacteria," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 28, no. 4, pp. 1304–1306, 2000.
- [143] M. Laroussi, D. A. Mendis, and M. Rosenberg, "Plasma interaction with microbes," *New Journal of Physics*, vol. 5, pp. 41–41, apr 2003.
- [144] S. J. Dean, A. Petty, S. Swift, J. J. McGhee, A. Sharma, S. Shah, and J. P. Craig, "Efficacy and safety assessment of a novel ultraviolet c device for treating corneal bacterial infections," *Clinical & Experimental Ophthalmology*, vol. 39, no. 2, pp. 156–163, mar 2011.
- [145] B. K. Rao, P. Kumar, S. Rao, and B. Gurung, "Bactericidal effect of ultraviolet c (uvc), direct and filtered through transparent plastic, on gram-positive cocci : An in vitro study," vol. 57, no. 7, pp. 46–52, 2011.
- [146] M. Guo, J. Huang, H. Hu, W. Liu, and J. Yang, "UV inactivation and characteristics after photoreactivation of escherichia coli with plasmid : Health safety concern about UV disinfection," *Water Research*, vol. 46, no. 13, pp. 4031–4036, sep 2012.
- [147] V. Ullrich, A. Hildebrandt, and I. Roots, *Microsomes and Drug Oxidations : Proceedings of the Third International Symposium, Berlin, July 1976*, 2013.
- [148] P. Attri, Y. H. Kim, D. H. Park, J. H. Park, Y. J. Hong, H. S. Uhm, K.-N. Kim, A. Fridman, and E. H. Choi, "Generation mechanism of hydroxyl radical species and its lifetime prediction during the plasma-initiated ultraviolet (UV) photolysis," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 9332, mar 2015.
- [149] F. CORPORATION, "Material safety data sheet. hydrogen peroxide (20 to 40Tech. Rep., 2009.
- [150] S. B. Radding, D. H. Liu, H. L. Johnson, and T. Mill, "Review of the environment fate of selected chemicals. ntis 68-01-2681," 1977.
- [151] S. P. Glaeser, B. A. Berghoff, V. Stratmann, H.-P. Grossart, and J. Glaeser, "Contrasting effects of singlet oxygen and hydrogen peroxide on bacterial community composition in a humic lake," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, p. e92518, mar 2014.
- [152] J. Hoigné, *The Chemistry of Ozone in Water*. Springer Science Business Media, 1988.
- [153] J. C. Morris, "The aqueous solubility of ozone - a review," vol. 1, pp. 14–16, 1988.

-
- [154] M. Kelm, “Nitric oxide metabolism and breakdown,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1411, no. 2-3, pp. 273–289, may 1999.
 - [155] I. G. Zacharia and W. M. Deen, “Diffusivity and solubility of nitric oxide in water and saline,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 33, no. 2, pp. 214–222, feb 2005.
 - [156] L. Brullé, M. Vandamme, D. Riés, E. Martel, E. Robert, S. Lerondel, V. Trichet, S. Richard, J.-M. Pouvesle, and A. Le Pape, “Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a mia paca2-luc orthotopic pancreatic carcinoma model,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, pp. 1–10, 2012.
 - [157] N. Hattori, S. Yamada, K. Torii, S. Takeda, K. Nakamura, H. Tanaka, H. Kajiyama, M. Kanda, T. Fujii, G. Nakayama, H. Sugimoto, M. Koike, S. Nomoto, M. Fujiwara, M. Mizuno, M. Hori, and Y. Kodera, “Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells,” *International Journal of Oncology*, vol. 47, no. 5, pp. 1655–1662, sep 2015.
 - [158] M. Vandamme, E. Robert, S. Dozias, J. Sobilo, S. Lerondel, A. L. Pape, and J.-M. Pouvesle, “Response of human glioma u87 xenografted on mice to non thermal plasma treatment,” *Plasma Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 27–43, 2011.
 - [159] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, pp. 839–845, 2007.
 - [160] A. Oloumi, S. H. MacPhail, P. J. Johnston, J. P. Banath, and P. L. Olive, “Changes in subcellular distribution of topoisomerase α correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors,” *Cancer Research*, vol. 60, no. 20, pp. 5747–5753, 2000.
 - [161] C. M. L. West and R. M. Sutherland, “The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice,” *Radiation Research*, vol. 112, no. 1, pp. 105–115, 1987.
 - [162] D. Antoni, H. Burckel, E. Josset, and G. Noel, “Three-dimensional cell culture : A breakthrough in vivo,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 3, pp. 5517–5527, 2015.
 - [163] A. Desmaison, C. Frongia, K. Grenier, B. Ducommun, and V. Lobjois, “Mechanical stress impairs mitosis progression in multi-cellular tumor spheroids,” *PloS One*, vol. 8, no. 12, p. e80447, 2013.
 - [164] J. Laurent, C. Frongia, M. Cazales, O. Mondesert, B. Ducommun, and V. Lobjois, “Multicellular tumor spheroid models to explore cell cycle checkpoints in 3d,” *BioMed Central Cancer*, vol. 13, no. 73, 2013.
 - [165] J. Friedricha, R. Ebnerb, and L. A. Kunz-Schughartc, “Experimental anti-tumor therapy in 3-d : Spheroids – old hat or new challenge?” *International Journal of Radiation Biology*, vol. 83, no. 11-12, pp. 849–871, 2007.

- [166] A. T. C. Collection, “Thawing, propating; and cryopreserving protocol. nci-pbcf-ccl247 (hct 116) colorectal carcinoma (atcc ccl-247),” 2012.
- [167] A. Z. Becerra, C. P. Probst, M. A. Tejan, C. T. Aquina, M. G. Gonzalez, B. J. Hensley, K. Noyes, J. R. Monson, and F. J. Fleming, “Evaluating the prognostic role of elevated preoperative carcinoembryonic antigen levels in colon cancer patients : Results from the national cancer database.” *Anal of surgery oncology*, vol. 23, no. 5, pp. 1–8, jan 2016.
- [168] M. Grunnet and J. Sorensen, “Carcinoembryonic antigen (cea) as tumor marker in lung cancer,” *Lung Cancer*, vol. 76, no. 2, pp. 138 – 143, 2012.
- [169] H. Takahashi-Iwanaga, “The three-dimensional cytoarchitecture of the interstitial tissue in the rat kidney.” *Cell and Tissue Research*, vol. 264, no. 2, pp. 269–281, 1991.
- [170] I. A. D. Alexis Desmoulière and G. Gabbiani, “Normal and pathologic soft tissue remodeling : Role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis,” *Laboratory investigation*, vol. 83, no. 12, pp. 1686–1707, 2003.
- [171] J. C. Schuh, “Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice,” *Toxicologic Pathology*, vol. 32, no. 1, pp. 53–66, 2004.
- [172] D. S. Martin, M. E. Balis, B. Fisher, E. Frei, E. J. Freireich, G. H. Heppner, J. F. Holland, J. A. Houghton, P. J. Houghton, R. K. Johnson, A. Mittelman, Y. Rustum, R. C. Sawyer, F. A. Schmid, R. L. Stolfi, and C. W. Young, “Role of murine tumor models in cancer treatment research,” *Cancer Research*, vol. 46, no. 4, pp. 2189–2192, 1986.
- [173] R. Camalier, M. Alley, E. Sausville, S. Schepartz, and J. Plowman, “Us-nci testing procedures,” in *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*, H. H. Fiebig and A. M. Burger, Eds. Karger. Basel, 1999, vol. 54, pp. 121–135.
- [174] M. Podhorecka, A. Skladanowski, and P. Bozko, “H2ax phosphorylation : Its role in dna damage response and cancer therapy,” *Journal of Nucleic Acids*, vol. 2010, p. 920161, 2010.
- [175] I. Dufau, C. Frongia, F. Sicard, L. Dedieu, P. Cordelier, F. Ausseil, B. Ducommun, and A. Valette, “Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics : application to the gemcitabine/chk1 inhibitor combination in pancreatic cancer,” *BioMed Central Cancer*, vol. 12, no. 15, p. 15, 2012.
- [176] Y. Tsujimoto, “Apoptosis and necrosis : intracellular atp level as a determinant for cell death modes,” *Cell Death and differentiation*, vol. 4, no. 6, pp. 429–434, 1997.
- [177] P. Nicotera, M. Leist, and E. Ferrando-May, “Intracellular atp, a switch in the decision between apoptosis and necrosis,” *Toxicology Letters*, vol. 102–103, pp. 139 – 142, 1998.

- [178] O. Aftab, M. Nazir, M. Fryknäs, U. Hammerling, R. Larsson, and M. G. Gustafsson, "Label free high throughput screening for apoptosis inducing chemicals using time-lapse microscopy signal processing," *Apoptosis*, vol. 19, no. 9, pp. 1411–1418, 2014.
- [179] A. Faustino-Rocha, P. A. Oliveira, J. Pinho-Oliveira, C. Teixeira-Guedes, R. Soares-Maia, R. G. da Costa, B. Colaço, M. J. Pires, J. Colaço, R. Ferreira, and M. Ginja, "Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements," *LabAnimal*, vol. 42, no. 6, pp. 217–227, 2013.
- [180] G. R. Buettner, "Spin trapping : ESR parameters of spin adducts 1474 1528v," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 3, no. 4, pp. 259–303, 1987.
- [181] S. Y. Moon, W. Choe, H. S. Uhm, Y. S. Hwang, and J. J. Choi, "Characteristics of an atmospheric microwave-induced plasma generated in ambient air by an argon discharge excited in an open-ended dielectric discharge tube," *Physics of Plasmas*, vol. 9, no. 9, pp. 4045–4051, 2002.
- [182] M. D. Calzada, M. Saez, and M. C. Garcia, "Characterization and study of the thermodynamic equilibrium departure of an argon plasma flame produced by a surface-wave sustained discharge," *Journal of Applied Physics*, vol. 88, no. 1, pp. 34–39, 2000.
- [183] C. de Izarra, "Uv oh spectrum used as a molecular pyrometer," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 33, no. 14, p. 1697, 2000.
- [184] G. Dieke and H. Crosswhite, "The ultraviolet bands of oh fundamental data," *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, vol. 2, no. 2, pp. 97 – 199, 1962.
- [185] W. L. Wiese and J. R. Fuhr, "Accurate atomic transition probabilities for hydrogen, helium, and lithium," *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, vol. 38, no. 3, pp. 565–720, 2009.
- [186] M. A. Gigoso, M. A. Gonzalez, and V. Cardenoso, "Computer simulated balmer-alpha, -beta and -gamma stark line profiles for non-equilibrium plasmas diagnostics," *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy*, vol. 58, no. 8, pp. 1489 – 1504, 2003.
- [187] N. Konjevic, M. Ivkovic, and N. Sakan, "Hydrogen balmer lines for low electron number density plasma diagnostics," *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy*, vol. 76, pp. 16 – 26, 2012.
- [188] M. Vandamme, E. Robert, S. Lerondel, V. Sarron, D. Ries, S. Dozias, J. Sobilo, D. Gosset, C. Kieda, B. Legrain, J.-M. Pouvesle, and A. L. Pape, "ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma," *International Journal of Cancer*, vol. 130, no. 9, pp. 2185–2194, aug 2011.
- [189] G. Isbary, G. Morfill, H. Schmidt, M. Georgi, K. Ramrath, J. Heinlin, S. Karer, M. Landthaler, T. Shimizu, B. Steffes, W. Bunk, R. Monetti, J. Zimmermann, R. Pompl, and W. Stolz, "A first prospective randomized controlled trial to decrease

- bacterial load using cold atmospheric argon plasma on chronic wounds in patients,” *British Journal of Dermatology*, vol. 163, no. 1, pp. 78–82, mar 2010.
- [190] S. G. Joshi, M. Cooper, A. Yost, M. Paff, U. K. Ercan, G. Fridman, G. Friedman, A. Fridman, and A. D. Brooks, “Nonthermal dielectric-barrier discharge plasma-induced inactivation involves oxidative DNA damage and membrane lipid peroxidation in escherichia coli,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 55, no. 3, pp. 1053–1062, jan 2011.
- [191] S. Rupf, A. Lehmann, M. Hannig, B. Schafer, A. Schubert, U. Feldmann, and A. Schindler, “Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet,” *Journal of Medical Microbiology*, vol. 59, no. 2, pp. 206–212, nov 2009.
- [192] M. Wang, B. Holmes, X. Cheng, W. Zhu, M. Keidar, and L. G. Zhang, “Cold atmospheric plasma for selectively ablating metastatic breast cancer cells,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, p. e73741, sep 2013.
- [193] S. Kalghatgi, G. Friedman, A. Fridman, and A. M. Clyne, “Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release,” *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 38, no. 3, pp. 748–757, dec 2009.
- [194] T. Adachi, H. Tanaka, S. Nonomura, H. Hara, S. ichi Kondo, and M. Hori, “Plasma-activated medium induces a549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial–nuclear network,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 79, pp. 28 – 44, 2015.
- [195] M. Hoentsch, T. von Woedtke, K.-D. Weltmann, and J. B. Nebe, “Time-dependent effects of low-temperature atmospheric-pressure argon plasma on epithelial cell attachment, viability and tight junction formation in vitro,” *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 45, no. 2, p. 025206, dec 2011.
- [196] J. W. Chang, S. U. Kang, Y. S. Shin, K. I. Kim, S. J. Seo, S. S. Yang, J.-S. Lee, E. Moon, S. J. Baek, K. Lee, and C.-H. Kim, “Non-thermal atmospheric pressure plasma induces apoptosis in oral cavity squamous cell carcinoma : Involvement of DNA-damage-triggering sub-g1 arrest via the ATM/p53 pathway,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 545, pp. 133–140, mar 2014.
- [197] F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Hori, and F. Kikkawa, “Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma,” *SpringerPlus*, vol. 3, no. 1, p. 398, 2014.
- [198] A. M. Hirst, M. S. Simms, V. M. Mann, N. J. Maitland, D. O’Connell, and F. M. Frame, “Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells,” *Br J Cancer*, vol. 112, no. 9, pp. 1536–1545, apr 2015.
- [199] B. Desoize, “Multicellular resistance : a paradigm for clinical resistance?” *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 36, no. 2-3, pp. 193–207, nov 2000.

-
- [200] R. Sutherland, "Cell and environment interactions in tumor microregions : the multi-cell spheroid model," *Science*, vol. 240, no. 4849, pp. 177–184, apr 1988.
- [201] D. Drasdo and S. Höhme, "A single-cell-based model of tumor growth in vitro : monolayers and spheroids," *Phys. Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. 133–147, jul 2005.
- [202] D. B. Graves, "The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 45, no. 26, p. 263001, 2012.
- [203] P. Chelikani, I. Fita, and P. C. Loewen, "Diversity of structures and properties among catalases," *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, vol. 61, no. 2, pp. 192–208, 2004.
- [204] M. López-Lázaro, "Dual role of hydrogen peroxide in cancer : Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy," *Cancer Letters*, vol. 252, no. 1, pp. 1–8, 2007.
- [205] H. Tresp, M. U. Hammer, J. Winter, K.-D. Weltmann, and S. Reuter, "Quantitative detection of plasma-generated radicals in liquids by electron paramagnetic resonance spectroscopy," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 46, no. 43, p. 435401, 2013.
- [206] H. Wu, P. Sun, H. Feng, H. Zhou, R. Wang, Y. Liang, J. Lu, W. Zhu, J. Zhang, and J. Fang, "Reactive oxygen species in a non-thermal plasma microjet and water system : Generation, conversion, and contributions to bacteria inactivation—an analysis by electron spin resonance spectroscopy," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 9, no. 4, pp. 417–424, 2012.
- [207] Q. Zhang, P. Sun, H. Feng, R. Wang, Y. Liang, W. Zhu, K. H. Becker, J. Zhang, and J. Fang, "Assessment of the roles of various inactivation agents in an argon-based direct current atmospheric pressure cold plasma jet," *Journal of Applied Physics*, vol. 111, no. 12, p. 123305, 2012.
- [208] M. Tahara and M. Okubo, "Detection of free radicals produced by a pulsed electrohydraulic discharge using electron spin resonance," *Journal of Electrostatics*, vol. 72, no. 3, pp. 222 – 227, 2014.
- [209] K. P. Arjunan and A. M. Clyne, "Hydroxyl radical and hydrogen peroxide are primarily responsible for dielectric barrier discharge plasma-induced angiogenesis," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 8, no. 12, pp. 1154–1164, 2011.
- [210] E. Takai, T. Kitamura, J. Kuwabara, S. Ikawa, S. Yoshizawa, K. Shiraki, H. Kawasaki, R. Arakawa, and K. Kitano, "Chemical modification of amino acids by atmospheric-pressure cold plasma in aqueous solution," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 47, no. 28, p. 285403, 2014.
- [211] W. Tian and M. J. Kushner, "Atmospheric pressure dielectric barrier discharges interacting with liquid covered tissue," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 47, no. 16, p. 165201, 2014.

- [212] E. C. Neyts, M. Yusupov, C. C. Verlackt, and A. Bogaerts, "Computer simulations of plasma–biomolecule and plasma–tissue interactions for a better insight in plasma medicine," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 47, no. 29, p. 293001, 2014.
- [213] M. Yusupov, E. C. Neyts, P. Simon, G. Berdiyorov, R. Snoeckx, A. C. T. van Duin, and A. Bogaerts, "Reactive molecular dynamics simulations of oxygen species in a liquid water layer of interest for plasma medicine," *Journal of Physics D : Applied Physics*, vol. 47, no. 2, p. 025205, 2014.
- [214] S. Kanazawa, T. Furuki, T. Nakaji, S. Akamine, and R. Ichiki, "Measurement of oh radicals in aqueous solution produced by atmospheric-pressure lf plasma jet," in *Electrostatics Joint Conference. Cambridge, ON, Canada*, 2012.
- [215] T. Azma, K. Fujii, and O. Yuge, "Reaction between imidazolineoxil n-oxide (carboxy-ptio) and nitric oxide released from cultured endothelial cells : Quantitative measurement of nitric oxide by esr spectrometry," *Life Sciences*, vol. 54, no. 11, pp. 185–190, 1994.
- [216] T. Akaike, M. Yoshida, Y. Miyamoto, K. Sato, M. Kohno, K. Sasamoto, K. Miyazaki, S. Ueda, and H. Maeda, "Antagonistic action of imidazolineoxyl n-oxides against endothelium-derived relaxing factor/•no (nitric oxide) through a radical reaction," *Biochemistry*, vol. 32, no. 3, pp. 827–832, 1993.
- [217] N. Puac, M. Miletic, M. Mojovic, A. Popovic-Bijelic, D. Vukovic, B. Milicic, D. Miletic, S. Lazovic, G. Malovic, and Z. L. Petrovic, "Sterilization of bacteria suspensions and identification of radicals deposited during plasma treatment," *Open Chemistry*, vol. 13, no. 1, pp. 332–338, 2014.
- [218] D. Dobrynin, A. Fridman, and A. Y. Starikovskiy, "Reactive oxygen and nitrogen species production and delivery into liquid media by microsecond thermal spark-discharge plasma jet," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 40, no. 9, pp. 2163–2171, 2012.
- [219] T. Takamatsu, A. Kawate, K. Uehara, T. Oshita, H. Miyahara, D. Dobrynin, G. Fridman, A. A. Fridman, and A. Okino, "Bacterial inactivation in liquids using multi-gas plasmas," *Plasma medicine*, vol. 2, no. 4, pp. 237–347, 2012.
- [220] J. B. Mannick and C. M. Schonhoff, "Nitrosylation : the next phosphorylation?" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 408, no. 1, pp. 1–6, 2002.
- [221] H. Ischiropoulos, "Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 305, no. 3, pp. 776–783, 2003.
- [222] D. X. Liu, Z. C. Liu, C. Chen, A. J. Yang, D. Li, M. Z. Rong, H. L. Chen, and M. G. Kong, "Aqueous reactive species induced by a surface air discharge : Heterogeneous mass transfer and liquid chemistry pathways," *Scientific Reports*, vol. 6, p. 23737, 2016.

- [223] J. O. Lundberg, E. Weitzberg, and M. T. Gladwin, "The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, pp. 156–167, 2008.
- [224] S. J. Kim and T. H. Chung, "Cold atmospheric plasma jet-generated ions and their selective effects on normal and carcinoma cells," *Scientific Reports*, vol. 6, p. 20332, 2016.
- [225] H. Ohshima, A. Ono, A. Matsuda, S. Sawamura, and M. Kuwabara, "Reactions between hydroxyl-radical-induced 7, 8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine precursor and the spin trap α -phenyl- n -tert-butyl nitron," *Journal of Radiation Research*, vol. 38, no. 1, pp. 15–25, 1997.
- [226] V. Mišík and P. Riesz, "Effect of Cd^{2+} on the $\bullet\text{H}$ atom yield in the sonolysis of water. evidence against the formation of hydrated electrons," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 101, no. 8, pp. 1441–1444, 1997.
- [227] R. Zhou, R. Zhou, J. Zhuang, Z. Zong, X. Zhang, D. Liu, K. Bazaka, and K. Ostrikov, "Interaction of atmospheric-pressure air microplasmas with amino acids as fundamental processes in aqueous solution," *PLoS ONE*, vol. 11, no. 5, pp. 1–17, 2016.
- [228] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, and E. Bourdon, "The antioxidant properties of serum albumin," *FEBS Letters*, vol. 582, no. 13, pp. 1783–1787, 2008.
- [229] C. C. Winterbourn, "Toxicity of iron and hydrogen peroxide : the fenton reaction," *Toxicology Letters*, vol. 82–83, pp. 969–974, 1995.
- [230] F. Judée, N. Merbahi, G. Wattieaux, J.-M. Plewa, and M. Yousfi, "Comparative studies of double dielectric barrier discharge and microwave argon plasma jets at atmospheric pressure for biomedical applications," *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 43, no. 9, pp. 3332–3338, 2015.
- [231] F. Judée, N. Merbahi, G. Wattieaux, and M. Yousfi, "Analysis of ar plasma jets induced by single and double dielectric barrier discharges at atmospheric pressure," *Journal of Applied Physics*, vol. –, no. –, pp. –, Submitted.
- [232] J. Jarrige, M. Laroussi, and E. Karakas, "Formation and dynamics of plasma bullets in a non-thermal plasma jet : influence of the high-voltage parameters on the plume characteristics," *Plasma Sources Science and Technology*, vol. 19, no. 6, p. 065005, 2010.
- [233] J. L. Walsh and M. G. Kong, "Room-temperature atmospheric argon plasma jet sustained with submicrosecond high-voltage pulses," *Applied Physics Letters*, vol. 91, no. 22, p. 221502, 2007.
- [234] Q. Xiong, A. Nikiforov, X. Lu, and C. Leys, "High-speed dispersed photographing of an open-air argon plasma plume by a grating-iccd camera system," *JOURNAL OF PHYSICS D-APPLIED PHYSICS*, vol. 43, no. 41, p. 415201, 2010.

- [235] L. Chen, P. Zhao, X. Shu, J. Shen, and Y. Meng, “On the mechanism of atmospheric pressure plasma plume,” *Physics of Plasmas*, vol. 17, no. 8, p. 083502, 2010.
- [236] H. Yi, L. Na, P. Jing, L. Jie, and W. Yan, “Discharge characteristics of an atmospheric pressure argon plasma jet generated with screw ring-ring electrodes in surface dielectric barrier discharge,” *Plasma Science and Technology*, vol. 15, no. 8, pp. 780–786, 2013.
- [237] M. Qian, C. Ren, D. Wang, J. Zhang, and G. Wei, “Stark broadening measurement of the electron density in an atmospheric pressure argon plasma jet with double-power electrodes,” *Journal of Applied Physics*, vol. 107, no. 6, p. 063303, 2010.
- [238] Y. Hong, N. Lu, J. Pan, J. Li, and Y. Wu, “Electrical and spectral characteristics of an atmospheric pressure argon plasma jet generated with tube-ring electrodes in surface dielectric barrier discharge,” *Thin Solid Films*, vol. 531, pp. 408–414, 2013.
- [239] Y. S. Seo, A.-A. H. Mohamed, K. C. Woo, H. W. Lee, J. K. Lee, and K. T. Kim, “Comparative studies of atmospheric pressure plasma characteristics between he and ar working gases for sterilization,” *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 38, no. 10, pp. 2954–2962, 2010.
- [240] J. Z. Porterfield and A. Zlotnick, “A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance,” *Virology*, vol. 407, no. 2, pp. 281–288, nov 2010.
- [241] T. Dai, B. Garcia, C. K. Murray, M. S. Vrahas, and M. R. Hamblin, “Uvc light prophylaxis for cutaneous wound infections in mice,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, no. 7, pp. 3841–3848, may 2012.
- [242] N. Jomaa, “Modélisations physiques avec validations expérimentales des jets de plasmas froids d’hélium à la pression atmosphérique,” Ph.D. dissertation, Université de toulouse-France, 2014.

TITLE

LIQUIDS ACTIVATED BY COLD PLASMA JET FOR SELECTIVE TREATMENT OF COLORECTAL CANCER:

Synthesis, characterization and therapeutic trials on 3D *in vitro* and *in vivo* models.

ABSTRACT

Plasma devices at atmospheric pressure (AP) generate many physical active species (photons, charged particles, electric field, etc.) and chemical (free radicals, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, etc...). This species are well known for their direct or indirect biological effects thus biomedical treatment by low temperature plasma jets at AP is currently a hot research topic. The upsurge of radioresistance and chemoresistance of microorganisms and cancer cells requires the development of new biomedical treatment. In this general context, the present work is a step towards the understanding of the effect induced by low temperature plasma jets at atmospheric pressure on colorectal cancer (second leading cause of death by cancer in France).

This thesis focuses on the implementation of an *in vitro* biological model (multicellular tumor spheroid of colorectal cancer HCT116) in 3 dimensions which allows to take into account key parameters in tumor proliferation. This model is also well suited for the prediction of *in vivo* results in the aim of a subsequent clinical study. Further research about kinetic reactions of active species has been studied from the plasma device up to intracellular interactions through physical, biological and chemical analyses. Indirect treatment of tumors was carried out through helium plasma jet activated liquids. This solution was chosen for its relevance for endoscopic treatment of colorectal cancer.

Interaction between plasma activated liquid and multicellular tumor spheroids has shown two distinct pathways. The first one is the genotoxicity of activated medium induced by the occurrence of hydrogen peroxide which induced DNA damages once penetrated in intracellular medium and leading to cell death by apoptosis. A direct interaction between free radicals generated in liquid medium and the latter components (amino acids, glucose, etc.) associated with the occurrence of nitrites and nitrates induces a long-term antiproliferative effect of plasma activated liquid. Chemical pathways of the formation of these active species were identified by using different analysis techniques such as electron paramagnetic resonance and optical emission spectroscopy. Therapeutic analysis have also demonstrated that plasma activated liquid damage preferentially colon cancer cells rather than healthy cells making it a particularly promising selective treatment method.

The design and the characterization of a second plasma jet using argon as a carrier gas was carried out with the aim to improve the antiproliferative effect of plasmas on tumors while taking into account the requirement for the use of such device for colorectal cancer treatment.

KEYWORDS

Plasma jets at atmospheric pressure, biomedical applications, colorectal cancer, multicellular tumor spheroid, plasma activated liquid, antiproliferative effect, cytotoxic and genotoxic effect, selectivity, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, free radical, hydrogen peroxide, electron paramagnetic resonance, experimental characterization of plasma jets, optimization of plasma jets, optical emission spectroscopy.

TITRE

**Liquides activés par jet de plasma froid pour le traitement sélectif du cancer colorectal :
Synthèse, caractérisation et essais thérapeutiques sur modèles cellulaire 3D et *in vivo***

RÉSUMÉ

Les dispositifs plasma à la pression atmosphérique (PA) produisent de nombreuses espèces actives physiques (photons, particules chargées, champ électriques etc.) et chimiques (radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène, espèces réactives de l'azote etc.). Ces espèces connues pour leurs effets biologiques directs ou indirects font de l'utilisation des jets de plasmas froids à la PA pour des traitements biomédicaux un sujet de recherche en plein développement. La recrudescence des cas de radiorésistance et chimiorésistance chez les micro-organismes et les cellules cancéreuses impose la recherche de nouveaux modes de traitements innovants. C'est dans ce contexte général que s'inscrit les travaux présentés ici dont l'enjeu majeur est la compréhension des mécanismes d'actions des plasmas froids à la PA sur le cancer colorectal (deuxième cause de mortalité par cancer en France).

Le travail de thèse présenté concerne l'utilisation d'un modèle biologique *in-vitro* (sphéroïde tumoral multicellulaire du cancer du côlon HCT116) en 3 dimensions qui permet de prendre en compte des paramètres déterminants dans la prolifération tumorale. Ce modèle permet ainsi une meilleure prédiction des résultats *in vivo* dans l'objectif d'une étude clinique ultérieure. De plus les cinétiques de créations des espèces actives ont été étudiées dans leur globalité depuis le dispositif plasma jusqu'aux interactions intracellulaires à partir d'analyses physiques, biologiques et chimiques. Le traitement indirect par utilisation de liquides activés par jet de plasma d'hélium a été privilégié pour élaborer un traitement endoscopique du cancer colorectal.

L'ensemble des travaux menés sur l'observation des interactions des liquides activés par plasma sur les sphéroïdes tumoraux multicellulaires a permis de révéler deux modes d'actions distincts. Le premier étant une génotoxicité du liquide activé induite par la présence de peroxyde d'hydrogène dont l'action induit une cassure double brin de l'ADN intracellulaire conduisant les cellules à la mort par apoptose. Une interaction directe des radicaux libres produits dans le milieu avec les composants de ce dernier (acides aminés, glucose, etc.) ainsi que la présence de nitrites et nitrates induisent également un effet antiprolifératif à long terme du milieu activé par plasma sur les tumeurs HCT116. Différentes méthodes comme la résonance paramagnétique électronique et la spectroscopie d'émission optique ont permis de révéler des voies de création possibles conduisant à la formation de ces espèces actives. Des campagnes d'essais thérapeutiques ont permis d'évaluer la capacité des liquides activés par plasma à cibler davantage les cellules cancéreuses plutôt que les cellules saines ce qui en fait une méthode de traitement sélectif particulièrement prometteuse.

Le développement et la caractérisation d'un second jet de plasma d'argon a été réalisé avec l'objectif d'optimiser l'effet antiprolifératif des plasmas sur les tumeurs tout en tenant compte des contraintes imposées par l'utilisation d'un tel dispositif pour le traitement du cancer colorectal.

MOTS CLÉS

Jets de plasmas froids à la pression atmosphérique, applications biomédicales, cancer colorectal, sphéroïde tumoral multicellulaire, liquide activé par plasma, effet antiprolifératif, effet génotoxique et cytotoxique, sélectivité, espèces réactives de l'oxygène, espèces réactives de l'azote, radicaux libres, peroxyde d'hydrogène, résonance paramagnétique électronique, caractérisation expérimentale des jets plasmas, optimisation des jets plasmas, spectroscopie d'émission optique.